

ORIGINALNI RAD – ORIGINAL PAPER

UDK 636.2.09:616.24-002.153:612.017

**IMUNSKI KOMPLEKSI U KRVNOM SERUMU TELADI SA
KLINIČKIM SIMPTOMIMA BRONHOPNEUMONIJE***
*IMMUNE COMPLEXES IN BLOOD SERUM OF CALVES WITH
CLINICAL SYMPTOMS OF BRONCHOPNEUMONIA*

Natalija Fratrić, D. Gvozdić, Olivera Savić, Ivana Jagličić, Vesna Ilić**

Oboljenja respiratornog trakta goveda su kompleksne etiologije, a javljaju se kao posledica interakcije imunskog sistema jedinke, stresogenih činilaca prisutnih u spoljašnjoj sredini i patogenih mikroorganizama. Nivo i uloga cirkulišućih imunskih kompleksa u serumima teladi obolelih od ove bolesti do sada nisu izučavani. Ovaj rad je urađen sa ciljem da se utvrdi da li su bolesti respiratornog trakta kod teladi u uzrastu od tri meseca praćene promenom nivoa imunskih kompleksa u serumu i promenom nivoa serumskih proteina, pre svega γ globulina, kao osnovnih konstituenata imunskih kompleksa. Imunski kompleksi iz seruma teladi su izolovani precipitacijom polietilen glikolom (PEG-om). Nivo PEG precipitabilnih imunskih kompleksa je određivan merenjem optičke gustine PEG precipitata na 350 nm (OD_{350}). OD_{350} PEG precipitata obolele teladi je iznosila $0,577 \pm 0,206$ i bila je statistički značajno viša ($p < 0,001$) u odnosu na vrednosti dobijene kod zdrave teladi ($OD_{350} = 0,286 \pm 0,080$). U γ -globulinskoj frakciji seruma i PEG precipitata i zdrave i obolele teladi bili su prisutni i spori, katjonski, i brzi, anjonski γ -globulini, ali je koncentracija brzih γ -globulina bila značajno niža kod obolele teladi. Nivo ukupnih γ -globulina i γ -globulinskih frakcija nije statistički značajno korelirao sa nivoom PEG precipitabilnih imunskih kompleksa. Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da se u serumima tri meseca starih teladi obolelih od bolesti respiratornog trakta detektuje povećan nivo PEG precipitabilnih imunskih komplek-

* Rad primljen za štampu 01. 11. 2010. godine

** Dr sci vet. med. Natalija Fratrić, vanredni profesor, dr sci. vet. med. Dragan Gvozdić, redovni profesor, Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu; dr sci. med. Olivera Savić, dr med. Ivana Jagličić, specijalista imunologije, Institut za transfuziju krvi Srbije; dr med. Vesna Ilić, viši naučni saradnik, Institut za medicinska istraživanja Univerziteta u Beogradu, Beograd, Srbija

sa, a rezultati dobijeni ovim relativno jednostavnim testom mogu se koristiti kao dodatni parametar za dijagnozu i praćenje toka bolesti.

Ključne reči: telad, bolesti respiratornog trakta, PEG esej, imunski kompleksi, γ -globulini

Uvod / Introduction

Oboljenja respiratornog trakta goveda su najčešći uzrok morbiditeta i mortaliteta u intenzivnom govedarstvu. Fibroza i gubitak funkcionalnog kapaciteta pluća kod životinja sa preležanom pneumonijom imaju negativan uticaj na prirast, a kod priplodnih grla koja se koriste za obnovu stada produžava se vreme do prvog teljenja. Ova oboljenja su uzrok velikih ekonomskih gubitaka na govedarskim farmama (Ames i sar., 1997; Snowden i sar., 2006), jer smrtnost može da dostigne nivo i od 25% i zajedno sa cenom tretmana obolelih životinja povećava troškove proizvodnje za više od 8%.

Pneumonija teladi je bolest kompleksne etiologije i posledica je interakcije između jedinke, sredine i patogenih mikroorganizama (Van Donkersgoed i sar., 1993). Brojni patogeni su uključeni u izazivanje akutne ili hronične forme pneumonije (virusi: goveđi herpes virus-1 (BHV-1), *Parainfluenza-3* (PI3), *Bovine Respiratory Syntytial Virus* (BRSV), *Bovine Virus Diarrhea* (BVD); mikoplazme; bakterije: *Manheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Histophilus somni*) (Srikumaran i sar., 2007; Czuprynski, 2009). Smatra se da interakcija između virusnih i bakterijskih patogena i njihova obostrana interakcija sa leukocitima i endotelnim i epitelnim ćelijama domaćina uzrokuje snažnu zapaljensku reakciju (fibrinoznu pleuropneumoniju) karakterističnu za oboljenja respiratornog trakta goveda (Czuprynski, 2009). Različiti faktori mogu uticati na prijemčivost teladi prema patogenima koji su uzročnici pneumonije. Istovremeno prisustvo bolesti, stres ili neadekvatan pasivan transfer kolostralnih imunoglobulina G (IgG) (kao posledica nedovoljno kvalitetnog kolostruma) smanjuju mogućnost efikasnog imunskog odgovora. Mešanje teladi različite starosti i različitog porekla u istom prostoru, kao i smeštaj teladi u slabo ventilirane, prenaseljene i vlažne uslove potencira nastajanje respiratornih bolesti. Iako pneumonija kod teladi može da se javi u bilo koje doba godine, najčešće se javlja zimi i u proleće, od oktobra do decembra i od februara do maja.

Razlog za virusno-bakterijski sinergizam u ovoj bolesti nije poznat, kao što u potpunosti nije poznat ni način na koji se imuni sistem teladi (ne)bori protiv ovih patogena. Kod ljudi imunski kompleksi su povišeni u bakterijskim pneumonijama (Korppi i sar., 2008; Holloway i sar., 1993; Mellencamp i sar., 1987) i oni imaju udela u oštećenju tkiva pluća aktivacijom sistema komplementa i neutrofila. Podaci o nivou i sastavu imunskih kompleksa u krvnom serumu teladi sa oboljenjima respiratornih organa su retki (Fratrić i sar., 2010a). Cilj ovog istraživanja bio je da se utvrdi nivo i karakteristike imunskih kompleksa u serumima teladi u uzrastu od tri meseca sa oboljenjem respiratornog trakta u cilju dobijanja dodatnog dijagnostičkog kriterijuma kod ove bolesti.

Materijal i metode rada / *Material and methods*

Za ocenjivanje stanja respiratornog sistema korišćen je respiratorni bodovni (skoring) sistem, sličan onom koji je ustanovio McGuirk SM (2005). Respiratorni skoring sistem se sastoji od kliničkih znakova koji se ocenjuju (kriterijuma): pojava i količina iscetka iz nosa, iscedak iz oka, položaj ušiju, rektalna temperatura, kašalj (spontani ili indukovani), broj respiracija. Svaki od kriterijuma je ocenjivan brojevima od 0 do 3, gde je veća vrednost ukazivala na veću težinu i ozbiljnost bolesti: 0 - normalan; 1 - blag; 2 - umeren; 3 - ozbiljan. Ukupan respiratorni skor se ocenjuje kao normalan ako je manji od 4. Vrednost respiratornog skora od 4 zahteva praćenje životinje, a vrednost viša od 4 zahteva tretman (antibiotcima). U studiju je bilo uključeno 14 teladi uzrasta od tri meseca, sa znacima oboljenja respiratornog trakta, pre početka terapije. Kontrolnu grupu je činilo 11 zdravih teladi iste starosti.

Uzorci krvi su uzimani punkcijom vene jugularis. Serum je izolovan nakon spontane koagulacije krvi na sobnoj temperaturi i centrifugiranja 10 min na 3000 rpm. Krv uzeta sa heparinom kao antikoagulansom je korišćena za određivanje vrednosti hematoloških parametara.

Imunokompleksi (IC) iz seruma zdravih teladi i teladi sa pneumonijom izolovani su precipitacijom polietilen glikolom (PEG-om) (Fratrić i sar., 2006). Nivo imunskih kompleksa određivan je merenjem optičke gustine PEG precipitata na 350 nm (OD_{350}).

U serumima i PEG precipitatima određivana je koncentracija ukupnih proteina BCA esejem (Pierce, SAD).

Elektroforeza u gelu agaroze je izvođena u gelu 1% agaroze po metodi koju je opisao Johansson (1972), a procenat i koncentracija γ -globulina određivana je denzitometrijskom analizom elektroforezograma uz pomoć Image Master TotalLab softvera (GE HealthCare LifeScience, SAD).

Broj leukocita, eritrocita, hematokritska vrednost, koncentracija hemoglobina, MCV, MCH, MCHC, i broj trombocita su određivani na automatskom brojaču ćelija podešenom za brojanje životinjskih ćelija (Hematology Analyzer, 901062, Diatron, Arcus, GmbH, Wien, Austria).

U cilju identifikovanja bakterija uziman je bris iz nosa obolelih i zdravih životinja, a ispitivanja su izvršena primenom konvencionalnih bakterioloških metoda kao i automatskog identifikacionog sistema (BBL Cristal Enteric/nonfermenter ID kit, Becton Dickinson).

Rezultati ispitivanja obrađeni su standardnim statističkim metodama i izračunata je srednja vrednost i standardna devijacija. Za ocenu statističke značajnosti razlika srednjih vrednosti primenjen je Studentov t-test gde je vrednost verovatnoće (p) manja od 0,05 označena kao statistički značajna. Linearnom regresionom analizom ispitivana je korelacija nivoa imunskih kompleksa sa koncentracijom serumskih proteinskih frakcija.

Rezultati / Results

Nivo PEG precipitabilnih imunskih kompleksa u serumima teladi sa kliničkim simptomima bronhopneumonije / Level of PEG precipitable immune complexes in serums of calves with clinical symptoms of bronchopneumonia

Nivo imunskih kompleksa u serumima teladi sa kliničkim simptomima, izražen kao optička gustina PEG precipitata na 350 nm (OD_{350}) iznosio je $0,577 \pm 0,206$ i bio statistički značajno viši ($p = 2 \times 10^{-4}$) u odnosu na nivo imunskih kompleksa u serumima zdrave teladi $0,286 \pm 0,089$ (tabela 1).

Tabela 1. *Nivo PEG precipitabilnih imunskih kompleksa u krvnom serumu zdrave i teladi obolele od bolesti respiratornog trakta / Table 1. Level of PEG precipitable complexes in blood serum of healthy calves and calves with respiratory tract disease*

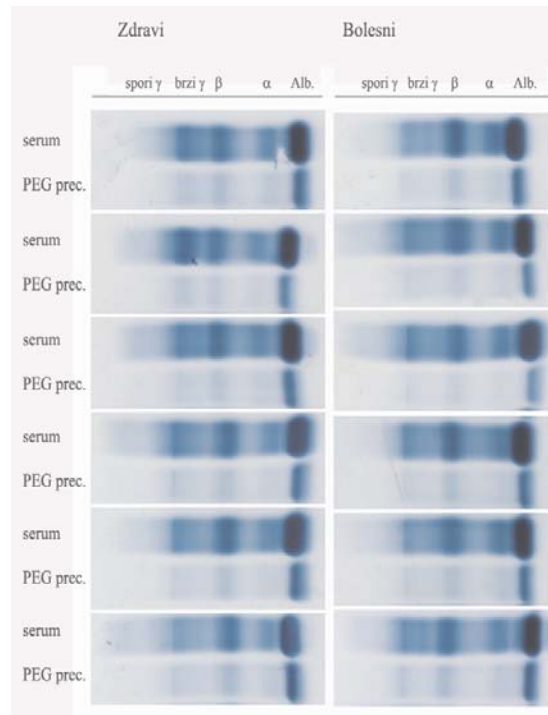
	OD ₃₅₀ PEG precipitata / OD ₃₅₀ of PEG precipitate	
	Bolesna telad / Diseased calves	Zdrava telad / Healthy calves
1	0,570	0,381
2	0,496	0,195
3	0,681	0,297
4	0,393	0,198
5	0,981	0,120
6	0,397	0,218
7	0,466	0,369
8	0,730	0,329
9	0,550	0,303
10	0,921	0,368
11	0,244	0,366
12	0,700	
13	0,451	
14	0,492	
$\bar{x} \pm SD$	$0,577 \pm 0,206^*$	$0,286 \pm 0,089$

* $p = 2 \times 10^{-4}$

Elektroforetske karakteristike proteina krvnog seruma i PEG precipitata teladi sa bronhopneumonijom / Electrophoretic characteristics of blood serum proteins and PEG precipitates of calves with bronchopneumonia

U serumima i PEG precipitatima zdrave i obolele teladi uočavaju se četiri glavne elektroforetske frakcije: γ , β i α -globulini i albumini (slika 1). Elektroforetske karakteristike (elektroforetska pokretljivost i pojava elektroforetski ho-

mogenijih zona) ovih frakcija u serumima i PEG precipitatima kod obolele teladi nisu bile izmenjenje u odnosu na zdravu telad. U γ -globulinskoj frakciji seruma i PEG precipitata i zdrave i obolele teladi bili su prisutni spori, katjonski, i brzi, anjonski, γ -globulini.



Slika 1. Elektroforeza seruma i PEG precipitata zdrave teladi i teladi obolele od bolesti respiratornog trakta /
Figure 1. Electrophoresis of serms and PEG precipitates of healthy calves and calves with respiratory tract disease

Na osnovu denzitometrijske analize elektroforezograma i ukupne koncentracije proteina u serumima i PEG precipitatima određena je koncentracija proteina u svakoj elektroforetskoj frakciji (tabela 2). U serumima obolele teladi je izmereno statistički značajno smanjenje koncentracije brzih γ -globulina. U serumima i u PEG precipitatima obolele teladi nivo α -globulina bio je povišen dok je nivo albumina bio značajno niži.

Nivo ukupnih γ -globulina i γ -globulinskih frakcija nije statistički značajno korelirao sa nivoom PEG precipitabilnih imunskih kompleksa.

Tabela 2. Nivo ukupnih proteina, γ , β , α -globulina i albumina u krvnom serumu i PEG precipitatima tri meseca stare zdrave i teladi obolele od bolesti respiratornog trakta /

Table 2. Level of total proteins, g , b , a globulina and albumin in blood serum and PEG precipitates of three-month-old healthy calves and calves with respiratory tract disease

(g/L)	Serumi / Serums		PEG precipitati / PEG precipitates	
	Zdrava telad / Healthy calves	Bolesna telad / Diseased calves	Verovatnoća / Probability (p)	Verovatnoća / Probability (p)
Ukupni proteini / Total proteins	62 ± 5	58 ± 6	0,147	0,387
Ukupni γ -globulini / Total γ -globulins	18,8 ± 3,3	16,4 ± 4,5	0,139	0,964
Spori γ -globulini / Slow γ -globulins	8,5 ± 2,0	7,7 ± 3,1	0,463	0,581
Brzi γ -globulini / Fast γ -globulins	10,3 ± 1,8	8,5 ± 1,8	0,028	0,443
β -globulini / β -globulins	14,8 ± 3,1	15,6 ± 3,8	0,389	0,169
α -globulini / α -globulins	8,4 ± 1,1	9,4 ± 1,1	0,036	0,044
Albumini / Albumins	18,2 ± 1,9	16,8 ± 1,6	0,001	0,002

Osnovni hematološki parametri teladi sa kliničkim simptomima bronhopneumonije
Elementary haematological parameters for calves with clinical symptoms of bronchopneumonia

Kod obolele teladi uključene u ogled broj leukocita i trombocita se nisu statistički značajno razlikovali u odnosu na zdravu telad. Parametri crvene krvne slike (broj eritrocita, koncentracija hemoglobina, hematokritska vrednost) su imali statistički značajno niže vrednosti kod obolelih u odnosu na zdravu telad. Međutim, ove niže vrednosti parametara crvene krvne slike nisu za posledicu imale promenu vrednosti MCV, MCH i MCHC kod obolelih za razliku od zdrave teladi.

Tabela 3. Osnovni hematološki parametri periferne krvi zdrave i teladi obolele od bolesti respiratornog trakta /

Table 3. Elementary haematological parameters of peripheral blood of healthy calves and calves with respiratory tract disease

	Bolesna telad / <i>Diseased calves</i>	Zdrava telad / <i>Healthy calves</i>	Verovatnoća / <i>Probability</i> (p)
Leukociti / <i>Leukocytes</i> ($\times 10^9/L$)	12,67 \pm 5,04	10,52 \pm 1,98	0,233
Eritrociti / <i>Erythrocytes</i> ($\times 10^{12}/L$)	10,48 \pm 3,13	13,39 \pm 2,07	0,031
Hemoglobin / <i>Haemoglobin</i> (g/L)	90 \pm 11	106 \pm 15	0,028
Hematokrit / <i>Haematocrit</i> (%)	30,1 \pm 6,7	38,5 \pm 5,4	0,009
MCV (fl)	29,9 \pm 5,5	28,9 \pm 3,0	0,636
MCH (pg)	9,5 \pm 3,8	8,0 \pm 0,8	0,232
MCHC (g/L)	311 \pm 63	275 \pm 3	0,090
Trombociti / <i>Thrombocytes</i> ($\times 10^9$)	1018 \pm 189	893 \pm 233	0,261

Identifikacija bakterija / Identification of bacteria. Kod sve obolele teladi iz nosnih briseva izolovana je *Pasteurella multocida*.

Diskusija / Discussion

Iako oboljenja respiratornog sistema goveda danas predstavljaju najveći zdravstveni problem u govedarstvu, kompletan mehanizam koji objašnjava nastanak ove bolesti, tj način na koji virusni i bakterijski agensi probijaju imunsku odbranu domaćina nisu u potpunosti poznati. Smatra se da su virusi primarni uzročnici bolesti i da aktivna virusna infekcija u bronhijalnim epitelnim ćelijama dovodi do oslobađanja hemokina i citokina koji privlače, aktiviraju i povećavaju adhezivnost neutrofila, što sve dovodi do primarne zapaljenske reakcije. Osim povećane adherence neutrofila, primarna virusna infekcija stvara uslove za sekundarnu bakterijsku infekciju jer dovodi do povećanja adhezivnosti bakterija za bronhijalne epitelne ćelije u uslovima kada je snažan inflamatorni odgovor već

započet. Bakterije se razmnožavaju u plućima i oslobađaju egzotoksine. Oni u niskoj koncentraciji aktiviraju neutrofile i mononuklearne fagocite koji nakon toga oslobađaju citokone i slobodne radikale, što dodatno pogoršava stanje inflamacije. U većim koncentracijama egzotoksini indukuju i apoptozu leukocita (Czuprynski, 2009).

Uloga imunskih kompleksa, snažnih aktivatora komplementa i neutrofila (Abbas i sar., 2007), u inflamatornom odgovoru tokom oboljenja respiratornog sistema goveda nije izučavana. U ovom radu nivo imunskih kompleksa je određivan PEG precipitacionom metodom koja omogućava i kvantitativnu (Fratrić i sar, 2006) i (barem delimičnu) kvalitativnu analizu (Fratrić i sar, 2010b) cirkulišućih imunskih kompleksa teladi. Korišćenjem ovog metoda pokazano je da je u serumima teladi uzrasta od tri meseca obolelih od bolesti respiratornog trakta, nivo PEG precipitabilnih imunskih kompleksa statistički značajno povišen. Iako je pokazano da je i kod obolele teladi stare samo mesec dana nivo PEG precipitabilnih imunskih kompleksa povišen (Fratrić i sar., 2010a), kod ovako mlade teladi za formiranje imunskih kompleksa su predominantno odgovorni majčini, kolostralni IgG. Tek kod tri meseca, kada majčini IgG bivaju potpuno katabolisani, (Virtala i sar., 1999) možemo govoriti o sposobnosti humoralnog imuniteta teladi da odgovori na ulazak patogena stvaranjem imunskih kompleksa. PEG precipitira velike imunske komplekse (>19S) (Poulton i sar., 1983). Kakav je značaj ovih velikih imunskih kompleksa kod obolele teladi, nije poznato. Veliki cirkulišući imunski kompleksi se javljaju kod ljudi sa pneumonijom izazvanom pneumokokama samo kod bolesnika kod kojih nije detektovana bakterijemija, dok kod bakterijemičnih postoje samo imunski kompleksi male molekulske težine (8-19S) (Mellencamp i sar., 1987). Ovakav rezultat ukazuje na to da bi, barem kod humane populacije u slučajevima pneumonije, veliki imunski kompleksi mogli imati protektivni značaj.

U serumima obolele teladi detektovan je statistički značajan pad koncentracije brzih γ -globulina, koji predominantno sadrže IgG1 molekule. Šta je primarni uzrok smanjenja koncentracije IgG1 kod ovih životinja nije poznato, ali imajući u vidu da su sve životinje sa pneumonijom imale snižen broj eritrocita, koncentraciju hemoglobina i hematokritsku vrednost, vrlo je moguće da deficit gvožđa indukuje smanjenje broja B-limfocita (Svoboda i sar., 2004). Osim toga, virusne infekcije, primarni uzročnici bolesti menjaju ćelijski T odgovor od protektivnog Th1 ka neprotektivnom Th2 odgovoru (Gershwin i sar., 2005), pa postoji mogućnost da je ova promena u koncentraciji brzih γ -globulina indukovana poremećajima u citokinskoj mreži kod obolelih životinja.

Elektroforetska frakcija α -zone, koja u sebi sadrži proteine akutne faze (Putnam, 1975) je bila značajno viša u serumima i PEG precipitatima kod obolele teladi. Mikrobiološka analiza brisa nosa pokazala je prisustvo, inače normalne, komensalne bakterije gornjeg respiratornog trakta *Pasteurella multocida* kod sve obolele teladi. Visoka povezanost prisustva ovih bakterija u uzorcima traheobronhijalne lavaže sa kliničkim znacima bolesti i sa povećanom koncentracijom proteina akutne faze (Nikunen i sar., 2007) ukazuje na snažnu ulogu ove bakterije u pa-

togenezi oboljenja respiratornog trakta goveda, a u epidemijama za koje je bila odgovorna ova bakterija ili *Mannheimia haemolytica* opisana je smrtnost i do 25%. U eksperimentalno indukovanoj bolesti bakterijom *Pasteurella multocida* pokazano je da ona uzrokuje opšte simptome bolesti i povećanje koncentracije proteina akutne faze (Dowling i sar., 2002). Prisustvo antitela na viruse, koji su mogući pokretači respiratorne bolesti goveda, nije ispitivano u našoj studiji. Međutim, s obzirom na to da nije nađena korelacija između prisustva virusa, kliničkih znakova bolesti i koncentracije proteina akutne faze pretpostavlja se da virusi ne moraju da imaju predominantnu ulogu u patologiji bolesti respiratornog trakta goveda, mada naravno predstavljaju predisponirajući faktor za sekundarnu bakterijsku infekciju (Nikunen i sar., 2007). Takođe, u istoj studiji nije pokazano da postoji korelacija između nalaza prisustva *Mycoplasma* sp. i kliničkih znakova bolesti, što po mišljenju autora takođe govori da ovi mikroorganizmi nemaju predominantnu ulogu u nastanku bolesti.

Dalja istraživanja će biti usmerena na detektovanje specifičnih antitela prema identifikovanim uzročnicima pneumonije u serumima i PEG precipitatima obolele teladi i ispitivanje specifičnih strukturnih karakteristika molekula IgG u sastavu imunskih kompleksa kao pokretača efektorne grane imunskog odgovora kod ove teladi.

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da se povećanje nivoa imunskih kompleksa u serumima teladi uzrasta od tri meseca obolelih od bolesti respiratornog trakta može detektovati relativno jednostravnim PEG precipitacijskim testom, a dobijeni rezultati se mogu koristiti kao dodatni dijagnostički parametar. Kakav je biološki značaj ovih PEG precipitabilnih imunskih kompleksa kod teladi obolelih od pneumonije (protektivan ili proinflamatorni) ostaje da bude utvrđeno.

NAPOMENA / ACKNOWLEDGEMENT:

Rad je finansiran sredstvima projekta br. III46002 i projekta br. IO175062 Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj, Republike Srbije./

This research was supported by Project No. III46002 and Project No. IO175062 of the Ministry of Science and Technology of the Republic of Serbia.

Literatura / References

1. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Cellular and molecular immunology (6th edition). Saunders, Elsevier Comp. Philadelphia, PA, 2007.
2. Ames TR. Dairy calf pneumonia. The disease and its impact. Vet Clin North Am Food Anim Pract 1997; 13(3): 379-91.
3. Czuprynski CJ. Host response to bovine respiratory pathogens. Anim Health Res Rev 2009; 10(2): 141-3.
4. Dowling A, Hodgson JC, Schock A, Donachie W, Eckersall PD, Mckendrick IJ. Experimental induction of pneumonic pasteurellosis in calves by intratracheal infection with *Pasteurella multocida* biotype A:3. Res Vet Sci 2002; 73(1): 37-44.

5. Fratrić N, Milošević-Jovčić N, Ilić V, Stojić V. The levels of immune complexes in the blood sera of calves in neonatal period and adult cattle. *Acta Veterinaria Beograd* 2006; 56(2-3): 103-10.
6. Fratrić N, Ilić V, Gvozdić D, Stojić V, Manojlović M. Nivo PEG precipitabilnih imunskih kompleksa u serumu mesec dana stare teladi obolele od pneumonije. Zbornik kratkih sadržaja 15. godišnjeg savetovanja veterinarara Republike Srpske (Bosna i Hercegovina) (sa međunarodnim učešćem), 09. 06. – 12. 06. 2010a. Teslić, Republika Srpska, strana 93.
7. Fratrić N, Ilić V, Milošević-Jovčić N, Stojić V. Electrophoretic and immunoelectrophoretic characteristics of IgG as a constituents of PEG precipitable immune complexes in preruminant calves' sera. *Acta Veterinaria Beograd* 2010b; 60(2-3): 155-64.
8. Gershwin LJ, Berghaus LJ, Arnold K, Anderson ML, Corbeil LB. Immune mechanisms of pathogenetic synergy in concurrent bovine pulmonary infection with *Haemophilus somnus* and bovine respiratory syncytial virus. *Vet Immunol Immunopathol* 2005; 107(1-2): 119-30.
9. Holloway Y, Snijder JA, Boersma WG. Demonstration of circulating pneumococcal immunoglobulin G immune complexes in patients with community-acquired pneumonia by means of an enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol* 1993; 31(12): 3247-54.
10. Johansson BG. Agarose gel electrophoresis. *Scand J Clin Lab Invest*, 1972, 29 (Suppl. 124), 7-9.
11. Korppi M, Leinonen M, Ruuskanen O. Pneumococcal serology in children's respiratory infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2008; 27(3): 167-75.
12. McGuirk SM. Otitis media in calves. In *Proc. 23rd Am Coll Vet Intern Med*, Baltimore, MD, 2005, 228-30.
13. Mellencamp MA, Preheim LC, McDonald TL. Isolation and characterisation of circulating immune complexes from patients with pneumococcal pneumonia. *Infection and Immunity* 1987; 55(8): 1737-42.
14. Nikunen S, Härtel H, Orro T, Neuvonen E, Tanskanen R, Kivelä SL, Sankari S, Aho P, Pyörälä S, Saloniemi H, Soveri T. Association of bovine respiratory disease with clinical status and acute phase proteins in calves. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2007; 30(3): 143-51.
15. Poulton TA, Mooney NA, Nineham LJ, Hay FC. Characteristics of immune complexes detectable by two independent assays in gynaecological malignancies. *Clin Exp Immunol* 1983; 53(3): 573-80.
16. Putnam FW. The plasma proteins Structure, function, and genetic control. Second edition. Academic Press, New York, San Francisco, London, 1975.
17. Snowden GD, Van Vleck LD, Cundiff LV, Bennett GL. Bovine respiratory disease in feedlot cattle: Environmental, genetic, and economic factors. *J Anim Sci* 2006, 84(8): 1999-2008.
18. Srikumaran S, Kelling CL, Ambagala A. Immune evasion by pathogens of bovine respiratory disease complex. *Anim Health Res Rev* 2007; 8(2): 215-29.
19. Svoboda M, Drabek J, Krejci J, Rehakova Z, Faldyna M. Impairment of the peripheral lymphoid compartment in iron-deficient piglets. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 2004 51(5): 231-7.
20. Van Donkersgoed J, Ribble CS, Boyer LG, Townsend HG. Epidemiological study of enzootic pneumonia in dairy calves in Saskatchewan. *Can J Vet Res* 1993; 57(4): 247-54.

21. Virtala QMK, Grohn YT, Mechor GD, Erb HN. The effect of maternally derived immunoglobulin G on the risk of respiratory disease in heifers during the first 3 months of life. Preventive Veterinary Medicine 1999; 39(1): 25-37.

ENGLISH

IMMUNE COMPLEXES IN BLOOD SERUM OF CALVES WITH CLINICAL SYMPTOMS OF BRONCHOPNEUMONIA

Natalija Fratrić, D. Gvozdić, Olivera Savić, Ivana Jagličić, Vesna Ilić

Pneumonia in preruminant calves is a multifactorial disease. Infectious agents, the environment, management and the immune status of the calves are all important factors in determining the outcome of an infection. Until today, the level and composition of circulating immune complexes in preruminant calves with pneumonia have not been studied in detail.

We performed this work with the aim to determine whether pneumonia in three-month-old calves is followed by changes in the immune complex level and changes in the γ -globulin level as their possible constituents. Immune complexes from the calves' sera were isolated by polyethylene glycol (PEG) precipitation methods. Optical density at 350 nm (OD_{350}) of redissolved precipitates was measured to determine the circulating immune complexes level. The OD_{350} level of PEG precipitates of calves with pneumonia at the time of diagnosis was 0.577 ± 0.206 and it was statistically significantly higher ($p < 0.001$) than OD_{350} the level of PEG precipitates of healthy calves (0.286 ± 0.080). Electrophoretic analysis of sera and PEG precipitates showed that both slow and fast γ -globulins are found among serum and immune-complexes' γ -globulins, but the concentration of fast γ -globulins was significantly lower in sera of diseased calves. The level of PEG precipitable immune complexes was not correlated with the concentration of serum and PEG precipitable γ -globulins.

The results of this study have shown that by relatively simple PEG precipitation assay it is possible to detect an increased level of circulating immune complexes in calves with pneumonia. This can be used as an additional diagnostic parameter for the detection and follow up of the disease.

Key words: calves, bovine respiratory diseases, PEG assay, immune complexes, γ -globulins

РУССКИЙ

ИММУННЫЕ КОМПЛЕКСЫ В КРОВЯНОМ СЕРУМЕ ТЕЛЯТ С КЛИНИЧЕСКИМИ СИМПТОМАМИ БРОНХОПНЕВМОНИИ

Наталья Фратрич, Д. Гвоздич, Оливера Савич, Ивана Ягличич, Весна Илич

Заболевания респираторного тракта крупного рогатого скота суть комплексные этиологии, а являются как последствие интеракции иммунной системы

единичного животного, стрессогенных деятелей присутствующих во внешней среде и патогенных микроорганизмов. Уровень и роль циркулирующих иммунных комплексов в сыворотках телят заболевших этой болезнью до сих пор не изучиваны. Эта работа сделана с целью утвердить болезни респираторного тракта у телят в возрасте три месяца слежены ли изменением уровня иммунных комплексов в сыворотке и изменением уровня сывороточных протеинов, прежде всего γ глобулинов, как основных компонентов иммунных комплексов. Иммунные комплексы из сыворотки телят изолированы преципитацией полиэтилен гликолом (ПЭГ-ом). Уровень ПЭГ преципитабельных иммунных комплексов определяван измерением оптической густоты ПЭГ осадков на 350 нм (OD_{350}). OD_{350} ПЭГ осадков заболевших телят составляла (в сумме) $0,577 \pm 0,206$ и была статистически значетльно бóльше ($p < 0,001$) в отношении стоимости, полученной у здоровых телят ($OD_{350} = 2,286 \pm 0,080$). В γ глобулиновой фракции сыворотки и ПЭГ осадков и здоровых и заболевших телят были присутствующие и медленные, катионные и быстрые анионные γ глобулины, но концентрация быстрых γ глобулинов была значительно ниже у заболевших телят. Уровень совокупных γ глобулинов и γ глобулиновых фракций не статистически значительно коррелировал с уровнем ПЭГ преципитабельных иммунных комплексов. На основе полученных результатов можно сделать вывод, что в сыворотках телят им три месяца заболевших болезнью респираторного тракта детектируется увеличенный уровень ПЭГ преципитабельных иммунных комплексов, а результаты, полученные этим релятивно простым тестом могут пользоваться как дополнительный параметр для диагноза и слежки течения болезни.

Ключевые слова: телята, болезни респираторного тракта, ПЭГ эсе, иммунные комплексы, γ глобулины