

UDK:636.082.454+616.33
Stručni rad

POBAČAJI GOVEDA UZROKOVANI KONTAGIOZNYM INFEKTIVNYM AGENSIMA NA GAZDINSTVIMA PKB KORPORACIJE TOKOM 2014. GODINE

D. Cvetojević, B. Savić, S. Stanojević, B. Kureljušić, N. Jezdimirović, S. Bojković-Kovačević, M. Pavlović, M. Katić, D. Jakić Dimić*

Izvod: Abortusi predstavljaju značajan problem u savremenom uzgoju goveda jer direktno i indirektno utiču na ekonomsku isplativost proizvodnje. Pobačaji goveda mogu biti izazvani infektivnim (virusi, bakterije, protozoe, gljivice) ili neinfektivnim faktorima. Infektivni agensi kao uzročnici pobačaja mogu pored abortogenog efekta imati i drugu organopatologiju čime dodatno ugrožavaju zdravstveno stanje životinja, a time i proizvodnju. Takođe, pojedini uzročnici imaju i zoonotski potencijal.

U ovom radu prikazani su rezultati dijagnostičkih ispitivanja uzoraka poreklom od krava koje su abortirale sa gazdinstava PKB-a tokom 2014. godine. Metodom reakcije lančane polimeraze (PCR) ispitivano je prisustvo genoma BVD virusa, IBR virusa, Šmalenberg virusa, *Neospora caninum* i *Coxiella burnetii*. Pregledani su uzorci (fetus, placenta ili brisevi) od 137 krava koje su abortirale pri čemu je 46 krava (33,5%) bilo pozitivno na neki od ispitivanih agenasa. Prisustvo jednog od patogena je detektovano kod 43 krave (31,4%), dok su uzorci od 3 krave (2,2%) bili istovremeno pozitivni na 2 uzročnika. Prema ovim rezultatima, najzastupljeniji uzročnici su *Neospora caninum* i BVD virus koji su dokazani kod 23 (16,8%), odnosno 19 (13,8%) krava. *Coxiella burnetii* je dokazana kod 6 krava (4,4%), IBR virus kod jedne, dok prisustvo genoma Šmalenberg virusa nije ustanovljeno ni kod jedne krave.

Trenutni rezultati ukazuju da su kontagiozni uzročnici abortusa prisutni u značajnoj meri na gazdinstvima PKB korporacije. Za njihovu kontrolu i otkrivanje neophodna je bliska saradnja veterinarske službe i dijagnostičke laboratorije.

Ključne reči: pobačaj, krava, PCR, PKB.

Uvod

U savremenom sistemu uzgoja goveda pobačaji predstavljaju problem koji značajno utiče na proizvodnju (Anderson i sar., 1990). Pobačaj (abortus) se kod goveda definiše kao prekid graviditeta između 42-og i 260-og dana steonosti istiskivanjem ploda koji je nezreo i nije sposoban za život (Augustine, 2000; Vuković i Perković, 2012). Kasne abortuse treba razlikovati od prevremeno rođenih plodova koji su iako rođeni pre vremena sposobni za život (Miller, 1977). Abortusi mogu biti izazvani infektivnim ili neinfektivnim agensima. U neinfektivne faktore koji mogu dovesti do abortusa spadaju: genetske anomalije ploda, nutritivni deficiti, hormonalni poremećaji, trauma, toksične supstance, toksične biljke (Augustine, 2000; Yaeger, 1993). Infektivni agensi koji mogu dovesti do abortusa kod goveda su mnogobrojni i uključuju viruse (bovini herpes virus 1 - IBR, virus bovine virusne dijareje - BVD, Šmalenberg virus - SBV, virus bolesti plavog jezika - BTV); bakterije (*Brucella spp.*, *Leptospira spp.*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp.*, *Arcanobacterium pyogenes*, *Campylobacter fetus*, *Chlamydomphila spp.*, *Coxiella burnetii*, *Haemophilus somnus*, *E. coli*,

* Đorđe Cvetojević, dr. vet., istraživač saradnik; Dr sci. vet. med. Božidar Savić, naučni saradnik; Mr Slobodan Stanojević, istraživač saradnik; Dr sci. vet. med. Branislav Kureljušić, naučni saradnik; Nemanja Jezdimirović, dr. vet., istraživač saradnik; Naučni institut za veterinarstvo Srbije, Beograd, Republika Srbija. Slavica Bojković-Kovačević, dr. vet.; Veterinarska stanica PKB, Beograd, Republika Srbija. Dr sci. vet. med. Miloš Pavlović, vanredni profesor; Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine, Beograd, Republika Srbija. Marko Katić, dr. vet.; Veterinarska stanica PKB, Beograd, Republika Srbija. Dr sci. vet. med. Dobrila Jakić Dimić, naučni savetnik; Naučni institut za veterinarstvo Srbije, Beograd, Republika Srbija.

E-mail prvog autora: jaffvet@gmail.com. Rad je realizovan u okviru projekata TR 31062 i III 46009 koje finansira Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

Bacillus spp i dr.); gljivice (*Aspergillus fumigatus*, *Mucor* spp.) i protozoe (*Neospora caninum*, *Trichomonas foetus*, *Toxoplasma gondii*) (Daniel Givens i Marley, 2008). Infektivni abortogeni agensi se mogu međusobno podeliti na kontagiozne i nekontagiozne. Kontagioznim smatramo one koji se mogu širiti i prenositi sa jedne na drugu kravu (virusi, *Coxiella burnetti*, *Neospora caninum*, *Brucella* spp., *Leptospira* spp. i dr.). U nekontagiozne uzročnike spadaju mnoge ubikvitarne i oportunističke bakterije (*Pasteurella multocida*, *Haemophilus somnus*, *E. coli*, *Bacillus* spp., *Arcanobacterium pyogenes*, *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp. i dr.) koje se inače nalaze kao deo saprofitske flore krave ili su u njenoj okolini. Nekontagiozni uzročnici uglavnom izazivaju sporadične abortuse i u uslovima adekvatnog sistema držanja i ishrane krava ne predstavljaju veći problem obzirom da se ne prenose u zapatu (Youngquist i Threlfall, 2007; Yaeger, 1993). Kontagiozni uzročnici se prenose i horizontalno i vertikalno u zapatu i mogu dovesti do velikih gubitaka usled pobačaja. Bitno je napomenuti da pojedini kontagiozni uzročnici imaju i zoonotski karakter (*Coxiella burnetti*, *Brucella* spp., *Leptospira* spp. i dr.).

Cilj ovog rada bio je da se primenom reakcije lančane polimeraze (PCR) ispita prisustvo i zastupljenost IBR, BVD, SBV, *Coxiella burnetti* i *Neospora caninum* u uzorcima koji su sa farmi PKB korporacije dostavljani u Naučni institut za veterinarstvo Srbije tokom 2014 godine.

Materijal i metode rada

Na dijagnostičko ispitivanje dostavljeni su uzorci (pobačeni plod, placenta, cervikalni bris, vaginalni bris) poreklom od 137 krava koje su abortirale. Ukupno je dostavljeno 9 pobačenih fetusa, 52 uzorka tkiva placentne, 39 cervikalnih i 56 vaginalnih briseva. Od svakog pobačenog ploda, napravljen je zbirni uzorak koji se sastojao od parenhimatoznih organa (mozak, srce, jetra, slezina, bubreg) i sadržaja sirišta. Tkiva organa su macerirana i resuspendovana u 9 ml fosfatnog pufera (PBS – phosphate buffer saline), nakog čega je izvršena solidna homogenizacija uzorka. Tkivo placentne je pripremljeno na isti način. Vaginalni i cervikalni brisevi su resuspendovani u 1 ml PBS pufera nakon čega je izvršena homogenizacija. Po 200 µl homogenizata je korišćeno za ekstrakciju DNK i RNK primenom komercijalnih setova za ekstrakciju nukleinskih kiselina prema uputstvu proizvođača (QIAamp DNA mini kit, Qiagen; Gene JET Viral DNA and RNA purification kit, Thermo scientific). Za amplifikaciju korespondentnog segmenta genoma IBR virusa, BVD virusa, Šmalenberg virusa, *Coxiella burnetii* i *Neospora caninum* korišćena je reakcija lančane polimeraze (PCR) i prajmeri opisani od strane Ramneek i sar. (2005), Weinstock i sar. (2001), Bilk i sar. (2012), Berri i sar. (2000) i Ellis i sar. (1999) primenom komercijalnog seta za PCR (TopTaq Mastermix kit - Qiagen; One step RT-PCR kit - Qiagen). Po 10 µl dobijenog PCR proizvoda je analizirano agar gel elektroforezom u 2% gelu, sa dodatkom etidijum-bromida i vizuelizovano UV transiluminatorom.

Rezultati i diskusija

Od 137 krava koje su abortirale, kod 46 (33,5%) je dokazano prisustvo genoma bar jednog uzročnika. Kod 43 (31,4%) krave dokazan je po jedan uzročnik, dok je kod 3 (2,2%) krave ustanovljeno istovremeno prisustvo dva agensa. Najzastupljeniji dijagnostikovani uzročnik bila je *Neospora caninum* koja je dokazana kod 23 (16,8%) krave. Genom BVD virusa je dokazan kod 19 (13,8%), *Coxiella burnetii* kod 6 (4,4%), IBR virusa kod jedne (0,7%) dok SBV virus nije dokazan ni kod jedne krave. Distribucija pozitivnih slučajeva u odnosu na dostavljeni broj uzoraka po farmama je prikazana u tabeli 1.

Tab. 1. Broj dostavljenih i pozitivnih uzoraka po farmama
Number of submitted and positive samples per farms

Farma <i>Farm</i>	Br. dostavljenih uzoraka / br. pozitivnih <i>No. of submitted samples / No. of positive</i>	Broj pozitivnih uzoraka <i>Number of positive samples</i>				
		BVD	IBR	SBV	<i>Coxiella burnetii</i>	<i>Neospora caninum</i>
Mladost	10/4	1	0	0	0	3
Lepušnica	48/14	6	0	0	3	5
Kovilovo	40/14	7	0	0	2	5
Dunavac	11/8	2	1	0	0	5
Padinska skela	23/7	2	0	0	1	4
Partizanski prelaz	5/2	1	0	0	0	1
Ukupno <i>Total</i>	137/49	19	1	0	6	23

Najviše dostavljenih i pozitivnih uzoraka je sa gazdinstava Lepušnica (48 dostavljeno i 14 pozitivno) i Kovilovo (40 dostavljeno i 14 pozitivno). Kao najzastupljeniji uzročnici, izdvajaju se *Neospora caninum* i BVD virus koji su dokazani kod 23, odnosno 19 krava. Ovakav podatak je u skladu sa literaturnim podacima obzirom da se *Neospora caninum* danas smatra jednim od glavnih uzročnika abortusa goveda širom sveta dok je abortogeni potencijal BVD virusa odavno dokazan (Agerholm i sar., 1997; Dubey i Schares, 2006; Sager i sar., 2001). Slučajevi koinfekcije sa dva patogena (BVD virusa i *Neospora caninum* kod dve krave i IBR virusa i *Neospora caninum* kod jedne) nisu retkost i opisani su i ranije (Sager i sar., 2001; Cvetojević i sar., 2013). Abortusi uzrokovani sa *Coxiella burnetii* predstavljaju poseban problem obzirom da se radi o zoonotskom uzročniku. Zastupljenost abortusa uzrokovanih sa *Coxiella burnetii* prema našim rezultatima iznosi 4,4%. Prema Agerholm-u (2013), stopa abortusa uzrokovanih sa *Coxiella burnetii* korespondira sa nekim oportunističkim uzročnicima abortusa (*Arcanobacterium pyogenes*, *Staphylococcus spp.*, gljivice). Niža stopa abortusa uzrokovanih sa *Coxiella burnetii* može se objasniti činjenicom da infekcija krava sa *Coxiella burnetii* ima više mogućih ishoda tako da pojava abortusa nije nužna (Agerholm, 2013). Šmalenberg virus je otkriven tokom 2011. godine u Nemačkoj (Bilk i sar., 2012) i ubrzo se proširio u mnoge zemlje Evrope izazivajući pobačaje. U našem radu, nismo dokazali prisustvo genoma Šmalenberg virusa ni u jednom uzorku. Možemo predpostaviti da ćemo u periodu koji sledi dokazati Šmalenberg virus kao uzrok pobačaja obzirom da je već dokazan u regionu (Toplak i sar., 2013).

Utvrđivanje uzroka abortusa nije jednostavno i često je veoma mukotrpno i neproduktivno jer u velikom broju slučajeva nije moguće odrediti uzrok pobačaja (Augustine, 2000). Procenat uspešnosti postavljanja egzaktno dijagnoze pobačaja varira i zavisi od geografske regije, načina držanja goveda, opremljenosti dijagnostičke laboratorije i savesnog rada veterinarske službe na farmi. Augustine (2000) navodi da se egzaktna dijagnoza može postaviti u oko 30% slučajeva abortusa. Prema Murray (2006), uspešno postavljanje dijagnoze je bilo moguće u svega 17% slučajeva. Anderson i sar. (1990) su uzrok abortusa uspeli da otkriju u 29,5% a Agerholm i sar. (1997) u 33% slučajeva. Prema našim rezultatima, uzrok pobačaja je ustanovljen u 33,5% slučajeva što predstavlja dobar rezultat obzirom da je uzeta u obzir samo jedna dijagnostička metoda (PCR). Na osnovu toga, može se smatrati da kontagiozni infektivni uzročnici imaju značajnu ulogu kao abortogeni agensi na farmama PKB korporacije. Sigurno da bi procenat uspešno postavljene dijagnoze pobačaja u našem ispitivanju bio bolji ukoliko bi bili uzeti u obzir i rezultati bakterioloških ispitivanja.

Zaključak

Na osnovu analiziranih uzoraka može se zaključiti da su kontagiozni infektivni uzročnici pobačaja prisutni u značajnoj meri na farmama mlečnih goveda PKB korporacije. Najzastupljeniji agensi su *Neospora caninum* i BVD virus. U cilju povećanja broja uspešno dijagnostikovanih slučajeva neophodna je saradnja između veterinarskih službi farmi, ministarstva i dijagnostičkih centara. Korigovanjem biosigurnosnih mera na farmama, redovnim i temeljnim dijagnostičkim ispitivanjima uz primenu specifičnih programa, moguće je smanjiti prevalenciju pojedinih uzročnika pobačaja dok je neke moguće i iskoreniti.

Literatura

1. Agerholm, J., Willadsen, C., Nielsen, T., Giese, S., Holm, E., Jensen, L., Agger, J. (1997): Diagnostic studies of abortion in Danish dairy herds, *Journal of veterinary medicine*, 44, 551-558.
2. Agerholm, J. (2013): *Coxiella burnetii* associated reproductive disorders in domestic animals – a critical review, *Acta veterinaria Scandinavica*, 55, 1-13.
3. Anderson, M., Blanchard, P., Barr, B., Hoffman, R. (1990): A survey of causes of bovine abortion occurring in the San Joaquin Valley, California, *Journal of veterinary diagnostic investigation*, 2, 283-287.
4. Augustine, P. (2000): Abortions in dairy cows: New insights and economic impact, *Advances in Dairy Technology*, 12, 233-244.
5. Berri, M., Laroucau, K., Rodolakis, A. (2000): The detection of *Coxiella burnetii* from ovine genital swabs, milk and fecal samples by the use of a single touchdown polymerase chain reaction, *Veterinary microbiology*, 72, 285-293.
6. Bilk, S., Schulze, C., Fischer, M., Beer, M., Hlinak, A., Hoffman, B. (2012): Organ distribution of Schmallenberg virus RNA in malformed newborns, *Veterinary microbiology*, 159, 236-238.
7. Cvetojević, Đ., Kureljušić, B., Jezdimirović, N., Radanović, O., Jakić Dimić, D., Veljović, Lj., Ivetić, V. (2013): Primena PCR metode u dijagnostici pobačaja kod goveda uzrokovanih sa *Neospora caninum*, *Zbornik radova Naučni simpozijum „Reprodukcija domaćih životinja“*, Divčibare, 179-180.
8. Daniel, G. M., Marley, M. (2008): Infectious causes of embryonic and fetal mortality, *Theriogenology*, 70(3), 270-285.
9. Dubey, J., Scharles, G., (2006): Diagnosis of bovine neosporosis, *Veterinary parasitology*, 140, 1-34.
10. Ellis, J., McMillan, D., Ryce, C., Payne, S., Atkinson, R., Harper, P. (1999): Development of a singletube nested polymerase chain reaction for the detection of *Neospora caninum* DNA, *International journal of parasitology*, 29, 1589-1596.
11. Miller, R. (1977): A summary of some of the pathogenetic mechanisms involved in bovine abortions, *The Canadian veterinary journal*, 18(4), 87-95.
12. Murray, R. (2006): Practical approach to infectious bovine abortion diagnosis, XXIV World buiatrics congress, Nice, France.
13. Ramneek, D., Maiti, N., Oberoi, M. (2005): Detection of bovine herpesvirus-1 infection in breeding bull semen by virus isolation and polymerase chain reaction, *Scientific and Technical Review of the Office International des Epizooties (Paris)*, 24(3), 1085-1094.
14. Sager, H., Fischer, I., Furrer, K., Strasser, M., Waldvogel, A., Boerlin, P., Audige, L., Gottstein B., (2001) A Swiss case-control study to assess *Neospora caninum*-associated bovine abortions by PCR, histopathology and serology, *Veterinary parasitology*, 102, 1-15.
15. Toplak, I., Starič, J., Cociancich, V., Rihtarič, D., Tomislav, P. (2013): The first evidence of Schmallenberg virus infections in Slovenia: Detection of antibodies in cattle since august 2012, *Congress proceedings, XIII Middle European buiatric congress*, Belgrade.

16. *Vuković, D., Perković, S.* (2012): Veštačko osemenjavanje, plodnost i neplodnost goveda, Naučna KMD, Beograd.
17. *Weinstock, D., Bhudevi, B., Castro, A.* (2001): Single-tube single-enzyme reverse transcriptase PCR assay for detection of bovine viral diarrhoea virus in pooled bovine serum, *Journal of clinical microbiology*, 39(1), 343-346.
18. *Yaeger, M.* (1993): Cattle abortions – Causes and prevention, Proceedings, The range beef cow symposium, Cheyenne, paper 219.
19. *Youngquist, R., Threlfall, W.*, (2007): Current therapy in large animal theriogenology, Second edition, Saunders, Missouri.

UDC: 636.082.454+616.33
Professional paper

CATTLE ABORTIONS CAUSED BY CONTAGIOUS INFECTIOUS AGENTS ON PKB CORPORATION'S FARMS DURING 2014

D. Cvetojević, B. Savić, S. Stanojević, B. Kureljušić, N. Jezdimirović, S. Bojković-Kovačević, M. Pavlović, M. Katić, D. Jakić Dimić*

Summary

Abortions represents significant problem in modern cattle husbandry because they directly and indirectly affects profit from production. Abortions in cattle can be caused by infectious (viruses, bacteria, protozoa, fungi) or non-infectious agents. Infectious agents can have beside their abortive effect other organ pathology which additionally compromise health of animal and also production. Also, some causative agents are zoonotic.

This paper represents results from diagnostic examination of samples from cows which aborted on PKB farms during 2014. By polymerase chain reaction (PCR), we investigated presence of genom of BVD virus, IBR virus, Schmallerberg virus, *Neospora caninum* and *Coxiella burnetii*. Samples (fetus, placenta, swabs) from 137 cows which aborted were examined and 46 cows (33,5%) were positive on some of causative agents. Presence of one of pathogens was detected in 43 cows (31,4%), while samples from 3 cows (2,2%) were positive for two pathogens simultaneously. According to this results, the most common agents were *Neospora caninum* and BVD virus which were detected in 23 (16,8%) and 19 (13,8%) cows, respectively. *Coxiella burnetii* was proven in 6 cows (4,4%), IBR virus in one, while presence of Schmallerberg virus was not detected in any cow.

Current results suggests that contagious abortive agents are present significantly on PKB corporation farms. Tight cooperation between veterinary service and diagnostic laboratory is necessary for their control and detection.

Keywords: abortion, cow, PCR, PKB.

* Đorđe Cvetojević, BVM, research assistant; Ph.D. Božidar Savić, research associate; M.Sc. Slobodan Stanojević, research assistant; Ph.D. Branislav Kureljušić, research associate; Nemanja Jezdimirović, BVM, research assistant; Scientific institute of veterinary medicine of Serbia, Belgrade, Republic of Serbia. Slavica Bojković-Kovačević, BVM; PKB Veterinary Station, Belgrade, Republic of Serbia. Ph.D. Miloš Pavlović, associate professor; University of Belgrade, Faculty of Veterinary Medicine; Belgrade, Republic of Serbia. Marko Katić, BVM; PKB Veterinary Station, Belgrade, Republic of Serbia. Ph.D. Dobrila Jakić Dimić, principal research fellow; Scientific institute of veterinary medicine of Serbia, Belgrade, Republic of Serbia.

E-mail of the first author: jaffvet@gmail.com. This paper was funded by projects of Ministry of education, science and technological development TR 31062 and III 46009.