

ORIGINALNI RAD – ORIGINAL PAPER

DOI: 10.2298/VETGL1104179P

UDK 636.2.09:616.982.21

**PARATUBERKULOZA U ZAPATU KRAVA RASE CRVENI
HOLŠTAJN***
*PARATUBERCULOSIS IN BREEDING STOCK OF RED HOLSTEIN
COWS*

R. Prodanović, I. Vujanac, Danijela Kirovski, V. Ivetić, B. Savić,
M. Žutić, B. Kureljušić, O. Radanović**

U ovom radu opisana je paratuberkuloza u izolovanom zapatu od 25 visokomlečnih krava rase crveni holštajn. Životinje u zapatu su klinički pregledane, a zatim podvrgnute testu kasne preosetljivosti i ispitivanju krvnog seruma na prisustvo specifičnih antitela protiv Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis (Map). Kliničkim pregledom kod dve životinje uočeni su simptomi bolesti koji su ukazivali na uznapredovali stadijum paratuberkuloze. U krvi krava koje su pokazivale kliničke znake bolesti određivani su parametri crvene i bele krvne slike, koncentracija ukupnih proteina, albumina, gvožđa, natrijuma, kalijuma i aktivnost kreatin kinaze. Analizom parametara crvene krvne slike utvrđena su izvesna odstupanja koja su ukazivala na postojanje hipohromne mikrocitne anemije. Broj leukocita je bio u okviru fizioloških vrednosti, ali je neutrofilno-limfocitni količnik bio narušen i iznosio skoro 1:1. Rezultati biohemijskih analiza krvnog seruma obolelih krava ukazali su na hipo-proteinemiju, hipoalbuminemiju, hipoferemiju, hiponatremiju, hipokalemiju i povećanu aktivnost enzima kreatin kinaze. Sumnjiva reakcija na mestu aplikacije avijarnog tuberkulina je ustanovljena kod dve životinje. Životinje sa kliničkim znakovima bolesti su bile negativne na test kasne preosetljivosti. Prisustvo specifičnih antitela protiv uzročnika paratuberkuloze dokazano je kod četiri životinje (16%), uključujući dve životinje sa kliničkim znakovima bolesti i jednu koja je imala sumnjivu reakciju na mestu aplikacija avijarnog tuberkulina. Pored toga, kod jedne uginule životinje opisane su makroskopske i mikroskopske promene u

* Rad primljen za štampu 16. 05. 2011. godine

** Radiša Prodanović, dr vet. med., istraživač saradnik, Naučni institut za veterinarstvo Srbije, Beograd; dr sci. med. vet. Ivan Vujanac, asistent, Katedra za bolesti papkara, dr sci. med. vet. Danijela Kirovski, docent, Katedra za fiziologiju i biohemiju, Fakultet veterinarske medicine, Beograd; dr sci. med. vet. Vojin Ivetić, viši naučni saradnik, dr sci. med. vet. Božidar Savić, istraživač saradnik, dr sci. med. vet. Milenko Žutić, naučni saradnik, Branislav Kureljušić, dr. vet. med., istraživač pripravnik, mr sci. med. vet. Oliver Radanović, istraživač saradnik, Naučni institut za veterinarstvo Srbije, Beograd

odnosu na intenzitet i distribuciju lezija, tip ćelijskog infiltrata i broja prisutnih acidorezistentnih bakterija, a promene su okarakterisane kao difuzne promene multibacilarnog tipa. Iz promenjenih organa izvršena je izolacija uzročnika bovine paratuberkuloze.

Ključne reči: krava, paratuberkuloza, Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis

Uvod / Introduction

Paratuberkuloza ili Džonova bolest je hronična, neizlečiva, infektivna bolest koju uzrokuje bakterija *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* (*Map*). Od ranije je poznato da je paratuberkuloza iscrpljujuća crevna bolest goveda, pseudotuberkulozni enteritis i/ili terminalni ileitis (Manning i Collins, 2010). Oboljenje se javlja kod domaćih i divljih preživara, ali su opisani slučajevi prirodne infekcije i kod konja, svinja, pasa, lisica, zečeva, kuna, lasica i primata (Manning i Collins, 2010; Hutchings i sar., 2010). Karakteriše se povremenim do stalnim prolivom, smanjenjem proizvodnje mleka, postepenim gubitkom telesne mase i na kraju uginućem. Osnov makroskopskih promena čini hronični granulomatozni enteritis, limfangitis i limfadenitis mezenterijalnih limfnih sudova i limfnih čvorova. *Map*, mali (0,5x1,5 µm) intracelularni, acidorezistentan, slabo gram-pozitivan bacil, izdvojen je (kulturelno i PCR metodom) i kod bolesnika sa Kronovom bolešću. Međutim, postoje velike protivurečnosti o patogenetskom značenju takvih nalaza (Sharp, 1997; Herman-Taylor, 1998).

Uzročnik se u zapat unosi najčešće kupovinom latentno inficiranih grla ili kliconoša, koje izlučuju *Map*, pre svega fecesom, i do 18 meseci pre pojave prvih simptoma bolesti. Smatra se da se većina goveda inficira kao mlada telad. Ulazna vrata infekcije su digestivni organi (ileum), a opisane su i diaplacentarne infekcije, kao i infekcije putem zaraženih bikova (Ayele i sar., 2004). Dosadašnja iskustva pokazala su da su mlade životinje osetljivije na infekciju, a da su posebno prijemčiva telad u prvih 30 dana života. Ipak, aktivno kliconoštvo i pojava kliničkih simptoma paratuberkuloze retko se javljaju pre uzrasta od 18 meseci, a najčešće značajno kasnije, u uzrastu od 2 do 5 godina. Međutim, iako ređe, bolest može da se ispolji i ako infekcija nastane kod odraslih jedinki. Pri tome, poseban značaj se pridaje predisponirajućim činiocima, kao što je deficitarna ishrana, visoka proizvodnja mleka, bolesti metabolizma, stres, veličina infektivne doze i imunosupresivni agensi (Ayele i sar, 2001).

Gonzalez i sar. (2005) su dokazali postojanje različitih tipova patomorfoloških promena kod paratuberkuloze goveda. Do tada je kod goveda neopisana fokalna forma bolesti, uglavnom na limfnim čvorovima, potvrdila opravdanost kriterijuma prethodno primenjenih za opis promena kod malih preživara. Međutim, za razliku od ovaca, veći spektar lezija kod goveda, a naročito razvoj difuzne

intermedijarne forme, ukazuje na to da su kod goveda patomorfološke promene manje konzistentne. Smatra se da razlike u lokalnom imunskom odgovoru u različitim segmentima creva kod goveda (Begara-McGorum i sar., 1998), kao i uočene razlike u morfologiji ćelijske populacije u Pajerovim pločama između ovaca i goveda (Pastoret i sar., 1998), mogu da utiču na tip i mesto patomorfoloških promena kod preživara. Takođe, smatra se da i razlike u sojevima *Map* koje postoje između ovaca i goveda mogu da budu značajne (Clark, 1997). Ipak, nejasno je da li ove razlike u tipovima patomorfoloških promena, naročito difuznih lezija, predstavljaju prelaznu ili divergentnu formu paratuberkuloze (Gonzalez i sar., 2005).

Iako je poznata više od 100 godina, i na našim prostorima opisana od strane Vukovića još 1908. godine (Heinrich, 1962), u našoj stručnoj literaturi nema mnogo dokumentovanih podataka o ovoj bolesti (Radojčević i sar., 1961; Jovanović i sar., 1999). Nedovoljna rasvetljenost, i u nekim pojedinostima još uvek nepoznata imunopatogeneza, mnoštvo različitih ograničenja u postavljanju dijagnoze i kontrole ove bolesti čine da paratuberkuloza uporno opstaje u zapatima goveda. Tome u značajnoj meri doprinosi otpornost *Map*, zahvaljujući specifičnoj građi svog ćelijskog zida, na dejstvo spoljašnjih faktora, uključujući i mnogobrojne dezinficijense. S toga se danas sa pravom smatra da je paratuberkuloza veoma raširena i da u velikoj meri ekonomski opterećuje mlečno govedarstvo (Chiodini, 1996). Veliki broj istraživanja koja su imala za cilj da se utvrdi raširenost ove infekcije pokazao je da je, osim u Švedskoj (Engvall i sar., 1994; Herthnek, 2006) i nekim delovima Australije (Kennedy i Allworth, 2000), u manjem ili većem procentu, prisutna u većini zemalja. Rezultati ispitivanja raširenosti paratuberkuloze u našoj zemlji iz šezdesetih godina prošloga veka (Radojčević i sar., 1961) imaju relativan značaj, zbog toga što su ispitivanja vršena samo tamo gde je postojala sumnja na paratuberkulozu. U jednom takvom ispitivanju od 1240 uzoraka krvi u reakciji vezivanja komplementa pozitivna reakcija je ustanovljena u 12,4% slučajeva. U novijim ispitivanjima sprovedenim na području Južnobačkog okruga, ELISA metodom ustanovljeno je prisustvo specifičnih antitela protiv uzročnika paratuberkuloze u 5,5% ispitanih goveda (Vidić i sar., 2001).

U ovom radu opisana je paratuberkuloza u zapatu visokomlečnih krava rase crveni holštajn. Klinička slika, hematološke i biohemijske promene u krvi krava, rezultati testa kasne preosetljivosti i serološkog ispitivanja su izloženi. Pored toga, kod jedne uginule životinje makroskopske i mikroskopske promene opisane su u odnosu na intenzitet i distribuciju lezija, tip ćelijskog infiltrata i broja prisutnih acidorezistentnih bakterija, a iz delova promenjenih organa izvršena je izolacija uzročnika bovine paratuberkuloze (*Map*).

Materijal i metode rada / *Material and methods*

Ispitivanjem je obuhvaćen izolovani zapat goveda od 25 visokomlečnih krava rase crveni holštajn. Unutar zapata, dve životinje progresivno su

gubile u telesnoj masi i znatno smanjile proizvodnju mleka, uprkos relativno očuvanom apetitu. Obolele životinje bile su u uzrastu od 3 godine i vodile poreklo od grla uvezenih iz Češke i Mađarske. Progresivno mršavljenje bilo je praćeno upornim i neizlečivim prolivom posle primenjene terapije (antibiotici i antihelmintici). Uvidom u evidenciju o zdravstvenom stanju životinja, moglo se videti da su i ranije na farmi bili prisutni poremećaji zdravlja krava praćeni dugotrajnim i iscrpljujućim dijarejama. Krava od koje je potekla zaraza takođe je imala slične simptome.

Sve životinje u zapatu su klinički pregledane, a zatim podvrgnute testu kasne preosetljivosti, intradermalnom aplikacijom avijarnog tuberkulina prema uputstvu proizvođača (*Avitubal, Češka*). Od svih životinja na farmi, punkcijom *vene jugularis* uzeti su uzorci krvi. Krv je nakon uzimanja čuvana na +4°C najduže do 4 sata. Krvni serum je dobijen centrifugiranjem krvi na 3000 obrtaja u trajanju od 15 minuta. Prisustvo specifičnih antitela protiv uzročnika paratuberkuloze određivano je u krvnom serumu ELISA metodom (*Idexx, USA*). Od životinja koje su pokazivale kliničke znake bolesti, uzorci krvi su sačuvani i za hematološke analize a deo je centrifugiran u cilju dobijanja krvnog seruma za biohemiju. Parametri crvene i bele krvne slike određivani su na automatskom hematološkom analizatoru (*Abacus Junior, Francuska*). Koncentracija ukupnih proteina, albumina, gvožđa, natrijuma, kalijuma i aktivnost kreatin kinaze je određivana u uzorcima krvnog seruma na biohemijskom analizatoru (*Secomam, Francuska*).

Mesec dana nakon obavljenog kliničkog pregleda i uzimanja uzoraka krvi jedna obolela krava je uginula. Izvšena je obdukcija uginule jedinke, a tanka i debela creva su dostavljena odeljenju za patološku morfologiju Naučnog instituta za veterinarstvo Srbije iz Beograda. Organi su pregledani makroskopski, a zatim su delovi promenjenih organa (ileum i cekum) fiksirani u 10% neutralnom formalinu i obrađeni standardnom histološkom tehnikom. Kolorizacija tkiva je urađena hematoksilin-eozinom (HE) i metodom po *Ziehl-Neelsen-u*. Pored toga, skarifikati sluznice ileuma i cekuma su obojeni metodom po *Ziehl-Neelsen-u*.

Nakon primarne obrade uzorci su zasejani na Lovenštajn-Jensen podlogu bez mikobaktina i inkubirani u aerobnim uslovima na 37°C tokom 16 nedelja. Jednom nedeljno proveravan je rast kolonija na podlozi. Za identifikaciju izraslih kolonija primenjen je kriterijum preporučen od strane Jorgensena (1982).

Rezultati i diskusija / Results and Discussion

Kliničkim pregledom kod dve životinje uočeni su simptomi bolesti koji su ukazivali na uznapredovali stadijum paratuberkuloze (slika 1 i 2), dok kod ostalih životinja u zapatu nisu uočene nikakve promene. Obolele životinje su bile afebrilne, lošeg opšteg stanja i veoma mršave (kahektične). U kliničkoj slici dominirala je uporna, profuzna dijareja, otok u submandibularnom području, bledilo vidljivih sluzokoža i kože vimena, gruba i nakostrešena dlaka. Feces je bio vodene konzistencije, tamno obojen, sa mehurićima gasa.



Slika 1. Otok u submandibularnom području
Figure 1. Swelling in submandibular area



Slika 2. Obolela krava – kaheksija
Figure 2. Diseased cow - cachexia

Hematološkim analizama je utvrđeno da su neki parametri crvene i bele krvne slike krava odstupali u odnosu na fiziološke vrednosti (tabela 1). Broj eritrocita je bio u okviru referentnih vrednosti, a kod jedne obolele životinje vrednosti za hematokrit i koncentraciju hemoglobina su bile niže od fizioloških. Međutim, zapaža se da je dijametar eritrocita bio smanjen, a i sami eritrociti su slabije punjeni hemoglobinom. To upućuje na nalaz hipohromne mikrocitne anemije. Pored toga, iako je broj leukocita bio u okviru fizioloških vrednosti, uočava se da je narušen normalan neutrofilno-limfocitni količnik, koji je kod obe obolele životinje iznosio skoro 1:1.

Tabela 1. Rezultati ispitivanja hematoloških parametara krvi obolelih krava /
Table 1. Results of examinations of haematological parameters in blood of diseased cows

	Eritrociti / <i>Erythrocytes</i> $\times 10^{12}$	Hb g/dl	Ht %	MCV ft	MCH pg	MCHC g/L	Leukociti / <i>Leukocytes</i> $\times 10^9$
Ref	5-10	10,5 – 14	30 – 40	40-60	14-19	300-360	5-10
1.	6,59	8,2	24,4	37	12,4	330	5,1
2.	8,57	10,6	32,8	38	12,4	323	6,94

Referentne vrednosti preuzete od Baumgartnera (2002).
Reference values according to Baumgartner (2002).

Rezultati biohemijskih analiza krvnog seruma obolelih krava ukazali su na hipoproteinemiju, hipoalbuminemiju, hipoferemiju, hiponatremiju, hipokalemiju i povećanu aktivnost enzima kreatin kinaze (tabela 2). Rezultati hematološkog i biohemijskog ispitivanja krvi obolelih životinja su bili u skladu sa zdravstvenim stanjem i stadijumom bolesti u trenutku kada je obavljen klinički pregled i kada su uzimani uzorci krvi za analizu. Međutim, iako su hematološke i biohemijske promene u krvi životinja obolelih od paratuberkuloze predvidive za poje-

dine stadijume bolesti, one nisu u dovoljnoj meri specifične da bi imale presudan dijagnostički značaj (Fecteau i Whitlock, 2010).

Tabela 2. Rezultati ispitivanja biohemijskih parametara krvi obolelih krava
Table 2. Results of examinations of biochemical parameters in blood of diseased cows

	Ukupni prot. <i>Total proteins</i> g/l	Albumini / <i>Albumins</i> g/l	Fe μ mol/l	Na mmol/l	K mmol/l	Kreatin kinaza / <i>Creatine kinase</i> IU/l
Ref	60-80	30-40	27-40	135-157	6-12	17,4-107
1.	31,1	13,1	11,6	119,3	3,31	356,5
2.	51,8	18,5	8,55	120,5	3,84	280,3

Referentne vrednosti preuzete od Baumgartnera (2002). /
Reference values according to Baumgartner (2002).

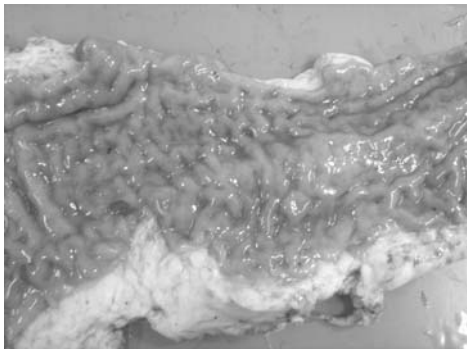
Sedamdeset i dva sata nakon intradermalnog aplikovanja avijarnog tuberkulina izvršeno je očitavanje reakcije. Kod dve životinje ustanovljena je sumnjiva reakcija na mestu aplikacije (zadebljanje kožnog nabora veće od 2, a manje od 4 mm, bez drugih kliničkih simptoma). Zanimljivo je da su životinje sa kliničkim znakovima bolesti bile negativne na test kasne preosetljivosti, dok su kod jedne sumnjive ustanovljena i specifična antitela protiv *Map*.

Slično kao kod tuberkuloze ljudi i goveda, intradermalni test se može primeniti i u dijagnostici paratuberkuloze goveda, pri čemu se kao antigen koristi ekstrakt *M. avium* ili *M. johnei*. Dokazano je da je inicijalni odgovor na mikobakterijske infekcije posredovan Th1 limfocitima (Manning i Collins, 2001), a ćelijski imunski odgovor se smatra i esencijalnim u kontroli progresije *Map* infekcije. Međutim, kako navode Jovanović i Knežević (2005), ovi testovi se nisu pokazali pouzdanim zbog svoje niske specifičnosti i osetljivosti, jer daju veliki broj lažno pozitivnih, a naročito lažno negativnih reakcija u odmaklim stadijumima bolesti. Kao što je pomenuto, imunopatološka osnova ove bolesti je jaka ćelijska imunska reakcija na antigene *Map*, ali se kod obolelih životinja istovremeno pojavljuje smanjena reaktivnost na druge antigene. Takva stanja su izraženija u odmaklim stadijumima bolesti, a pored poremećene transformacije limfocita koja se može dokazati *in vitro*, goveda koja boluju od paratuberkuloze slabije reaguju i na tuberkuline. Čini se da u takvim okolnostima presudnu ulogu u ometanju normalne ćelijske reaktivnosti, kako navodi Tizard (2009), imaju imunosupresivni faktori u krvnom serumu obolelih životinja.

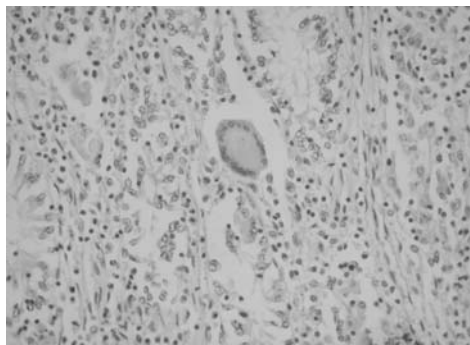
U uzorcima krvnih seruma ispitivanih životinja dokazano je postojanje specifičnih antitela protiv uzročnika paratuberkuloze kod četiri životinje (16%), uključujući životinje sa kliničkim znakovima bolesti. Međutim, ako se uzme u obzir osetljivost i specifičnost upotrebljenog ELISA testa, možemo pretpostaviti da je broj inficiranih u ispitivanom zapatu znatno veći. Naime, Collins i Morgan (1991) smatraju da procenat inficiranih životinja u zapatu, potvrđenih ELISA testom, treba

udvostručiti kako bi se dobila procena stvarne prevalencije paratuberkuloze. Takođe, dokazano je da je osetljivost ELISA testa u vezi sa stadijumom bolesti i količinom *Map* u fecesu (Sweneey i sar., 1995; McKenna i sar., 2005). Navedeni autori su pokazali da je kod izlučivanja malih količina *Map* u fecesu, osetljivost ELISA testa iznosila svega 15 procenata, dok je kod životinja sa kliničkim znakovima paratuberkuloze osetljivost bila 87 procenata. Uopšteno uzevši, ELISA je pouzdan test za kontrolu zapata, dok je u pojedinačnim slučajevima za potvrdu neophodna i izolacija uzročnika (Jovanović i sar., 2005).

Makroskopskim pregledom dostavljenih organa utvrđene su dominantne promene na terminalnom delu tankih creva, pre svega na ileumu (slika 3). Promene su obuhvatale zadebljanje zida creva, proširenje i zadebljanje supseroznih limfnih sudova, povećanje ileocekalne tonzile. Nabori sluznice ileuma, u vidu gusto zbijenih i isprepletenih vijuga, bili su veoma izraženi. Opisane promene uočene su i na cekumu, ali su bile znatno slabijeg intenziteta. Na ostalim delovima tankih i debelih creva nisu uočene makroskopski vidljive promene. Najintenzivnije mikroskopske promene ustanovljene su takođe u ileumu (slika 4). Sastojale su se u infiltraciji lamine proprije i submukoze makrofagima, epiteloidnim ćelijama varijabilnih morfoloških svojstava i retkim eozinofilima. U ćelijskom infiltratu ne retko su se mogli zapaziti i limfociti i multinuklearne Langhansove ćelije. Inače crevni epitel je bio sa fenomenima atrofije i fuzije zadebljalih crevnih resica. U nekim isečcima mononuklearni infiltrat se uočavao uglavnom u telu crevnih resica koje nisu bile fuzionisane, dok je u nekim inflamatorni proces detektovan i u mišićnom sloju crevnog zida. Pored toga, multifokalni mononuklearni infiltrati su uočeni i u tunici serozi u neposrednoj blizini limfnih sudova uzrokujući njihovu inflamaciju (*limfangitis*). Opisane patomorfološke promene uporedive su sa difuznim lezijama multibacilarnog tipa saopštenih od strane većeg broja autora (Huda i Jensen, 2003; Gonzalez i sar., 2005).



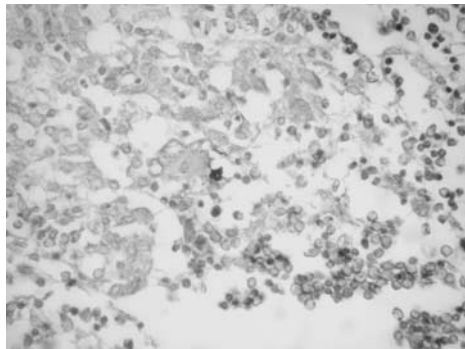
Slika 3. Ileum krave-jasno izraženi nabori sluznice /
Figure 3. Cow ileum – clearly expressed folds in mucosa



Slika 4. Proprija ileuma krave-celularni infiltrat sa Langhansovim gigantocitima, He x 400

Figure 4. Cow ileum propria – cellular infiltrate with Langerhans giantocytes, He x 400

U histološkim preparatima bojenim po Cil-Nilsonu u citoplazmi makrofaga su uočeni brojni acidorezistentni štapićasti oblici (slika 5). U mikroskopskom preparatu pripremljenom od skarifikata sluznice ileuma i cekuma i obojenom po Cil-Nilsonu ustanovljeno je prisustvo acidorezistentnih štapića u manjim grupama. Nakon 7 nedelja kultivacije, iz skarifikata promenjenih delova tankih creva, zapažen je disgoničan rast u vidu sitnih okruglih nepigmentisanih kolonija. U preparatu urađenom iz kolonija obojenom po Cil-Nilsonuuu dokazani su acidorezistentni kratki štapići.



Slika 5. Acidorezistentni štapići fagocitovani u makrofagima, ZN x 1000 /
Figure 5. Acid-resistant rods phagocytosed in macrophages, ZN x 1000

Prema Fecteau i Whitlocku (2010), goveda u stadima obolelim od paratuberkuloze mogu se svrstati u jednu od pet kategorija: neinficirana, životinje u tihoj, supkliničkoj, kliničkoj i odmakloj kliničkoj fazi bolesti. Različiti stadijumi bolesti razlikuju se prema jačini ispoljenih kliničkih znakova, potencijalnom izlučivanju *Map* u okolinu i mogućnostima kojima se bolest može otkriti. Opšte je prihvaćeno da na jednu životinju u odmakloj kliničkoj fazi bolesti dolazi oko 25 inficiranih, pri čemu će prema navodima Whitlocka i sar. (2009) trenutno dostupnim dijagnostičkim metodama biti otkriveno 15 do 25 posto. Čini se da presudan uticaj na to hoće li se i u kojoj meri razviti kod životinja klinički znakovi bolesti ima uzrast u vreme inficiranja (Chiodini i sar., 1984).

Zaključak / Conclusion

Rezultati ispitivanja su pokazali da obolele životinje u zapatu u kome se pojavljuje paratuberkuloza klinički ispoljavaju uporan i nezaustavljiv proliv i progresivno mršavljenje. Laboratorijska ispitivanja i alergijski testovi mogu da posluže kao dopunski dijagnostički postupci. Konačna dijagnoza se postavlja na osnovu patološko-anatomskog i bakteriološkog nalaza.

Morfološkim i kulturelnim karakteristikama izolovani acidorezistentni štapići odgovaraju za rod *Mycobacterium*, i u sklopu celokupnog nalaza upućuju na bovinu paratuberkulozu. Na osnovu intenziteta i distribucije lezija, kao i tipa ćelijskog infiltrata i broja prisutnih acidorezistentnih bakterija, makroskopske i mikroskopske promene mogu se okarakterisati kao difuzne promene multibacilarnog tipa.

NAPOMENA / ACKNOWLEDGEMENT:

Rad je podržan sredstvima projekta III 46002 iz programa integrisanih i interdisciplinarnih istraživanja finansiranog od strane Ministarstva nauke Republike Srbije.

The work was supported with funds from project III 46002 from the programme of integrated and interdisciplinary research financed by the Ministry for Science of the Republic of Serbia.

Literatura / References

1. Ayele WY, Bartos M, Svastova P, Pavlik I. Distribution of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* in organs of naturally infected bull-calves and breeding bulls. *Vet Microbiol* 2004; 15, 103(3-4): 209-17.
2. Ayele WY, Machackova M, Pavlik I. The transmission and impact of paratuberculosis infection in domestic and wild ruminants. *Vet Med-Czech* 2001; 46: 205-24.
3. Baumgartner W. Klinische Propädeutik der inneren Krankheiten und Hautkrankheiten der Haus- und Heimtiere, 5. aktualisierte Auflage, Berlin: Parey Buchverlag, 2002.
4. Begara-McGorum I, Wildblood LA, Clarke CJ, Sharp JM, Jones DG. Early immunopathological events in experimental ovine paratuberculosis. *Vet Immunol Immunopath* 1998; 65: 4869-72.
5. Chiodini RJ, van Kruiningen JH, Merkal SR. Ruminant paratuberculosis (Johne's disease): The current status and future prospects. *Cornell Vet* 1984; 74: 218-22.
6. Chiodini RJ. Immunology resistance to paratuberculosis. *Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice* 1996; 12: 313-43.
7. Clarke CJ. The pathology and pathogenesis of paratuberculosis in ruminants and other species. *J Comp Path* 1997; 116: 217-61.
8. Collins MT, Morgan IR. Economic decision analysis model of a paratuberculosis test and cull program. *JAVMA* 1991; 199: 1724-9.
9. Engvall A, Larsson B, Bolske G, Wahlsotron H. Swedish livestock is considered free from paratuberculosis. *Proceedings of the 4th International Coloquium on Paratuberculosis*. St. Johne's College, Cambridge, U.K, 1994: 27-31.
10. Fecteau Marie-Eve, Whitlock R H. Paratuberculosis in cattle. In: Marcel A Behr and Desmond M Collins, editors. *Paratuberculosis: organism, disease, control*, Preston: AMA Dataset, 2010: 144-56.
11. Gelberg BH. Intestinal Diseases in Ruminants. In: McGavin MD, Zachary FJ editors. *Pathologic Basis Veterinary Disease*. St. Louis: Mosby Elsevier, 2008: 372-4.
12. Gonzalez J, Geijo VM, Garcia-Pariente C, Verna A, Corpa MJ, Reyes EL, Ferreras CM, Juste AR, Garcia Marin FJ, Perez V. Histopathological Classification of Lesions associated with Natural Paratuberculosis Infection in Cattle. *J Comp Path* 2005; 133: 184-96.
13. Heinrich B. *Lehrbuch der Schafkrankheiten*. Berlin und Hamburg: Paul Parex, 1962.

14. Herthnek D. Detection and confirmation of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in clinical samples. Licentiate thesis, Swedish University of Agricultural Sciences, 2006.
15. Huda A, Jensen HE. Comparasion of histopathology, cultivation of tissues and rectal contents, and interferon-gamma and serum antibody responses for the diagnosis of bovine paratuberculosis. *J Comp Path* 2003; 129: 259-67.
16. Hutchings RM, Stevenson K, Greig A, Davidson SR, Marion G, Judge J. Infection of Non-ruminant Wildlife by *Mycobacterium avium* subsp. Paratuberculosis. In: Marcel A Behr and Desmond M Collins, editors. Paratuberculosis: organism, disease, control, Preston: AMA Dataset, 2010: 188-200.
17. Jorgensen JB. An improved medium for the culture of *Mycobacterium paratuberculosis* from faeces. *Acta Vet Scand* 1982; 23: 325-35.
18. Jovanović M, Knežević M, Merćep D. First diagnosis of sheep paratuberculosis in Serbia. *Acta Veterinaria* 1999; 49(1): 51-61.
19. Jovanović M, Knežević M. Paratuberkuloza (Johnova bolest) – osnovne karakteristike i stanje u našoj zemlji. *Vet Glasnik* 2005; 59(5-6): 507-19.
20. Kennedy DJ, Allworth MB. Progress in national control and assurance programs for bovine Johne's disease in Australia. *Vet Microbiol* 2000; 77: 443-51.
21. Manning EJ, Collins MT. *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis: pathogen, pathogenesis and diagnosis. *Revue Scientifique et Technique* 2001; 20, 133-50.
22. Manning EJ, Collins MT. Epidemiology of Paratuberculosis. In: Marcel A Behr and Desmond M Collins, editors. Paratuberculosis: organism, disease, control, Preston: AMA Dataset, 2010, 22-8.
23. Manning EJ, Collins TM. History of Paratuberculosis. In: Marcel A Behr and Desmond M Collins, editors. Paratuberculosis: organism, disease, control, Preston: AMA Dataset, 2010: 1-9.
24. McKenna SL, Keefe GP, Barkema HW, Sockett DC. Evaluation of three ELISAs for *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis using tissue and fecal culture as comparison standards. *Vet Microbiol* 2005; 110: 105-11.
25. Pastoret PP, Griebel P, bazin H, Govaerts A. Handbook of Veterinary Immunology. London: Academic Press, 1998.
26. Radojčević M, Mihajlović B, Knežević N, Otenhajmer I, Paunović M. Paratuberkuloza goveda. *Vet. glasnik* 1961; 11: 927-30.
27. Sharp JM. Johne's disease: risk of the interspecies transmission. *Fra. Praktis* 1997; 2, 1-5.
28. Sweeney RW, Whitlock RH, Buckley CL, Spencer PA. Evaluation of a commercial enzyme linked immunosorbent assay for the diagnosis of paratuberculosis in dairy cattle. *JVDI* 1995; 7: 488-93.
29. Tizard RI. Secondary Immunological Defects. In: Veterinary Immunology. Texas: Mosby Elsevier, 2009: 464.
30. Vidić B, Grgić Ž, Bjelajac B, Trkulja R. Ispitivanje rasprostranjenosti paratuberkuloze kod goveda i ovaca. *Vet glasnik* 2001; 55(1-2): 9-16.
31. Whitlock RH. Johne's disease. In: Smith BP, editor. Large Animal Internal Medicine. St Louis: Mosby Elsevier, 2009, 881-7.

ENGLISH

PARATUBERCULOSIS IN BREEDING STOCK OF RED HOLSTEIN COWS

R. Prodanović, I. Vujanac, Danijela Kirovski, V. Ivetić, B. Savić, M. Žuitić,
B. Kureljušić, O. Radanović

This paper describes paratuberculosis in an isolated breeding herd of 25 high-yield dairy cows of the Red Holstein breed. The animals were examined clinically and then given the test for delayed type hypersensitivity and their blood serum was examined for the presence of specific antibodies against *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* (Map). The clinical examination revealed that two cows exhibited symptoms of the disease that indicated an advanced stage of paratuberculosis. The following parameters were examined in the blood of the cows that showed clinical signs of the disease: leukocytes and erythrocytes count, concentrations of total proteins, albumin, iron, sodium, potassium, and activity of creatine kinase. The analysis of the red blood cell count revealed certain digressions that indicated the existence of hypochromic microcytic anaemia. The number of leukocytes was within the physiological values, but the neutrophil-lymphocyte ratio was disrupted and stood at almost 1:1. The results of the biochemical analyses of the blood serum of diseased cows indicated hypoproteinaemia, hypoalbuminaemia, hypoferrremia, hyposodiamaemia, hypokalemia, and increased activities of creatine kinase enzymes. A suspect reaction on the site of application of avian tuberculin was determined in two animals. Animals with clinical signs of the disease reacted negative to the test of delayed type hypersensitivity. The presence of specific antibodies against the cause of paratuberculosis was proven in four animals (16%), including two animals with clinical signs of the disease and one that had a suspect reaction on the site of application of avian tuberculin. Furthermore, one animal that died exhibited macroscopic and microscopic changes regarding the intensity and distribution of lesions, the type of cellular infiltrate, and the number of present acid-resistant bacteria, and the changes were characterized as diffuse changes of multibacillary type. The cause of bovine paratuberculosis was isolated from the altered organs.

Key words: cow, paratuberculosis, *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*

РУССКИЙ

ПАРАТУБЕРКУЛЁЗ В ПЛЕМЕННОМ ПРИПЛОДЕ КОРОВ ПОРОДЫ КРАСНЫЙ ХОЛШТАЙН

Р. Проданович, И. Вуянац, Даниела Кировски, В. Иветич, Б. Савич, М. Жутич,
Б. Курелюшич, О. Раданович

В этой работе описан паратуберкулёз в изолированном племенном приплоде от 25 высоко-молочных коров породы красный холштайн. Животные в племенном приплоде клинически осмотрены, а затем подвергнуты тесту поздней чрезмерной чувствительности и испытанию кровяного сыворотки на присутствие специфических антител против *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* (Map). Клиническим осмотром у двух животных замечены симптомы болезни, указавшие на продвиганную стадию паратуберкулёза. В крови коров, показывающие клиничес-

кие знаки болезни определяются параметры красной и белой кровяной картины, концентрация совокупных протеинов, альбуминов, железа, натрия, калия и активность креатин киназы. Анализом параметров красной кровяной картины утверждены известные отступления указавшие на существование гипохромовой микроцитарной анемии. Число лейкоцитов было в рамках физиологических стоимостей, но нейтрофильно-лимфоцитное количество было нарушено и составляло (в сумме) почти 1:1. Результаты биохимических анализов кровяного серума зболевших коров указали на гипопропротеинемию, гипоальбуминемию, гипоальбуминемию, гипоферремию, гипонатремию, гипокалемию и увеличенную активность креатин киназа. Сомнительная реакция на месте аппликации птичьего туберкулина установлена у двух животных. Животные с клиническими знаками болезни были отрицательными на тест поздней чрезмерной чувствительности. Присутствие специфических антител против возбудителя паратуберкулёза доказано у четырёх животных (16%), включая двух животных с клиническими знаками болезни и одно, имевшее сомнительную реакцию на месте аппликаций птичьего туберкулина. При этом, у одного околывшего животного описаны макроскопические и микроскопические изменения в отношении интенсивности и дистрибуцию повреждений, тип клеточного инфильтрата и числа присутствующих ацидорезистентных бактерий, а изменения охарактеризованы как диффузные изменения мультибацилярного типа. Из изменённых органов совершена изоляция возбудителя говяжьего паратуберкулёза.

Ключевые слова: корова, паратуберкулёз, *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*