

Univerza
v Ljubljani *Veterinarska*
fakulteta



Tomislav Paller

**ETIOLOGIJA GOVEJEGA RESPIRATORNEGA
BOLEZENSKEGA KOMPLEKSA PRI TELETIH IN
MLADEM GOVEDU**

Doktorska disertacija

Ljubljana, 2019

Univerza
v Ljubljani *Veterinarska*
fakulteta



Interdisciplinarni doktorski študijski program Biomedicina

UDK 636.2.09:616.24-002: 616.98-076:616-008.9-092.18(043.3)

mag. Tomislav Paller, dr. vet. med.

**ETIOLOGIJA GOVEJEGA RESPIRATORNEGA
BOLEZENSKEGA KOMPLEKSA PRI TELETIH IN MLADEM
GOVEDU**

Doktorska disertacija

**AETIOLOGY OF BOVINE RESPIRATORY DISEASE
COMPLEX IN CALVES AND YOUNG CATTLE**

Doctoral dissertation

Ljubljana, 2019

Tomislav Paller

Etiologija govejega respiratornega bolezenskega kompleksa pri teletih in mladem govedu

Delo je bilo opravljeno na:

- Nacionalnem veterinarskem inštitutu VF, Enota Ljubljana,
- Inštitutu za patologijo, divjad, ribe in čebele, VF,
- Inštitutu za mikrobiologijo in parazitologijo, VF.

Javni zagovor je bil opravljen: v Ljubljani, dne

Mentor: prof. dr. Milan Pogačnik

Somentor: prof. dr. Peter Hostnik

Izjava o delu

Izjavljam, da je doktorska disertacija rezultat lastnega raziskovalnega dela, da so rezultati korektno navedeni in nisem kršil avtorskih pravic in intelektualne lastnine drugih. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu.

Člani strokovne komisije za oceno in zagovor:

predsednik: prof. dr. Tadej Malovrh (VF)

član: prof. dr. Željko Grabarević (Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu)

članica: doc. dr. Jožica Ježek (VF)

IZVLEČEK

Ključne besede: patologija, veterinarska; goveji respiratorni bolezenski kompleks – etiologija – diagnostika – patologija; pljučnica bakterijska – mikrobiologija – patologija; pljučnica virusna – virologija – patologija; imunohistokemija – metode; bakteriološke tehnike; molekularne diagnostične tehnike; obdukcija – veterinarska; govedo

V nalogi smo raziskali etiologijo govejega respiratornega bolezenskega kompleksa pri poginulih (skupina P) in klinično bolnih govedih (skupina Ž).

Pri 116 poginulih govedih, pri katerih smo ugotovili pljučnico, smo opisali patomorfološke spremembe v pljučih. Na vzorcih pljuč smo opravili imunohistokemično, bakteriološko in virološko preiskavo ter molekularno diagnostiko dokazovanja respiratornih patogenov.

Pri raztelesbi smo pri 51,7 % poginulih govedi ugotovili bronhopnevmonijo, pri 37,9 % intersticijsko pljučnico, pri 1,7 % embolično pljučnico in pri 8,6 % poginulih govedi kombinacijo bronhopnevmonije in intersticijske pljučnice. Po razdelitvi osnovnih tipov pljučnic na podtipove smo pri 44,0 % poginulih govedi ugotovili gnojno bronhopnevmonijo, pri 32,8 % bronhointersticijsko pljučnico, pri 7,8 % fibrinozno bronhopnevmonijo, pri 5,2 % intersticijsko pljučnico in pri 1,7 % govedi embolično pljučnico. Pri 8,6 % govedi iz skupine P smo ugotovili kombinacijo bronhopnevmonije in intersticijske pljučnice.

Z IHC preiskavo smo pri 39,8 % vzorcev pljuč ugotovili antigen bakterije *M. bovis*, pri 28,1 % antigen BAdV, pri 22,8 % antigen BRSV, pri 14,3 % antigen BPI3, pri 6 % antigen BVDV in pri 1,0 % antigen BoHV-1.

Z bakteriološko preiskavo smo iz vzorcev pljuč 107 govedi iz skupine P pri 25,2 % izolirali bakterijo *P. multocida*, bakterijo *T. pyogenes* smo izolirali pri 22,4 %, bakterijo *M. haemolytica* pa pri 10,3 % govedi.

Iz vzorcev pljuč 115 govedi iz skupine P smo z metodama RT-qPCR in qPCR dokazovali 10 respiratornih patogenov. Bakterijo *P. multocida* smo ugotovili pri 79,1 % govedi, BRSV pri 33 % govedi, *H. somni* pri 31,3 % govedi, *M. bovis* pri 19,1 % govedi, *M. haemolytica* pri 19,1 % govedi, BAdV pri 15,7 % govedi, BVDV pri 13 % govedi, BCV pri 11,3 % govedi, BPI3 pri 6,1 % govedi in BoHV-1 pri 1,7 % govedi.

Z IVCK smo pri šestih poginulih govedih na celičnih kulturah ugotovili CPE. Z IF smo pri štirih govedih dokazali BPI3, pri dveh pa BoHV-1.

V posameznem vzorcu pljuč poginulih govedi smo običajno ugotovili več respiratornih patogenov. Pri 31,6 % smo ugotovili dva patogene, pri 26,5 % tri patogene, pri 16,3 % štiri patogene, pri 6,1 % pet patogenov, pri 2,0 % govedi smo ugotovili šest patogenov in pri 1,0 % sedem patogenov. Pri 14,3 % smo ugotovili le en patogen, pri 2,0 % pa respiratornih patogenov nismo ugotovili.

Iz nosnih brisov 137 govedi iz skupine Ž smo z metodama RT-qPCR in qPCR dokazovali 10 respiratornih patogenov. Bakterijo *P. multocida* smo ugotovili pri 59,9 % govedi, BRSV pri 40,1 %, *M. haemolytica* pri 14,6 %, BCV pri 11,7 %, *H. somni* pri 9,5 %, BPI3 pri 3,6 %, BVDV pri 1,5 %, BoHV-1 pri 0,7 % in BAdV pri 0,7 % govedi.

V krvnih vzorcih 84 klinično bolnih govedi smo opravili serološko diagnostiko. Na BPI3 je bilo serološko pozitivnih 57,1 % govedi, na BAdV 53,6 %, na BRSV 32,1 %, na *M. bovis* 17,9 %, na BoHV-1 11,9 %, na BVDV 7,1 % in na *M. haemolytica* 7,1 % govedi.

Rezultati opravljenih preiskav potrjujejo kompleksnost etiologije govejega respiratornega bolezenskega kompleksa. Novo uporabljene molekularne metode predstavljajo pomembno diagnostično orodje pri diagnostiki respiratornih patogenov pri govedu.

ABSTRACT

Key words: Pathology, veterinary; bovine respiratory disease complex – aetiology – diagnostics – pathology; pneumonia, bacterial – microbiology – pathology; pneumonia, viral – virology – pathology; immunohistochemistry – methods; bacteriological techniques; molecular diagnostic techniques; autopsy – veterinary; cattle

The aetiology of the bovine respiratory disease complex was studied in the group of dead cattle (the P-group) and in a group of clinically diseased cattle (the Ž-group).

In 116 dead cattle we pathologically found pneumonia, pathomorphological changes in the lungs were described. On the lung samples, immunohistochemical, bacteriological, and virological examinations were performed, allied with molecular diagnostics of respiratory pathogens.

With pathological examination we found bronchopneumonia in 51.7%, interstitial pneumonia in 37.9%, embolic pneumonia in 1.7% and the combination of broncho and interstitial pneumonia in 8.6% of dead cattle. We categorised the types of pneumonia into subtypes, among which we found purulent bronchopneumonia in 44.0%, bronchointerstitial in 32.8%, fibrinous bronchopneumonia in 7.8%, interstitial pneumonia in 5.2% and embolic pneumonia in 1.7%. In 8.6% of the cattle from P-group we found the combination of bronchopneumonia and interstitial pneumonia.

With IHC examination, 39.8% of lung samples resulted positive for antigen against, *M. bovis*, 28.1% for BAdV, 22.8% for BRSV, 14.3% for BPI3, 6.0% for BVDV and 1.0% for BoHV-1.

With classical bacteriological examination from lung samples of 107 cattle from the P-group, *P. multocida* was isolated in 25.2% examined cattle, while *T. pyogenes* and *M. haemolytica* were isolated from 22.4% and 10.3% of lungs, respectively.

From same lung samples of 115 cattle from the P-group we examined 10 different respiratory pathogens, using the RT-qPCR and qPCR methods. *P. multocida* was found in 79.1%, BRSV in 33.0%, *H. somni* in 31.3%, *M. bovis* in 19.1%, *M. haemolytica* in 19.1%, BAdV in 15.7%, BVDV in 13.0%, BCV in 11.3%, BPI3 in 6.1% and BoHV-1 in 1.7% of cattle.

With the method of virus isolation on cell culture, in six dead animals CPE was found. Performing IF, BPI3 was determined in four animals and BoHV-1 in two.

We mostly detected several respiratory pathogens in the same lung sample. Two were detected in 31.6%, three in 26.5%, four in 16.3%, five in 6.1%, six in 2.0% and seven pathogens in 1.0%. A single pathogen was detected only in 14.3%. In 2% of lung samples we did not detect any respiratory pathogens.

From nasal swabs of 137 cattle from the Ž-group we examined 10 different respiratory pathogens, using the RT-qPCR and qPCR methods. *P. multocida* was found in 59.9% of samples, BRSV in 40.1%, *M. haemolytica* in 14.6%, BCV in 11.7%, *H. somni* in 9.5%, BPI3

in 3.6%, BVDV in 1.5%, BoHV-1 in 0.7% and BAdV in 0.7% of ill cattle with clinical symptoms of BRDC.

In blood samples of 84 cattle from the Ž-group the serological diagnostics revealed 57.1% of positive results for BPI3, 53.6% for BAdV, 32.1% for BRSV, 17.9% for *M. bovis*, 11.9% for BoHV-1, 7.1% for BVDV and 7.1% for *M. haemolytica*.

The results confirm the complexity of the aetiology of bovine respiratory disease complex. New applied molecular methods represent important diagnostic tool in the diagnosis of respiratory pathogens in cattle.

KAZALO VSEBINE

IZVLEČEK	5
ABSTRACT	7
KAZALO VSEBINE	9
KAZALO TABEL	13
KAZALO SLIK	15
SEZNAM OKRAJŠAV	23
1 UVOD	25
2 PREGLED LITERATURE	27
2.1 ZGRADBA DIHAL PRI GOVEDU.....	27
2.1.1 Anatomske značilnosti dihal pri govedu	27
2.1.2 Histološka zgradba dihal pri govedu	27
2.1.3 Obrambni mehanizmi dihal	28
2.2 GOVEJI RESPIRATORNI BOLEZENSKI KOMPLEKS.....	30
2.2.1 Splošno o govejem respiratornem bolezenskem kompleksu	30
2.2.2 Etiologija in patologija govejega respiratornega bolezenskega kompleksa.....	31
2.2.2.1 Dejavniki okolja	33
2.2.2.2 Dejavniki, ki izhajajo iz organizma gostitelja	33
2.2.2.3 Biološki etiološki dejavniki govejega respiratornega bolezenskega kompleksa	34
2.2.2.3.1 Bovini alfa herpesvirus 1 (Bovini herpes virus tipa 1, BoHV-1)	34
2.2.2.3.2 Bovini respirovirus 3 (Bovini virus parainfluenze tipa 3, BPI-3)	36
2.2.2.3.3 Bovini orthopneumovirus (Bovini respiratorni sincicijski virus BRSV).....	37
2.2.2.3.4 Bovini adenovirusi (BAdV)	39
2.2.2.3.5 Pestivirus A in B (Virus bovine virusne diareje, BVDV).....	40
2.2.2.3.6 Betakoronavirus 1 (Bovini koronavirusi, BCoV)	43
2.2.2.3.7 Mannheimia haemolytica	45
2.2.2.3.8 Pasteurella multocida multocida subsP. multocida	47
2.2.2.3.9 Histophilus somni	47
2.2.2.3.10 Trueperella pyogenes	48
2.2.2.3.11 Mycoplasma bovis	48
2.2.2.3.12 Drugi bakterijski povzročitelji	50
3 MATERIAL IN METODE	51
3.1 ŽIVALI	51
3.1.1 Poginula goveda (skupina P)	51
3.1.2 Primerjalna skupina poginulih govedi (Pk).....	53
3.1.3 Klinično bolna goveda (skupina Ž).....	53
3.1.4 Primerjalna skupina klinično bolnih govedi (skupina Žk)	55

3.2 RAZTELESBA	56
3.2.1 Klasifikacija pnevmoničnih sprememb	56
3.2.2 Ocena obsežnosti pnevmoničnih sprememb.....	63
3.3 PATOHISTOLOŠKA PREISKAVA	65
3.3.1 Ocena patohistoloških sprememb	65
3.3 IMUNOHISTOKEMIČNA PREISKAVA (IHC)	68
3.4 BAKTERIOLOŠKA PREISKAVA	70
3.5 VIROLOŠKE PREISKAVE	71
3.5.1 Virološke preiskave pri govedih iz skupine P	71
3.5.1.1 Izolacija virusov na celični kulturi pri govedih iz skupine P (IVCK P)	71
3.5.1.2 Dokazovanje respiratornih patogenov z molekularnimi metodami (RT-qPCR, qPCR).....	71
3.5.1.2.1 Izolacija RNA in DNA iz vzorcev pljuč govedi iz skupine P	72
3.5.1.2.2 Dokazovanje 7 respiratornih patogenov s komercialnim RT-qPCR kompletom LSI VetMAX™ Screening Pack Ruminants Respiratory Pathogens	72
3.5.1.2.3 Dokazovanje nukleinske kisline BVDV s komercialnim RT-qPCR kompletom PrioCHECK® BVDV RT-PCR	74
3.5.1.2.4 Dokazovanje nukleinske kisline BoHV-1 s komercialnim kompletom RT-PCR LSI VetMAX™ IBR gB.....	75
3.5.1.2.5 Dokazovanje nukleinske kisline BAdV s protokolom za dokaz serotipov BAdV 4, 5, 6, 7, 8 (4–8)	76
3.5.2 Virološke preiskave pri govedih iz skupine Ž	77
3.5.2.1 Odvzem nosnih brisov pri govedih iz skupine Ž	77
3.5.2.2. Izolacija virusov na celični kulturi pri govedih iz skupine Ž (IVCK Ž).....	77
3.5.2.3. Izolacija RNA in DNA iz nosnih brisov govedi iz skupine Ž	77
3.5.2.4 Dokazovanje 7 respiratornih patogenov s komercialnim kompletom LSI VetMAX™ Screening Pack Ruminants Respiratory Pathogens iz nosnih brisov govedi iz skupine Ž.....	78
3.5.2.5 Dokazovanje nukleinske kisline BVDV s komercialnim kompletom PrioCHECK® BVDV RT-PCR iz nosnih brisov govedi iz skupine Ž.....	78
3.5.2.6 Dokazovanje nukleinske kisline BoHV-1 s komercialnim kompletom LSI VetMAX™ IBR gB iz nosnih brisov govedi iz skupine Ž.....	78
3.5.2.7 Dokazovanje nukleinske kisline BAdV s protokolom za dokaz serotipov BAdV 4, 5, 6, 7, 8 (4–8) v nosnih brisih govedi iz skupine Ž.....	78
3.5.2.8 Serološke preiskave krvnih vzorcev govedi iz skupine Ž.....	78
3.5.2.9 Multiscreen test ELISA (Bio-X)	78
3.5.2.10 Test ELISA za dokaz protiteles proti virusu BoHV-1	80
3.5.2.11 Test ELISA za dokaz protiteles proti virusu BVDV.....	80
3.6 STATISTIČNA ANALIZA	81

4 REZULTATI.....	82
4.1 Rezultati pri poginulih govedih	82
4.1.1 Rezultati raztelesbe	82
4.1.1.1 Rezultati in klasifikacije pnevmoničnih sprememb pri govedih iz skupine P...	82
4.1.1.2 Rezultati ocene obsežnosti pnevmoničnih sprememb pri govedih iz skupine P	85
4.1.1.3 Rezultati ocene starosti pnevmoničnih sprememb pri govedih iz skupine P	86
4.1.2 Rezultati raztelesbe govedi iz skupine Pk	86
4.2 REZULTATI PATOHISTOLOŠKE PREISKAVE	87
4.2.1 Rezultati ocene patohistoloških sprememb v pljučih govedi iz skupine P	87
4.2.2 Končna presoja pnevmoničnih sprememb na pljučih govedi iz skupine P.....	88
4.2.3 Rezultati ocene patohistoloških sprememb v pljučih govedi iz skupine Pk.....	91
4.3 REZULTATI IMUNOHISTOKEMIČNE PREISKAVE	91
4.3.1 Rezultati IHC preiskave pri govedih iz skupine P	91
4.3.2 Rezultati IHC preiskave pri govedih iz skupine Pk.....	92
4.4 REZULTATI GOJIŠČNE BAKTERIOLOŠKE PREISKAVE	92
4.4.1 Rezultati gojiščne bakteriološke preiskave pri govedih iz skupine P	92
4.4.2 Rezultati bakteriološke preiskave pljuč pri govedih iz skupine Pk.....	95
4.5 REZULTATI VIROLOŠKIH PREISKAV	96
4.5.1 Rezultati IVCK pri poginulih govedih	96
4.5.2 Rezultati IVCK pri govedih iz skupine Pk	96
4.5.3 Rezultati dokazovanja respiratornih patogenov z RT-qPCR in s qPCR.....	96
4.5.3.1 Rezultati dokazovanja respiratornih patogenov z RT-qPCR in s qPCR pri govedih iz skupine P.....	96
4.5.3.2 Rezultati dokazovanja respiratornih patogenov z RT-qPCR in s qPCR pri govedih iz skupine Pk.....	98
4.5.4 Rezultati viroloških preiskav v skupinah živih govedi	98
4.5.4.1 Rezultati IVCK pri govedih iz skupine Ž	98
4.5.4.2 Rezultati IVCK pri govedih iz skupine Žk.....	98
4.5.5 Rezultati dokazovanja respiratornih patogenov z RT-qPCR in s qPCR pri govedih iz skupine Ž.....	99
4.5.6 Rezultati dokazovanja respiratornih patogenov z RT-qPCR in s qPCR pri govedih iz skupine Žk	101
4.5.7 Primerjava rezultatov ugotavljanja respiratornih patogenov z RT-qPCR in s qPCR pri govedih iz skupine P in skupine Ž	102
4.5.8 Rezultati seroloških preiskav pri govedih iz skupine Ž	103
4.8 ODGOVORI NA ZNANSTVENA VPRAŠANJA	104

4.8.1 Respiratorni patogeni pri govedu in njihova pojavnost v slovenskih rejah govedi	104
4.8.2 Respiratorni patogeni pri govedu in patomorfološke spremembe, ki jih povzročajo	105
4.8.3 Pojavnost bolezni dihal in respiratornih patogenov v slovenskih pitovnih in mlečnih rejah govedi.....	120
4.8.4 Primerjava IHC in RT-qPCR in qPCR ugotavljanja respiratornih patogenov	126
5 RAZPRAVA	128
6 SKLEPI.....	154
7 POVZETEK	156
8 SUMMARY	158
9 ZAHVALA.....	160
10 LITERATURA.....	161
11 PRILOGE	170
11.1 SLIKOVNA PRILOGA	191

KAZALO TABEL

Tabela 1: Merila za določitev vrste patološkega procesa v pljučih	66
Table 1: Criteria for determining the type of pathological changes in lungs	66
Tabela 2: Seznam uporabljenih protiteles pri IHC in njihove osnovne značilnosti	68
Table 2: List of used antibodies at IHC and their main characteristics	68
Tabela 3: Shema optične ploščice za 12 preiskovanih vzorcev, testiranih na 7 različnih respiratornih patogenov	73
Table 3: Scheme of optical plate for 12 examined samples tested for 7 different respiratory pathogens	73
Tabela 4: Vrednotenje rezultatov na podlagi Ct vrednosti	74
Table 4: Valuation of results based on Ct-value	74
Tabela 5: Vrednotenje rezultatov na podlagi Ct vrednosti za BVDV	75
Table 5: Valuing of the results based on Ct-values for BVDV	75
Tabela 6: Vrednotenje rezultatov na podlagi Ct vrednosti za BoHV-1	75
Table 6: Valuing of the results based on Ct-values for BoHV-1	75
Tabela 7: Začetni oligonukleotidi uporabljeni pri dokazovanju BAdV	76
Table 7: Initial oligonucleotides used for proving the BAdV	76
Tabela 8: Vrednotenje rezultatov na podlagi Ct vrednosti za BAdV	76
Table 8: Valuation of results based on Ct-values for BAdV	76
Tabela 9: Vzrok pogina pri govedih iz skupine Pk	86
Table 9: The cause of death of the cattle from the Pk-group	86
Tabela 10: Rezultati IHC preiskave vzorcev pljuč govedi iz skupine P	92
Table 10: The results of the IHC examination of lung samples of cattle of the P-group	92
Tabela 11: Rezultati IHC preiskave vzorcev pljuč govedi iz skupine Pk	92
Table 11: The results of IHC examination of lung samples of cattle from the P-group	92
Tabela 12: Rezultati bakteriološke preiskave pljuč govedi iz skupine Pk	95
Table 12: The results of bacteriological examination of lungs of cattle from the Pk-group	95
Tabela 13: Rezultati dokazovanja respiratornih patogenov v vzorcih pljuč 115 govedi iz skupine P z RT-qPCR in s qPCR	97
Table 13: The results of proving the respiratory pathogens in lung samples of 115 cattle from the P-group with the RT-qPCR and qPCR	97
Tabela 14: Rezultati dokazovanja respiratornih patogenov z RT-qPCR in s qPCR v vzorcih pljuč 16 govedi iz skupine Pk	98
Table 14: The results of proving of respiratory pathogens with the RT-qPCR and qPCR in lung samples of 16 cattle from the Pk-group	98
Tabela 15: Povzetek rezultatov dokazovanja respiratornih patogenov z RT-qPCR in s qPCR v nosnih brisih 137 klinično bolnih govedi iz skupine Ž	99
Table 15: Summary of the results of proving the respiratory pathogens with the RT-qPCR and qPCR in nasal swabs of 137 clinically ill cattle from the Ž-group	99
Tabela 16: Povzetek rezultatov dokazovanja respiratornih patogenov z RT-qPCR in s qPCR v vzorcih pljuč 10 govedi iz skupine Žk	101
Table 16: Summarised results of proving the respiratory pathogens with the RT-qPCR and qPCR in lung samples of 10 cattles from the Žk-group	101
Tabela 17: Rezultati seroloških preiskav pri klinično bolnih govedih iz skupine Ž	103
Table 17: Results of the serological examinations of clinically ill cattle from the Ž-group	103
Tabela 18: Zastopanost posameznih vrst pljučnic po združitvi v tri osnovne skupine	114
Table 18: The percentage of individual types of pneumonia after categorising them in three major groups	114
Tabela 19: Statistična povezava med skupinami pljučnic in respiratornimi patogeni	119
Table 19: Statistical link between the groups of pneumonias and respiratory pathogens	119
Tabela 20: Rezultati statističnega testiranja povezav med posameznimi spremenljivkami	126

Table 20: The results of statistical testing of links between the individual variables	126
Tabela 21: Primerjava rezultatov med IHC in RT-qPCR ter qPCR pri ugotavljanju respiratornih patogenov iz vzorcev pljuč govedi iz skupine P	127
Table 21: Comparison of the results between the RT-qPCR, qPCR and IHC at detection of the respiratory pathogens from lung samples of cattle from the P-group	127
Tabela 22: Statistična primerjava rezultatov IHC in RT-qPCR ter qPCR pri ugotavljanju respiratornih patogenov	127
Table 22: Statistical comparison of the results from the IHC, RT-qPCR and qPCR of detection of the respiratory pathogens	127
Tabela 23: Osnovni podatki o govedih iz P skupine	170
Table 23: Basic data about the cattle from the P-group	170
Tabela 24: Osnovni podatki o govedih iz Pk skupine	175
Table 24: Basic data about the cattle from the Pk-group	175
Tabela 25: Osnovni podatki o govedih iz Ž skupine	176
Table 25: Basic data about the cattle from the Ž-group	176
Tabela 26: Osnovni podatki o govedih iz Žk skupine	180
Table 26: Basic data about the cattle from the Žk-group	180
Tabela 27: Rezultati dokazovanja respiratornih patogenov z RT-qPCR in qPCR iz vzorcev pljuč 115 govedi iz P skupine	181
Table 27: The results of detection of respiratory pathogens with the RT-qPCR and qPCR from lung samples of 115 cattle from the P-group	181
Tabela 28: Rezultati dokazovanja respiratornih patogenov z RT-qPCR in qPCR iz vzorcev pljuč 16 govedi iz Pk skupine	185
Table 28: The results of detection of respiratory pathogens with the RT-qPCR and qPCR from lung samples of 16 cattle from the Pk-group	185
Tabela 29: Rezultati dokazovanja respiratornih patogenov z RT-qPCR in qPCR iz nosnega brisa 137 govedi iz Ž skupine	186
Table 29: The results of detection of respiratory pathogens with the RT-qPCR and qPCR from nasal swab of 137 cattle from the Ž-group	186
Tabela 30: Rezultati dokazovanja respiratornih patogenov z RT-qPCR in qPCR iz nosnega brisa govedi iz Žk skupine	190
Table 30: The results of detection of respiratory pathogens with the RT-qPCR and qPCR from nasal swabs of 10 cattle from the Žk-group	190

KAZALO SLIK

Slika 1: Delež zastopanosti posameznega starostnega razreda govedi iz skupine P (v %).....	52
Figure 1: The percentage representing age groups of cattle from the P-group.....	52
Slika 2: Delež govedi v skupini P glede na njihov izvor (v %)	52
Figure 2: The percentage of cattle in the P-group according to their origin.....	52
Slika 3: Delež govedi iz skupine P glede na proizvodno usmerjenost reje (v %).....	53
Figure 3: The percentage of cattle from the P-group according to the type of production.....	53
Slika 4: Delež zastopanosti posameznega starostnega razreda govedi iz skupine Ž (v %)	54
Figure 4: The percentage representing age groups of cattle from the Ž-group.....	54
Slika 5: Delež govedi iz skupine Ž glede na njihov izvor (v %)	54
Figure 5: The percentage of cattle from the Ž-group according to their origin	54
Slika 6: Delež govedi iz skupine Ž glede na proizvodno usmerjenost reje (v %)	55
Figure 6: The percentage of cattle from the Ž-group according to the type of production.....	55
Slika 7: Primeri gnojne bronhopnevmonije.....	57
Figure 7: Examples of purulent bronchopneumonia.....	57
Slika 8: Primeri fibrinozne bronhopnevmonije	58
Figure 8: Examples of fibrinous bronchopneumonia	58
Slika 9: Primeri intersticijske pljučnice.....	59
Figure 9: Examples of interstitial pneumonia.....	59
Slika 10: Primeri bronhointersticijske pljučnice.....	60
Figure 10: Examples of bronchointerstitial pneumonia.....	60
Slika 11: Primeri embolične pljučnice.....	62
Figure 11: Examples of embolic pneumonia	62
Slika 12: Goveja pljuča – prikaz pljučnih režnjev.	64
Figure 12: Bovine lungs - display of pulmonary lobes.....	64
Slika 13: Delež posameznih vrst pljučnic, ugotovljenih z raztelesbo 116 govedi iz skupine P (v %).....	82
Figure 13: The percentage of pneumonia types found with the autopsy of 116 cattle from the P-group	82
Slika 14: Delež posamezne vrste pljučnice, ugotovljene z raztelesbo pri 116 govedih iz skupine P (v %)	83
Figure 14: The percentage of individual pneumonia types found with the autopsy of 116 cattle from the P-group	83
Slika 15: Število posamezne vrste pljučnice, ugotovljene s patoanatomsko preiskavo pri 116 govedih iz skupine P.....	84
Figure 15: The number of individual types of pneumonias, detected with the pathoanatomic examination of 116 cattle from the P-group	84
Slika 16: Shematični prikaz obsežnosti pnevmoničnih sprememb pri različnih vrstah pljučnic, ugotovljenih pri 116 govedih iz skupine P, določen na podlagi mediane	85
Figure 16: The diagram showing the extent of pneumonic changes at different types of pneumonias, detected in 116 cattle from the P-group (determined according to the median)	85
Slika 17: Relativni deleži patohistoloških sprememb, ugotovljenih v posameznih pljučnih režnjih s patohistološko preiskavo pri 113 govedih iz skupine P (v %).....	87
Figure 17: Relative shares of pathohistologic changes detected in individual lung lobes with pathohistological examination of 113 cattle from the P-group (in %)	87
Slika 18: Odstotek pljučnic, ugotovljenih s patohistološko preiskavo pri 113 govedih iz skupine P.....	89
Figure 18: The percentage of types of pneumonia detected with pathohistological examination of 113 cattle from the P-group	89
Slika 19: Število primerov pljučnic, ugotovljenih z raztelesbo in s patohistološko preiskavo pri 113 govedih iz skupine P	90
Figure 19: The number of cases of pneumonia detected with the autopsy and pathohistological examination of 113 cattle from the P-group	90

Slika 20: Delež pozitivnih rezultatov IHC preiskav na prisotnost posameznega respiratornega patogena v vzorcih pljuč govedi iz skupine P (v %)	91
Figure 20: The percentage of results from IHC examination, positive to the presence of individual respiratory pathogens in the lung samples from the P-group	91
Slika 21: Delež bakterijskih izolatov posameznih vrst bakterij, ugotovljenih z gojiščno bakteriološko preiskavo v vzorcih pljuč 107 govedi iz skupine P (v %)	93
Figure 21: The percentage of bacterial isolates of individual bacterial species found with cultural bacteriological examination of lung samples of 107 cattle from the P-group	93
Slika 22: Delež bakterijskih izolatov, ugotovljenih s klasično bakteriološko preiskavo v vzorcih pljuč 107 govedi iz skupine P (v %)	94
Figure 22: The percentage of bacterial isolates found with classical bacteriological examination of lung samples of 107 cattle from the P-group	94
Slika 23: Število ugotovitev posameznega respiratornega patogena, ugotovljenega s klasično bakteriološko preiskavo iz pljuč 107 govedi iz skupine P po posameznem starostnem razredu	95
Figure 23: The number of determinations of individual respiratory pathogens found with classical bacteriological examination of lungs of 107 cattle from the P-group by individual age groups	95
Slika 24: Delež posameznega respiratornega patogena, ugotovljenega z RT-qPCR in s qPCR v vzorcih pljuč 115 govedi iz skupine P (v %)	97
Figure 24: The percentage of individual respiratory pathogens found with the RT-qPCR and qPCR in lung samples of 115 cattle from the P-group	97
Slika 25: Delež posameznega respiratornega patogena, ugotovljenega z RT-qPCR in s qPCR v nosnem brisu 137 klinično bolnih govedi iz skupine Ž (v %)	100
Figure 25: The percentage of individual respiratory pathogen found with the RT-qPCR and qPCR in nasal swabs from 137 clinically ill cattle of the Ž-group	100
Slika 26: Delež govedi iz skupine P in skupine Ž, pri katerih so bili z RT-qPCR in s qPCR ugotovljeni respiratorni patogeni (v %)	102
Figure 26: The percentage of cattle from the P-group and the Ž-group in which the respiratory pathogens were detected with the RT-qPCR and qPCR methods	102
Slika 27: Delež serološko pozitivnih krvnih vzorcev 84 klinično bolnih govedi iz skupine Ž (v %)	103
Figure 27: The percentage of serologically positive blood samples of 84 clinically ill cattle from the Ž-group	103
Slika 28: Pojavnost posameznega respiratornega patogena, ugotovljenega z RT-qPCR in s qPCR in z gojiščno bakteriološko preiskavo v vzorcih pljuč 107 govedi iz skupine P (v %)	104
Figure 28: Prevalence of the individual respiratory pathogens detected with the methods of RT-qPCR and qPCR and cultural bacterial examination in lung samples of 107 cattle from the P-group (in %)	104
Slika 29: Število laboratorijskih dokazov bakterije <i>P. multocida</i> pri posameznih vrstah pljučnic, ugotovljenih z RT-qPCR in s qPCR in/ali z gojiščno bakteriološko preiskavo pri govedih iz skupine P (N = 89)	105
Figure 29: The number of laboratory detections of <i>P. multocida</i> in individual group of pneumonias, found with the RT-qPCR and qPCR and/or cultural bacteriological examination of the cattle from the P-group (N = 89)	105
Slika 30: Število laboratorijskih dokazov bakterije <i>H. somni</i> pri posameznih vrstah pljučnic, ugotovljenih z RT-qPCR in s qPCR in/ali z gojiščno bakteriološko preiskavo pri govedih iz skupine P (N = 89)	106
Figure 30: The number of laboratory detections of bacteria <i>H. somni</i> in individual group of pneumonias, found with the RT-qPCR and qPCR and/or cultural bacteriological examination of the cattle from the P-group (N = 89)	106
Slika 31: Število laboratorijskih dokazov bakterije <i>T. pyogenes</i> pri posameznih vrstah pljučnic, ugotovljenih z RT-qPCR in s qPCR in/ali z gojiščno bakteriološko preiskavo pri govedih iz skupine P (N = 89)	107
Figure 31: The number of laboratory detections of bacteria <i>T. pyogenes</i> in individual group of pneumonias, found with the RT-qPCR and qPCR and/or cultural bacteriological examination of the cattle from the P-group (N = 89)	107
Slika 32: Število laboratorijskih dokazov bakterije <i>M. haemolytica</i> pri posameznih vrstah pljučnic, ugotovljenih z RT-qPCR in s qPCR in/ali z gojiščno bakteriološko preiskavo pri govedih iz skupine P (N = 89)	108

Figure 32: The number of laboratory detections of bacteria <i>M. haemolytica</i> in individual group of pneumonias, found with the RT-qPCR and qPCR and/or cultural bacteriological examination of the cattle from the P-group (N = 89)	108
Slika 33: Število laboratorijskih dokazov bakterije <i>M. bovis</i> pri posameznih vrstah pljučnic, ugotovljenih z RT-qPCR in s qPCR in/ali z gojiščno bakteriološko preiskavo pri govedih iz skupine P (N = 89).....	109
Figure 33: The number of laboratory detections of bacteria <i>M. bovis</i> in individual group of pneumonias, found with the RT-qPCR and qPCR and/or cultural bacteriological examination of the cattle from the P-group (N = 89)	109
Slika 34: Število laboratorijskih dokazov BRSV pri posameznih vrstah pljučnic, ugotovljenih z RT-qPCR in s qPCR in/ali z gojiščno bakteriološko preiskavo pri govedih iz skupine P (N = 89).....	110
Figure 34: The number of laboratory detections of BRSV in individual group of pneumonias, found with the RT-qPCR and qPCR and/or cultural bacteriological examination of the cattle from the P-group (N = 89).....	110
Slika 35: Število laboratorijskih dokazov BAdV pri posamezni skupini pljučnic, ugotovljenih z RT-qPCR in s qPCR in/ali z gojiščno bakteriološko preiskavo pri govedih iz skupine P (N = 89).....	111
Figure 35: The number of laboratory detections of BAdV in individual group of pneumonias, found with the RT-qPCR and qPCR and/or cultural bacteriological examination of the cattle from the P-group (N = 89).....	111
Slika 36: Število laboratorijskih dokazov BCV pri posameznih vrstah pljučnic, ugotovljenih z RT-qPCR in s qPCR in/ali z gojiščno bakteriološko preiskavo pri govedih iz skupine P (N = 89).....	112
Figure 36: The number of laboratory detections of BCV in individual group of pneumonias, found with the RT-qPCR and qPCR and/or cultural bacteriological examination of the cattle from the P-group (N = 89).....	112
Slika 37: Število laboratorijskih dokazov BVDV pri posameznih vrstah pljučnic, ugotovljenih z RT-qPCR in s qPCR in/ali z gojiščno bakteriološko preiskavo pri govedih iz skupine P (N = 89).....	113
Figure 37: The number of laboratory detections of BVDV in individual group of pneumonias, found with the RT-qPCR and qPCR and/or cultural bacteriological examination of the cattle from the P-group (N = 89).....	113
Slika 38: Število laboratorijskih dokazov BPI3V pri posameznih vrstah pljučnic, dokazanih z RT-qPCR in s qPCR in/ali z gojiščno bakteriološko preiskavo pri govedih iz skupine P (N = 89).....	114
Figure 38: The number of laboratory detections of BPI3 in individual group of pneumonias, found with the RT-qPCR and qPCR and/or cultural bacteriological examination of the cattle from the P-group (N = 89).....	114
Slika 39: Število laboratorijskih dokazov posameznega respiratornega patogena pri bronhopneumoniji, ugotovljenih z RT-qPCR in s qPCR in/ali z gojiščno bakteriološko preiskavo pri govedih iz skupine P (N = 89)	115
Figure 39: The number of laboratory detections of single respiratory pathogen of bronchopneumonia, using the RT-qPCR and qPCR methods and/or cultural bacteriological examination of the cattle from the P-group (N = 89)	115
Slika 40: Število laboratorijskih dokazov posameznega respiratornega patogena pri intersticijski pljučnici, ugotovljenih z RT-qPCR in s qPCR in/ali z gojiščno bakteriološko preiskavo pri govedih iz skupine P (N = 89)	116
Figure 40: The number of laboratory detections of single respiratory pathogen of interstitial pneumonia, using the RT-qPCR and qPCR methods and/or cultural bacteriological examination of the cattle from the P-group (N = 89)	116
Slika 41: Število laboratorijskih dokazov posameznega respiratornega patogena pri kombiniranih pljučnicah, ugotovljenih z RT-qPCR in s qPCR in/ali z gojiščno bakteriološko preiskavo pri govedih iz skupine P (N = 89)	117
Figure 41: The number of laboratory detections of single respiratory pathogen of combined pneumonias, using the RT-qPCR and qPCR methods and/or cultural bacteriological examination of the cattle from the P-group (N = 89)	117
Slika 42: Število laboratorijskih dokazov posameznega respiratornega patogena, ugotovljenih z RT-qPCR in s qPCR in/ali z gojiščno bakteriološko preiskavo pri govedih iz skupine P (N = 89) pri posamezni skupini pljučnic	118

Figure 42: The number of laboratory detections of individual respiratory pathogen of combined pneumonias, using the RT-qPCR and qPCR methods and/or cultural bacteriological examination of the cattle from the P-group (N = 89)	118
Slika 43: Pojavnost posamezne vrste pljučnice, ugotovljene v vzorcih pljuč govedi iz skupine P (N = 89) glede na tip reje (v %)	120
Figure 43: The prevalence of individual pneumonial types found in lung samples of cattle from the P-group (N=89) according to the type of breeding (in %)	120
Slika 44: Pojavnost posameznega respiratornega patogena v vzorcih pljuč govedi iz skupine P (N = 89) glede na tip reje (v %)	121
Figure 44: Prevalence of individual respiratory pathogens in lung samples of cattle from the P-group (N=89) according to the type of breeding (in %)	121
Slika 45: Število govedi iz skupine P z istim številom patogenov v posamezni vrsti reje, ugotovljenih z RT-qPCR in s qPCR in/ali z gojiščno bakteriološko preiskavo pri govedih iz skupine P (N = 98)	122
Figure 45: The number of cattle from the P-group with the same number of pathogens in the individual form of breeding, examined with the RT-qPCR and qPCR methods and/or cultural bacteriological examination of the cattle from the P-group (N = 89)	122
Slika 46: Frekvenca pojavljanja posamezne skupine pljučnic pri govedih iz skupine P glede na tip reje	123
Figure 46: The frequency of occurrence of individual type of pneumonia in cattle of the P-group according to the form of breeding	123
Slika 47: Pojavnost posameznega respiratornega patogena, ugotovljenega z RT-qPCR in s qPCR v nosnem brisu govedi iz skupine Ž (N = 137) glede na tip reje	124
Figure 47: Prevalence of individual respiratory pathogen found with the RT-qPCR and qPCR methods in nasal swabs of the cattle from the Ž-group (N = 137) according to the type of breeding	124
Slika 48: Število govedi z istim številom patogenov v posamezni vrsti reje, ugotovljenih z RT-qPCR in s qPCR pri govedih iz skupine Ž (N = 137)	125
Figure 48: The number of cattle with the same number of pathogens at individual type of breeding, detected with the RT-qPCR and qPCR methods in cattle from the Ž-group (N = 137)	125
Slika 49: Kadavri telet pred raztelesbo	191
Figure 49: Cadavers of calves before the autopsy	191
Slika 50: Shujšanost - posledica kronične gnojne bronhopnevmonije (na levi P10, na desni P12)	192
Figure 50: Poor body condition as a consequence of chronic purulent bronchopneumonia (left P10, right P12)	192
Slika 51: Shujšanost - posledica kronične gnojne bronhopnevmonije (P14)	192
Figure 51: Poor body condition as a consequence of chronic purulent bronchopneumonia (P14)	192
Slika 52: Močna shujšanost - posledica difuzne kronične bronhopnevmonije (P84)	193
Figure 52: Severe cachexia as a result of diffuse chronic bronchopneumonia (P84)	193
Slika 53: Kronična gnojna bronhopnevmonija prednjih delov pljuč (P21)	193
Figure 53: Chronic purulent bronchopneumonia of cranial parts of lungs (P21)	193
Slika 54: Adhezije popljučnice in porebrnice pri kronični gnojni bronhopnevmoniji (P14)	194
Figure 54: Adhesions between pulmonary pleura and costal pleura at chronic purulent bronchopneumonia (P14)	194
Slika 55: Kronična gnojna pljučnica, ki jo je povzročila <i>P. multocida</i> - sekvstracija inficiranega in odmrlega tkiva (P19).	194
Figure 55: Chronic purulent pneumonia caused by <i>P. multocida</i> -sequestration of infected and necrotic pulmonary tissue. (P19)	194
Slika 56: Kronična gnojna bronhopnevmonija, ki jo je povzročila <i>P. multocida</i> (P12).	195
Figure 56: Chronic purulent bronchopneumonia caused by <i>P. multocida</i> (P12)	195
Slika 57: Kronična gnojna bronhopnevmonija - prizadet je levi kranialni pljučni reženj. Povzročitelji: <i>M. bovis</i> , <i>P. multocida</i> , BAdV (P16)	195
Figure 57: Chronic purulent bronchopneumonia - the left cranial lung lobe is affected. <i>M. bovis</i> , <i>P. multocida</i> , BAdV (P16)	195

Slika 58: Kronična gnojna bronhopnevmonija - iz bronhov se na pritisk izceja mazav gnoj (P16).	196
Figure 58: Chronic purulent bronchopneumonia - under pressure, a creamy pus is oozing from the bronchae (P16).....	196
Slika 59: Kronična gnojna bronhopnevmonija - rjav sluzast gnoj v bronhih. Povzročitelja: <i>H. somi</i> , <i>P. multocida</i> (P15).....	196
Figure 59: Chronic purulent bronchopneumonia - brown mucinous pus in bronchae. <i>H. somi</i> , <i>P. multocida</i> (P15)	196
Slika 60: Kronična gnojna bronhopnevmonija, ki sta jo povzročila <i>H. somni</i> in <i>P. multocida</i> (P23).	197
Figure 60: Chronic purulent bronchopneumonia caused by <i>H. somni</i> and <i>P. multocida</i> . (P23).....	197
Slika 61: Kronična gnojna bronhopnevmonija, ki sta jo povzročila <i>P. multocida</i> in <i>T. pyogenes</i> (P25).....	197
Figure 61: Chronic purulent bronchopneumonia caused by <i>P. multocida</i> and <i>T. pyogenes</i> . (P25)	197
Slika 62: Pljuča <i>in situ</i> - kronična mikoplazemska bronhopnevmonija, ki jo je povzročila <i>M. bovis</i> (P10).....	198
Figure 62: The lungs <i>in situ</i> - chronic purulent mycoplasmal bronchopneumonia caused by <i>M. bovis</i> . (P10) ...	198
Slika 63: Kronična mikoplazemska pljučnica, ki jo je povzročila <i>M. bovis</i> (P10).	198
Figure 63: Chronic mycoplasmal pneumonia caused by <i>M. bovis</i> . (P10).....	198
Slika 64: Prečno prerezan kranialni pljučni reženj - bronhiektazije z mazavim eksudatom. Povzročitelj: <i>M. bovis</i> (P10).....	199
Figure 64: Cross-section of cranial lung lobe - bronchiectasis with creamy exudat. <i>M. bovis</i> (P10).....	199
Slika 65: Pljuča <i>in situ</i> - kronična gnojna bronhopnevmonija, ki so jo povzročili <i>H. somni</i> , <i>P. multocida</i> in <i>T. pyogenes</i> (P11).	199
Figure 65: Lungs <i>in situ</i> - chronic purulent bronchopneumonia, caused by <i>H. somni</i> , <i>P. multocida</i> and <i>T. pyogenes</i> . (P11)	199
Slika 66: Kronična gnojna pljučnica desnega kranialnega pljučnega režnja (P23)	200
Figure 66: Chronic purulent pneumonia of right cranial lung lobe (P23)	200
Slika 67: Akutna gnojna bronhopnevmonija - v alveolah so nevtrofilni granulociti, makrofagi in krvavitve. Povzročitelj: <i>P. multocida</i> , BPI3 (P67), HE, x 200	200
Figure 67: Acute purulent bronchopneumonia - neutrophil granulocytes, macrophages and haemorrhages in alveoli. <i>P. multocida</i> , BPI3 (P67), HE, x 200.....	200
Slika 68: Bronhiektazija, napolnjena z gnojem. Povzročitelj: <i>M. bovis</i> (P32), HE, x 40	201
Figure 68: Bronchiectasis filled with pus. <i>M. bovis</i> (P32), HE, x 40	201
Slika 69: Obliterirajoči bronhiolitis - brstenje papilarnih podaljškov v lumen bronhiola. Povzročitelj: <i>M. bovis</i> (P32), HE, x 100.....	201
Figure 69: Obliterative bronchiolitis - proliferation of papillary projections in the bronchiolar lumen. <i>M. bovis</i> . (P32) HE, x 100.....	201
Slika 70: Obliterirajoči bronhiolitis. Povzročitelj: <i>M. bovis</i> (P32), HE, x 200.....	202
Figure 70: Obliterative bronchiolitis. <i>M. bovis</i> (P32), HE, x 200.....	202
Slika 71: Bika, ki sta poginila zaradi akutne pljučne manheimioze, sta v dobrem rejnem stanju (levo P18; desno P26).	203
Figure 71: Good body condition of young bulls, whose deats was caused by the effects of acute manheimiosis (left P18; right P26).	203
Slika 72: Akutna fibrinozna bronhopnevmonija s fibrinoznim plevritisom (P18)	204
Figure 72: Acute fibrinous bronchopneumonia with fibrinous pleuritis (P18).....	204
Slika 73: Akutna fibrinozna bronhopnevmonija s plevritisom, ki jo je povzročila bakterija <i>M. haemolytica</i> (P26).	204
Figure 73: Acute fibrinous bronchopneumonia with pleuritis caused by <i>M. haemolytica</i> (P26).....	204
Slika 74: Marmoriran videz rezne ploskve pljuč pri fibrinozni bronhopnevmoniji. Povzročitelj: <i>M. haemolytica</i> (P26).....	205
Figure 74: Marble-like look of cutting surface at fibrinous bronchopneumonia. <i>M. haemolytica</i> (P26).....	205
Slika 75: Fibrinozno hemoragični eksudat v prsni votlini. Slika akutne pljučne manheimioze (P85)	205

Figure 75: Fibrinous hemorrhagic exudate in thoracic cavity. A picture of acute pulmonary manheimiosis (P85)	205
Slika 76: Hemoragično pnevmonično žarišče pri akutni pljučni manheimiozi (P85)	206
Figure 76: Hemorrhagic pneumonic focus in acute pulmonary manheimiosis (P85)	206
Slika 77: Fibrinozna bronhopneumonija - nekroza pljučnega tkiva in fibrinozni plevritis (P18)	206
Figure 77: Fibrinous bronchopneumonia - necrosis of lung tissue and fibrinous pleuritis (P18)	206
Slika 78: Hemoragična pnevmonična žarišča pri fibrinozni bronhopneumoniji (P51)	207
Figure 78: Haemorrhagic pneumonic focuses of fibrinous bronchopneumonia (P51)	207
Slika 79: Nekrotični predeli pljučnega tkiva, obrobjeni s pasom ovsenih celic. Povzročitelj: <i>M. haemolytica</i> (P86), HE, x 40	207
Figure 79: Necrotic areas of lung tissue, surrounded by oat cells. <i>M. haemolytica</i> (P86), HE, x 40	207
Slika 80: Alveole polne fibrina in ovsenih celic - fibrinozna bronhopneumonija (P26), HE, x 200	208
Figure 80: Alveoli filled with fibrine and oat cells - fibrinous bronchopneumonia (P26), HE, x 200	208
Slika 81: Kolonije bakterij, granulociti, ovsene celice in fibrin v alveolih. Povzročitelj: <i>M. haemolytica</i> (P86), HE, x 200	208
Figure 81: Bacterial colonies, granulocytes, oat cells and fibrin in alveoli. <i>M. haemolytica</i> (P86), HE, x 200	208
Slika 82: Alveoli, polni nevtrofilnih granulocitov, ki se spreminjajo v ovsene celice. Povzročitelj: <i>M. haemolytica</i> (P86), HE, x 400	209
Figure 82: Alveoli filled with neutrophil granulocytes which are transforming into oat cells. <i>M. haemolytica</i> (P86), HE, x 400	209
Slika 83: Tromboza mezigovnice v interlobularnem intersticiju. Povzročitelj: <i>M. haemolytica</i> (P86), HE, x 200	209
Figure 83: Trombosis of lymphatic vessel in interlobular interstitium. <i>M. haemolytica</i> (P86); HE, x 200	209
Slika 84: Alveoli polni fibrina, v katerem so posamezne vnetne celice. Povzročitelj: <i>M. haemolytica</i> (P86), HE, 200 x	210
Figure 84: Alveoli filled with fibrinous exudat containing some inflammatory cells. <i>M. haemolytica</i> (P86), HE, x 200	210
Slika 85: Nekrotični bronhiolitis pri okužbi z BoHV-1. (P3), HE, x 100	210
Figure 85: Necrotic bronchiolitis in infection with BoHV-1. (P3), HE, x 100	210
Slika 86: Diskretna pozitivna imunohistokemična reakcija na BPI3 (P1); x 200	211
Figure 86: Discrete positive immunohistochemical reaction to BPI3 (P1); x 200	211
Slika 87: Pozitivna imunohistokemična reakcija na <i>M. bovis</i> v epitelijskih celicah bronhiola (P37); x 200	211
Figure 87: Positive immunohistochemical reaction to <i>M. bovis</i> in epithelial cells of bronchioles (P37); x 200	211
Slika 88: Pozitivna imunohistokemična reakcija na <i>M. bovis</i> v epitelijskih celicah bronhiola (P37); x 400	212
Figure 88: Positive immunohistochemical reaction to <i>M. bovis</i> in epithelial cells of bronchioles (P37); x 400	212
Slika 89: Izrazita cianoza smrčka in sluznice ustnic - posledica hipoksije. Povzročitelj: BRSV (P87)	212
Figure 89: Severe cyanosis of the muzzle and oral mucosa due to hypoxia. BRSV (P87)	212
Slika 90: Cianoza smrčka, očesnih veznic in kože - posledica hipoksije. Povzročitelj: BRSV (P80)	213
Figure 90: Cyanosis of the muzzle, conjunctivae and skin due to hypoxia. BRSV (P80)	213
Slika 91: Cianoza kože je dobro vidna le na neporaslih delih telesa – izrazita cianoza seskov. Povzročitelj: BRSV (P 87)	213
Figure 91: Cyanosis of the skin is visible only on the hairless parts of the body – severe teats cyanosis. BRSV (P 87)	213
Slika 92: Akutna bronhointersticijska pljučnica - konsolidacija kranioventralnih delov in emfizem kavalnih delov pljuč. Povzročitelj: BRSV (P87)	214
Figure 92: Acute bronchointerstitial pneumonia - consolidation of cranioventral parts and emphysema of caudal parts of the lung. BRSV (P87)	214
Slika 93: Akutna bronhointersticijska pljučnica. Povzročitelj: BRSV (P5)	214
Figure 93: Acute bronchointerstitial pneumonia. BRSV (P5)	214
Slika 94: Akutna bronhointersticijska pljučnica. BRSV (P5)	215

Figure 94: Acute bronchointerstitial pneumonia. BRSV (P5)	215
Slika 95: Akutna bronhointersticijska pljučnica - izrazit emfizem kavdalnih delov pljuč. BRSV (P33)	215
Figure 95: Acute bronchointerstitial pneumonia. Severe emphysema of caudal parts of the lung. BRSV (P33)	215
Slika 96: Akutna bronhointersticijska pljučnica - mesnatost kranialnih delov, bulozni emfizem kavdalnih delov pljuč. BRSV (P80)	216
Figure 96: Acute bronchointerstitial pneumonia - meaty cranial parts and bulous emphysema of caudal parts of the lung. BRSV (P80)	216
Slika 97: Bulozni emfizem kavdalnih pljučnih režnjev. BRSV (P80)	216
Figure 97: Bulous emphysema of caudal lung lobes. BRSV (P80)	216
Slika 98: Mesnat videz pljučnega tkiva, bronhiji so brez eksudata. BRSV (P79)	217
Figure 98: Meaty appearance of lung tissue, no exudate in the bronchioles. BRSV (P79)	217
Slika 99: Prečni prerez kavdalnega pljučnega režnja - akutna bronhointersticijska pljučnica. BRSV (P32)	217
Figure 99: Cross-section of caudal lung lobe - acute bronchointerstitial pneumonia. BRSV (P32)	217
Slika 100: Ruptura popljučnice v predelu emfizematoznih sprememb je privedla do pnevmotoraksa. BRSV (P117)	218
Figure 100: Rupture of pulmonary pleura in the region of emphysematous changes caused pneumothorax. BRSV (P117)	218
Slika 101: Atektaza pljuč zaradi pnevmotoraksa. BRSV (P90)	218
Figure 101: Pulmonary atelectasis due to pneumothorax. BRSV (P90)	218
Slika 102: Ruptura popljučnice. BRSV (P90)	219
Figure 102: Rupture of pulmonary pleura. BRSV (P90)	219
Slika 103: Pneumonični pljučni režnjiči v okolici bronhov kažejo na bronhogeno širjenje okužbe. BRSV (P90)	219
Figure 103: Pneumonic lung lobules around the bronchi indicate the bronchogenic spread of infection. BRSV (P90)	219
Slika 104: Konsolidacija kranioventralnih delov pljuč. BRSV (P105)	220
Figure 104: Consolidation of cranioventral parts of the lung. BRSV (P105)	220
Slika 105: Emfizem je povzročil poke interlobularnega intersticija s posledičnimi krvavitvami. BRSV (P105)	220
Figure 105: The emphysema caused rupture of interlobular interstitium, leading to haemorrhages. BRSV (P105)	220
Slika 106: Bronhointersticijska pljučnica. BRSV (P113)	221
Figure 106: Bronchointerstitial pneumonia. BRSV (P113)	221
Slika 107: Izrazit interlobularni emfizem je ena od značilnosti infekcije z BRSV (P113)	221
Figure 107: Obvious interlobular emphysema is one of the characteristics of BRSV infection (P113)	221
Slika 108: Bronhointersticijska pljučnica komplicirana z bakterijsko okužbo. BRSV, <i>P. multocida</i> , BAdV (P27)	222
Figure 108: Bronchointerstitial pneumonia complicated with bacterial infection. BRSV, <i>P. multocida</i> , BAdV (P27)	222
Slika 109: Kronična gnojna bronhopnevmonija, ki jo je povzročila <i>P. multocida</i> , v kombinaciji z bronhointersticijsko pljučnico, ki jo je povzročil BRSV (P32).	222
Figure 109: Chronic purulent bronchopneumonia (<i>P. multocida</i>) in combination with bronchointerstitial pneumonia (BRSV) (P32)	222
Slika 110: Akutna bronhointersticijska pljučnica. BRSV, <i>P. multocida</i> (P9)	223
Figure 110: Acute bronchointerstitial pneumonia. BRSV, <i>P. multocida</i> (P9)	223
Slika 111: Alveolarne celice so nabrekle in propadle ter odlučene v lumnu alveol. BRSV (P32), HE, x 400 ..	223
Figure 111: Alveolar cells are swollen and necrotic, peeling off into the alveolar lumen. BRSV (P32), HE x 400 ..	223
Slika 112: Epitelizacija alveol pri bronhointersticijski pljučnici. BRSV (P4), HE, x 200 ..	224
Figure 112: Epythelisation of alveoli at bronchointerstitial pneumonia. BRSV (P4). HE, x 200 ..	224
Slika 113: Epitelizacija alveol. BRSV (P4), HE, x 400 ..	224

Figure 113: Epithelisation of alveoli. BRSV (P4), HE, x 400	224
Slika 114: Bronhointersticijska pljučnica - v alveolah so odluščene alveolarne celice, makrofagi, granulociti in sincicijske celice (puščica) (P32), HE, x 400.....	225
Figure 114: Bronchointerstitial pneumonia; peeled-off alveolar cells, macrophages, granulocytes and syncytial cells in alveoli (arrow) (P32), HE, x 400	225
Slika 115: Pozitivna imunohistokemična reakcija na BRSV (P83); x 200	225
Figure 115: Positive immunohistochemical reaction to BRSV (P83); x 200.....	225
Slika 116: Intersticijska pljučnica - močna zadebelitev interalveolarnega intersticija, ki je infiltriran z vnetnimi celicami. <i>P. multocida</i> , BPI3 (P67), HE, 200x	226
Figure 116: Interstitial pneumonia - severe thickening of interalveolar interstitium which is infiltrated with inflammatory cells. <i>P. multocida</i> , BPI3 (P67), HE, 200x.....	226
Slika 117: Hialine membrane so ena od značilnosti intersticijske pljučnice (P67), HE, x 200	226
Figure 117: Hyaline membranes are one of the characteristics of interstitial pneumonia (P67); x 200.....	226
Slika 118: Pozitivna imunohistokemična reakcija na BAdV v epiteljskih celicah bronhiolov (P39); x 200	227
Figure 118: Positive immunohistochemical reaction to BAdV in epithelial cells of bronchioles (P39); x 200.....	227
Slika 119: Pozitivna imunohistokemična reakcija na BAdV v epiteljskih celicah bronhiolov in v alveolarnih makrofagih (P39); x 400	227
Figure 119: Positive immunohistochemical reaction to BAdV in epithelial cells of bronchioles and alveolar macrophages (P39); x 400	227
Slika 120: Pljučnica, ki so jo povzročili <i>P. multocida</i> in <i>M. haemolytica</i> ter BVDV (P83).	228
Figure 120: Pneumonia caused by <i>P. multocida</i> , <i>M. haemolytica</i> and BVDV (P83).	228
Slika 121: Pozitivna imunohistokemična reakcija na BVDV (P83); x 400	228
Figure 121: Positive immunohistochemical reaction to BVDV (P83); x 400	228
Slika 122: Nekrotično žarišče v pljučih goveda, ki je poginilo za posledicami okužbe z BoHV-1 (P3). HE, x 200	229
Figure 122: Necrotic focus in lung of the cattle that died of infection with BoHV-1 (P3); x 200.....	229
Slika 123: Izrazita pozitivna imunohistokemična reakcija na BoHV-1 (P3); x 400	229
Figure 123: Obvious positive immunohistochemical reaction to BoHV-1 (P3); x 400	229
Slika 124: Pozitivna imunohistokemična reakcija na BoHV-1; (P1); 100x.....	230
Figure 124: Positive immunohistochemical reaction to BoHV-1; (P1); 100x.	230
Slika 125: Pozitivna imunohistokemična reakcija na BoHV-1 (P3); x 200.....	230
Figure 125: Positive immunohistochemical reaction to BoHV-1 (P3); x 200	230

SEZNAM OKRAJŠAV

APTES – 3-aminopropiltrietskolan
BAdV – Bovini adenovirus
BALT – bronhom pridruženo limfatično tkivo
BCV – Betakoronavirus 1 (Bovini koronavirus)
BoHV-1 – Bovini alfa herpesvirus 1 (Bovini herpesvirus tipa 1)
BPI3 – Bovini respiravirus 3 (Bovini virus parainflunce tipa 3)
BRD – goveja respiratorna bolezen
BRDC – goveji respiratorni bolezenski kompleks
BRSV – Bovini ortopneumovirus (Bovini respiratorni sincicijski virus)
BVDV – Pestivirus A in B (Virus bovine virusne diareje)
CD – označevalec pripadnosti
CP-BVDV – citopatogeni biotip virusa
CPE – citopatski efekt
CRG – centralni register govedi
Ct – Ct vrednost (ang. Cycle of threshold)
EU – Evropska unija
ELISA – encimsko imunski test
D CRAN caud – zadnji del desnega kranialnega pljučnega režnja
D CRAN cran – prednji del desnega kranialnega pljučnega režnja
D CAUD caud – zadnji del desnega kavdalnega pljučnega režnja
D CAUD cr – prednjem delu desnega kavdalnega pljučnega režnja
DNK – deoksiribonukleinska kislina
dsDNK – dvojna linearna molekula DNK
F. necrophorum – *Fusobacterium necrophorum*
H. somni – *Histophilus somni*
HPI-3 -humani respiravirus 3 (Humani virus parainflunce tipa 3)
HRP – hrenova peroksidaza
HRSV – humani ortopneumovirus (Humani respiratorni sincicijski virus)
E. coli – *Escherichia coli*
IBP – infekciozni balanopostitis
IBR – infekciozni bovini rinotraheitis
IF – imunofluorescenčna preiskava
IHC – imunohistokemična preiskava
IPC – interna pozitivna kontrola
IPDRČ – Inštitutu za patologijo, divjad, ribe in čebele Veterinarske fakultete
IPV – infekciozni pustularni vulvovaginitis
IMP – Inštitut za mikrobiologijo in parazitologijo Veterinarske fakultete
IVCK – izolacija virusa na celični kulturi
L CAUD caud – zadnji del levega kavdalnega pljučnega režnja
L CAUD cran – prednji del levega kavdalnega pljučnega režnja
L CRAN caud – zadnji del levega kranialnega pljučnega režnja

L CRAN cran – prednji del levega kranialnega pljučnega režnja

M – medialni pljučni reženj

mAb – monoklonska protitelesa

MALT – sluznicam pridruženo limfatično tkivo

M. bovis – *Mycoplasma bovis*

M. haemolytica – *Mannheimia haemolytica*

M. dispar – *Mycoplasma dispar*

MB – mukozna bolezen

MOMP glavni zunanji membranski protein (major outer membrane protein)

OD vrednost – optična vrednost

OMP – zunanji membranski protein (outer membrane protein)

NCP-BVDV – necitopatogeni biotip virusa

Skupina P – skupina poginulih govedi

pAb – poliklonska protitelesa

PCR – polimerazno verižna reakcija

PI – perzistentno okužene živali

Pk – primerjalna skupina poginulih govedi

P. multocida – *Pasteurella multocida multocida*

PVM – mišji ortopneumovirus

qPCR – verižna reakcija s polimerazo v realnem času (angl. real-time polymerase chain reaction)

RNK – ribonukleinska kislina

RT-qPCR – verižna reakcija s polimerazo v realnem času s predhodno reverzno transkripcijo (ang.: reverse transcription polymerase chain reaction)

S. aureus - *Staphylococcus aureus*

T. pyogenes – *Trueperella pyogenes*

VF-NVI – Veterinarska fakulteta, Nacionalni veterinarski inštitut

VHS – Veterinarsko higienska služba Nacionalnega veterinarskega inštituta

VOLOS – računalniška aplikacija za vodenje centralnega registra govedi

ZDA – Združene države Amerike

skupina Ž – skupina klinično bolnih govedi

skupina Žk – primerjalna skupina klinično bolnih govedi

1 UVOD

Bolezni in obolenja dihal pri govedu povzročajo govedorejski proizvodnji visoke ekonomske izgube. Njihova etiologija je kompleksna, saj na pojav bolezni vplivajo številni patogeni mikroorganizmi ter drugi, večinoma zoohigijski dejavniki.

Etiologija bolezni in obolenj dihal pri teletih in mladem govedu pri nas ni bila celovito obdelana vsaj zadnjih dvajset let. Raziskave, ki so bile opravljene, so bile večinoma usmerjene v ugotavljanje prisotnosti posameznega virusnega povzročitelja. Študija, pri kateri bi bile pri istih živalih obdelane patomorfologija, imunohistokemija, bakteriologija, virologija in molekularna diagnostika respiratornih patogenov, ni bila opravljena, prav tako niso bile opravljene preiskave, ki bi hkrati zajemale večje število patogenov.

V prvem delu raziskave nas jeanimalo, kateri respiratorni patogeni se pojavljajo pri boleznih dihal v slovenskih rejah govedi in kakšna je njihova pojavnost. Želeli smo ugotoviti, kakšne patomorfološke spremembe povzročajo posamezni povzročitelji bolezni dihal pri teletih in poginulem mladem govedu. Zato smo v skupini 116 poginulih govedi sistematično opisali patomorfološke spremembe na pljučih, v njihovih vzorcih pa z imunohistokemičnimi, bakteriološkimi in virološkimi ter molekularnimi diagnostičnimi metodami dokazovali prisotnost respiratornih patogenov. S praktičnega vidika rutinske diagnostike smo želeli ugotoviti, ali so imunohistokemične in molekularne metode v diagnostiki virusnih povzročiteljev bolezni dihal pri govedu enako občutljive.

Ugotovitve iz patološkega dela študije smo želeli dopolniti z informacijami o prisotnosti respiratornih patogenov pri živih, klinično bolnih govedih. Tega smo se lotili z dokazovanjem respiratornih patogenov še v skupini 137 bolnih govedi, ki so kazale klinična znamenja respiratornega obolenja. Pri njih smo za dokazovanje respiratornih patogenov v akutni fazi bolezni odvzeli nosni bris. Na vzorcih nosnih brisov smo izvedli klasično virološko in molekularno diagnostiko. Pri tem smo se na podlagi podatkov iz podobnih raziskav, opravljenih v tujini, osredotočili na ugotavljanje naslednjih respiratornih patogenov: bovini alfaherpesvirus 1 (BoHV-1), bovini respirovirus 3 (BPI3), bovini ortopneumovirus (BRSV), betakoronavirus 1 (BCV), pestivirus A in B (BVDV), bovini adenovirusi (BAdV), *Pasteurella multocida* (*P. multocida*), *Mannheimia haemolytica* (*M. haemolytica*), *Histophilus somni* (*H. somni*), *Trueperella pyogenes* (*T. pyogenes*) in *Mycoplasma bovis* (*M. bovis*).

Namen naloge je bil, da na podlagi ugotovljenih dejstev odgovorimo na naslednja vprašanja:

Kateri od respiratornih povzročiteljev BoHV-1, BPI3, BRSV, BVDV, BAdV, *M. haemolytica*, *P. multocida*, *Trueperella pyogenes* in mikoplazme se pojavljajo pri boleznih dihal v slovenskih rejah govedi ter kakšna je njihova pojavnost?

Kakšne patomorfološke spremembe povzročajo oz. izzovejo posamezni povzročitelji bolezni dihal pri teletih in poginulem mladem govedu?

Ali obstajajo razlike v prevalenci bolezni dihal in njihovih povzročiteljev med slovenskimi pitovnimi in mlečnimi rejami govedi?

Ali so imunohistokemične metode v primerjavi z molekularnimi metodami v diagnostiki virusnih povzročiteljev bolezni dihal pri govedu enako občutljive?

2 PREGLED LITERATURE

2.1 ZGRADBA DIHAL PRI GOVEDU

2.1.1 Anatomske značilnosti dihal pri govedu

Dihala so organski sistem s številnimi funkcijami. Glavni funkciji dihal sta transport in izmenjava plinov v telesu. Dihala sodelujejo pri oglašanju, vohanju, izločanju ter uravnavanju telesne temperature, acidobaznega ravnotežja in krvnega pritiska. Pri izločanju tujkov, npr. s kašljem, imajo tudi varovalno funkcijo. Zelo pomembna je njihova obrambna funkcija, saj makrofagi v pljučih uničujejo tuje agense (Banks, 1993).

V njih potekata tudi metabolizem nekaterih bioaktivnih snovi (serotonin, prostaglandini, kortikosteroidi in levkotrieni) in aktivacija nekaterih biološko aktivnih substanc (npr. angiotenzina) (Lopez, 2011).

Anatomsko k dihalom prištevamo nosnice, nosne in obnosne votline, *nazofarings*, grlo, sapnik, ekstrapulmonalne bronhe in pljuča. Ta so pri govedu močno razčlenjena. Sestavljajo jih levi in desni kranialni reženj, ki sta razdeljena na kranialni in kavdalni del, medialni reženj, levi in desni kavdalni reženj ter akcesorni reženj. Kranialni del desnega kranialnega pljučnega režnja izhaja neposredno iz sapnika t. i. *bronchus trachealis*, kar je posebnost (Rigler, 1987).

2.1.2 Histološka zgradba dihal pri govedu

V vestibularnem delu dihal prehaja koža v sluznico. Lamino epitelijalis sestavlja večskladni neporoženevajoči ploščati epitelij. V sluznici so še pigmentne celice, serozne in mešane žleze, ki sodelujejo pri vlaženju zraka. Večina nosne votline je pokrita z respiratornim epitelijem, ki ga sestavlja večvrstni visokoprizmatični migetalčni epitelij z vrčastimi celicami. V podsluznici so večinoma serozne žleze, ki s svojim sekretom vlažijo zrak, pod njo leži vezivo, ki vrhnje plasti pripenja na hrustanec ali kost (Banks, 1993).

Sapnik ima hrustančno osnovo. Sapnikovo sluznico pokriva večvrstni visokoprizmatični epitelij s posameznimi vrčastimi celicami. Epitelijske celice imajo cilije, ki so osrednji del mukociliarnega aparata. Lamina proprija in tunika submukoza imata tipično zgradbo. Mišična plast je dobro razvita le v dorzalnih delih sapnika, kjer oblikuje mišico, ki jo na več mestih lahko prekinejo paketi mukoznih žlez. V ventralnih delih sapnika pa jo nadomešča plast elastičnih vlaken (Banks, 1993).

V primarnih intrapulmonalnih bronhijih so elastična vlakna sestavni del lamine proprije, gladke mišične celice pa tvorijo tuniko muskularis. Večji primarni bronhi se delijo v manjše sekundarne in terciarne bronhe. V submukozi sekundarnih bronhov je količina kolagenih

vlaknen zmanjšana, poveča pa se količina razvejičenih tubuloalveolarnih mukoznih ali seromukoznih žlez (Banks, 1993).

V bronhiolah je lamina epitelijalis mukoze iz enoskladnega kubičnega ali visokoprizmatičnega epitelija, brez vrčastih celic, število cilij pa je manjše kot v bronhih. Bronhioli imajo vse plasti cevastih organov, v njihovih stenah ni hrustanca. Terminalni bronhiol se razvejiči v več respiratornih bronhiolov, v katerih poteka izmenjava plinov. Njihova lamina epitelijalis mukoze je iz kubičnega enoskladnega epitelija, ki ga na več mestih prekinjajo alveole. Cilije imajo le še posamezne epitelijske celice. Respiratorni bronhioli niso stalnica pri govedu, če manjkajo, se terminalni bronhioli odprejo v alveolarne duktuse (Banks, 1993).

Izmenjava plinov pri vseh sesalcih poteka v alveolah, do katerih vodijo alveolarni duktusi. Površino alveol pokrivata dva tipa epiteljskih celic: pnevmociti tipa I (membranski pnevmociti) in pnevmociti tipa II (granularni pnevmociti) (Banks, 1993).

Pnevmociti tipa I so ploščate celice, njihovo jedro je izbočeno v lumen same alveole in vidno s svetlobnim mikroskopom. Njihova osnovna funkcija je, da omogočajo prehajanje plinov (Banks, 1993; Caswell in Williams, 2016).

Pnevmociti tipa I pokrivajo približno 93 % površine alveol. So zelo diferencirane celice in nimajo mitotičnega potenciala. V primeru ireverzibilne poškodbe pride do odlučanja bazalne membrane v sam lumen alveole. Temu sledijo hitri regenerativni procesi, ki jih vodijo pnevmociti tipa II. Čeprav se zdi vloga pnevmocitov tipa I bolj pasivna, pomembno skrbijo pri vzdrževanju normalne sestave alveolarne tekočine (Caswell in Williams, 2016).

Pnevmociti tipa II so sekretorni del epitelija alveol. S svetlobnim mikroskopom so vidni kot okroglaste ali kuboidalne celice, ki štrlijo v lumen samih alveol (Banks, 1993; Caswell in Williams, 2016).

Ultramikroskopsko imajo v svojem apikalnem delu mikrovile in zanje značilno citoplazemsko osmiofilno celično strukturo, imenovano lamelarno telo. Lamelarno telo je skladišče surfaktanta, katerega proizvodnja je tudi njihova primarna funkcija. Poleg tega imajo pnevmociti tipa II tudi mitotični potencial in skrbijo za obnovo alveolarnega epitelija (Caswell in Williams, 2016).

Iz njih lahko nastanejo tako pnevmociti tipa I kot tudi pnevmociti tipa II (Banks, 1993).

Kot del funkcionalne celote so pnevmociti tipa II s pnevmociti tipa I med seboj speti s tesnimi celičnimi stičnicami (Banks, 1993).

Fosfolipid surfaktant je sekrecijski produkt pnevmocitov tipa II in je kemično dipalmitoil-fosfatidilholin. Njegova funkcija je, da uravnava površinske napetosti pri raztezanju in krčenju alveol, s čimer ščiti njihovo steno (Banks, 1993; Lopez, 2011).

Krvno-zračna bariera je sestavljena iz alveolarnih celic, alveolarne bazalne membrane, alveolarnega septuma, bazalne membrane endotelija in endotelijskih celic kapilar. Njena debelina je spremenljiva in znaša od 0,1 do 1,5 mikrometra (Banks, 1993; Lopez, 2011).

2.1.3 Obrambni mehanizmi dihal

Dihala so zaradi svoje odprtosti do zunanjega okolja (prek zgornjih dihal) in notranjega okolja (prek cirkulacijskega sistema) neprestano izpostavljena številnim potencialno škodljivim dejavnikom. Med te spadajo mikroorganizmi, toksični delci in plini, ki pridejo v pljuča z vdihanim zrakom ali skozi obtočila. Za preprečevanje škodljivega delovanja naštetih agensov ima respiratorni sistem več različnih obrambnih mehanizmov, ki večinoma učinkovito preprečijo njihovo škodljivo delovanje (Banks, 1993).

Ob vdihu se vdihani zrak zaradi anatomske zgradbe nosnih školjk, sapnika in bronhov zavrtinči, zaradi česar tok zraka v njem lebdeče delce učinkoviteje potisne ob stene zgornjih dihal, kjer se ti zalepijo na mukozni film sluznice. Od tam jih mukociliarni aparat sapnika, bronhov in bronhiolov s svojim nepretrganim gibanjem požene v smeri proti žrelu, kjer jih žival pogoltne in se odstranijo v prebavila. Sluzasti film, ki prekriva površino zgornjih dihal, proizvajajo vrčaste celice. Sluz vsebuje tudi obrambne molekule (defenzine, lizocim, imunoglobuline razreda A), ki delujejo protimikrobno. Tako se iz vdihanega zraka učinkovito odstranjujejo delci, večji od 5 mikrometrov. Manjši delci večinoma obidejo mukociliarni aparat in se znajdejo v alveolah, kjer jih alveolarni makrofagi fagocitirajo, migrirajo do bronhiolov in jih predajo mukociliarnemu aparatu (Tizard, 2009).

Druga možnost za odstranitev škodljivih delcev je endocitoza prek alveolarnih celic tipa I. Ko so odstranjene snovi v interalveolarnem intersticiju, se iz pljuč odplavijo z limfo, lahko pa jih odstranijo makrofagi interalveolarnega intersticija. Sterilnost alveol je posledica delovanja makrofagov in njihove sposobnosti izločanja citokinov. Delovanje makrofagov je okrepljeno s protitelesno obrambo, zlasti s protitelesi razreda IgG. Surfaktant, ki pokriva površino alveolarnih celic, ima tudi pomembne opsonizacijske funkcije. Poleg naštetega so na površini alveol prisotni lizocim, laktoferin in komplement, ki sodelujejo pri odstranjevanju tujih snovi iz alveol (Dungworth, 1993; Lopez, 2011).

V pljučih so štiri vrste makrofagov: alveolarni makrofagi, intersticijski makrofagi, intravaskularni makrofagi in plevralni makrofagi ter dendritične celice (Caswell in Williams, 2016).

Večina škodljivih delcev, ki zaide v zgornje dihalne poti, se prek mukociliarnega aparata odstrani v nekaj urah, iz spodnjih dihalnih poti pa v 24 urah. Ali bodo škodljivi delci odstranjeni iz respiratornega sistema in kje bodo odstranjeni, je odvisno predvsem od njihove velikosti. Večji kot so delci, uspešnejša je njihova odstranitev iz zgornjih dihal. Tako se večina delcev, ki so v premeru večji od 10 μm , prilepi na sluznico že v grlu. Če so vdihani delci manjši od 10 μm , je možnost, da bodo prodrli v pljuča, bistveno večja. Za pljučno ravnovesje so kritični delci, ki so veliki 1 do 2 μm . Takšni delci vdirajo globlje v pljuča in se usedajo v predel bronhioalveolarnega stika (Banks, 1993).

Zaradi izpostavljenosti zunanjim dejavnikom najdemo v sluznicah dihal dobro razvito limfatično tkivo. Tega razdelimo na mesta, kjer poteka prepoznavanje antigena (indukcijska mesta), in na mesta, kjer se razvijeta protitelesni in celični imunski odziv (efektorska mesta) (Tizard, 2009).

Sluznicam pridruženo limfatično tkivo (MALT; Mucosa-Associated Lymphoid Tissues) vsebuje vse vrste celic, ki sodelujejo v začetni fazi imunskega odziva (limfocite B, limfocite T, dendritične celice, makrofage). Tako organizirano limfatično tkivo najdemo v nosni sluznici, tonzilah, žrelu, v nebni sluznici, ob bronhih in kot difuzno razsejane limfocite, ki se pojavljajo po celotnih pljučih (Tizard, 2009).

Za začetno fazo imunskega odziva so zelo pomembne tonzile, čeprav so posamezni mikrobi razvili posebne mehanizme, ki obidejo obrambni mehanizem tonzil in jih celo uporabljajo za vdorno mesto v organizem (npr. BoHV-1, *Mannheimia haemolytica*) (Dungworth, 1993; Tizard, 2009; Caswell, 2016).

Imunoglobulini, ki jih najdemo v zgornjih dihalih, so pretežno razreda A. Sekret v bronhiolih in v alveolah vsebuje relativno veliko protiteles razreda G. V zgornjih dihalih najdemo še protitelesa razreda E (Tizard, 2009).

Če sta mukociliarni aparat in bronhialna tekočina najučinkovitejši prirojeni obrambni mehanizem prevodnega sistema, so makrofagi najučinkovitejši obrambni mehanizem tistega dela dihal, v katerem poteka izmenjava plinov (Dungworth, 1993).

Pljuča govedi, tako kot pri večini vrst domačih živali (prašiči, konji, ovce, koze, mačke), v nasprotju s človekom, z glodavci in s psi vsebujejo velike količine intravaskularnih makrofagov, zato lahko prek pljuč iz krvi odstranijo velike količine mikroorganizmov (Tizard, 2009).

2.2 GOVEJI RESPIRATORNI BOLEZENSKI KOMPLEKS

2.2.1 Splošno o govejem respiratornem bolezenskem kompleksu

Bolezni dihal so najpomembnejša skupina bolezni pri mladem govedu in govedorejski proizvodnji po vsem svetu povzročajo visoke ekonomske izgube. Njihova etiologija je kompleksna, saj na njihov pojav vplivajo številni dejavniki. Zaradi neenotne etiologije, ki se manifestira v podobnih kliničnih in patomorfoloških slikah, se je uveljavil pojem govejega ali bovinega respiratornega bolezenskega kompleksa (bovine respiratory disease complex, BRDC), v zadnjem času tudi pojem bovine respiratorne bolezni (bovine respiratory disease, BRD) (Lillie, 1974; Gagea in sod., 2006; Taylor in sod., 2010).

Neposredne izgube zaradi BRDC nastajajo zaradi manjšega prirasta obolelih živali, stroškov zdravljenja in poginov obolelih živali. BRDC predstavlja v govejih pitališčih približno 75 % celotne zdravstvene problematike, nanj pa odpade približno 50 do 70 % vseh poginov (Gagea in sod., 2006; Brooks in sod., 2011).

Pri teletih znaša delež poginov zaradi bolezni dihal približno 20 % celokupnega pogina, pri telicah v vzreji pa približno 50 % vseh poginov. Velika ekonomska škoda nastaja tudi zaradi

zdravljenja bolezni dihal in slabega prirasta kronično obolelega goveda (Gagea in sod., 2006; Brooks in sod., 2009).

Posredne izgube zaradi BRDC nastajajo zaradi slabših reprodukcijskih sposobnosti plemenskih živali, zmanjšane mlečnosti pri ženskih živalih, slabših klavnih lastnosti, slabše kakovosti trupa idr. (Gagea in sod., 2006; Snowden in sod., 2007; Garcia in sod., 2010).

Ocenjujejo, da znaša škoda v ZDA zaradi pojavov BRDC okrog 800 do 900 milijonov dolarjev letno, vanjo pa so vštete izgube zaradi poginov, slabših prirastov obolelih živali in stroškov zdravljenja (Brooks in sod., 2009).

Snowden s sodelavci (2006) je ocenil povprečne ekonomske izgube zaradi slabših prirastov in stroškov zdravljenja. Letna izguba v povprečnem pitališču s 1000 govejimi pitanci naj bi v povprečju znašala 13,90 ameriškega dolarja na žival (Snowden in sod., 2006).

BRDC povzroča visoke ekonomske izgube tudi v slovenskih rejah govedi. Na podlagi izkušenj s področja patomorfološke diagnostike na Nacionalnem veterinarskem inštitutu Veterinarske fakultete (VF-NVI) ocenjujemo, da predstavljajo pogini zaradi BRDC pri mladem slovenskem govedu približno tretjino celotne mortalnosti.

Večina izgub je vezanih na čas po prispetju telet v pitališče.

Največ izgub v govejih pitališčih naj bi bilo v prvih 45 dneh po prispetju v pitališče. Loneragan in sod. (2001) in Buhman s sodelavci (2000) so ugotovili, da je ta čas krajši in da je 91 % vseh telet z BRDC zbolelo v prvih 27 dnevih po prispetju v pitališče.

2.2.2 Etiologija in patologija govejega respiratornega bolezenskega kompleksa

Pojav BRDC lahko povzročijo številni različni etiološki dejavniki. Včasih se pojavljajo samostojno, najpogosteje pa se pojavlja več dejavnikov hkrati. Zato pravimo, da je etiologija BRDC kompleksna. Kje bo poškodba v respiratornem traktu in kakšna bo, je odvisno od vrste, količine in mesta delovanja etiološkega dejavnika. Poleg narave in množine etiološkega dejavnika je pomembna še dovzetnost oz. odpornost tkiva gostitelja (Kovács, 1990; Dungworth, 1993; Taylor in sod., 2010).

Kakšne spremembe bodo nastale po delovanju etiološkega dejavnika, je predvsem odvisno od vdornega mesta etiološkega dejavnika. Za pojav BRDC je najpomembnejši aerogeni vnos etioloških dejavnikov v telo. Na splošno velja, da so nosni prehodi in zgornje dihalne poti bolj izpostavljeni škodljivemu delovanju večjih dražečih delcev in lahko topnih škodljivih plinov. Spodnje dihalne poti pa so bolj izpostavljene škodljivemu delovanju majhnih delcev, težje topnih škodljivih plinov in kužnih agensov, ki imajo afiniteto do bronhiolarnega in alveolarnega epitelijskega tkiva. Najobčutljivejše mesto za vdor infekcijskih agensov v dihala je bronhiolarno-alveolarni stik. Zato imamo pri virusih, ki kažejo tropizem do epitelijskih celic terminalnih bronhiolov kot tudi do alveolarnih celic tipa II, opravka z mešano sliko pljučnice, t. i. bronhointersticijsko pljučnico. Posledica replikacije virusa v teh celicah je vnetna reakcija tako

v terminalnem bronhiolu kot tudi v intersticiju proksimalnega dela pljučnega acinusa (Dungworth, 1993).

Odgovor respiratornega sistema na poškodbo kot tudi sam potek bolezni sta precej odvisna od strukturne in funkcionalne kompleksnosti respiratornega sistema. Ta je zaradi svoje odprtosti do zunanjega okolja (prek zgornjih dihal) in notranjega okolja (prek cirkulacijskega sistema) neprestano izpostavljen številnim potencialnim škodljivim agensom. Med te spadajo mikroorganizmi, toksični delci in plini v vdihanem zraku ter sama nosno-žrelna mikroflora, ki je sicer normalno prisotna. Poleg zunanjega vnosa so zelo pomembni številni infekcijski in toksični agensi, ki prek obtočil zaidejo v pljuča (Dungworth, 1993; Lopez, 2011).

Za preprečevanje škodljivega delovanja naštetih agensov ima respiratorni sistem več različnih obrambnih mehanizmov, ki večinoma učinkovito preprečijo škodljivo delovanje etiološkega agensa. Njihov namen je zaščititi zelo občutljivi alveolarni pljučni parenhim pred poškodbami. Ali bodo škodljivi delci odstranjeni iz respiratornega sistema in kje bodo odstranjeni, je odvisno predvsem od njihove velikosti. Na splošno velja, da večji kot so delci, uspešnejša je njihova odstranitev iz zgornjih dihal. Tako se delci, ki so v premeru večji od 10 μm , skoraj popolnoma usedejo v grlu. Delci, manjši od 10 μm , se najprej srečajo s celicami nosne sluznice in nazofaringsa. Zato tudi pri večjem številu virusnih in bakterijskih bolezni, preden vdrejo v nižje ležeče dele dihal ali pa vdrejo v sistem, najprej prihaja do replikacije virusov oziroma razmnoževanja bakterij v epitelijskih celicah ali limfatičnem tkivu zgornjih dihal. Z manjšanjem velikosti vdihanih delcev pod 10 μm se večja možnost, da bodo prodrli v sama pljuča. Kritična točka za pljučno ravnovesje so velikosti škodljivih delcev okrog 1 do 2 μm . Takšni delci vdirajo globlje v pljuča in se usedajo v predelu bronhioalveolarnega stika. Poleg nespecifičnih obrambnih mehanizmov je vzdolž zgornjih dihalnih poti posejano limfatično tkivo, ki je ob zgornjih dihalih najmočneje razvito v tonzilarnem predelu (Dungworth, 1993; Lopez, 2011).

Alveolarni obrambni mehanizmi za odstranjevanje majhnih delcev temeljijo na fagocitozi alveolarnih makrofagov. Ti so v določeni množini prisotni ob alveolah in v njih. Včasih makrofagi s fagocitiranim materialom migrirajo do bronhiolov in se iz dihal odstranijo prek mukociliarnega aparata. Mehanizem tega centripetalnega gibanja ni natančno poznan. Druga možnost za odstranitev škodljivih delcev je z endocitoz prek pnevmocitov tipa I. Ko so tako odstranjene snovi enkrat v interalveolarnem intersticiju, se iz pljuč odplavijo z limfo ali jih požrejo makrofagi interalveolarnega intersticija. Sterilnost alveol je posledica fagocitne sposobnosti makrofagov in njihove sposobnosti procesiranja in predstavljanja antigenov ter izločanja citokinov. Delovanje makrofagov je tesno povezano in okrepljeno s protitelesno obrambo, s protitelesi razreda G. Surfaktant, snov, ki pokriva površino alveolarnih celic, ima tudi pomembne opsonizacijske funkcije. Poleg naštetega so v alveolarnem filmu prisotni lizocim, laktoferin in komplement, ki vsak s svojimi efektorskimi mehanizmi doprinesejo k nevtralizaciji in uničenju tujkov (Dungworth, 1993; Lopez, 2011).

Etiološke dejavnike za pojav BRDC posamezni avtorji različno razvrščajo v skupine, najpogosteje pa jih delijo na: dejavnike, ki izhajajo iz okolja, dejavnike, ki izhajajo iz organizma gostitelja, in biološke etiološke dejavnike.

2.2.2.1 Dejavniki okolja

V prvi skupini so dejavniki okolja, ki s svojim vplivom predisponirajo pojav bolezni. Večinoma škodljivo vplivajo ali slabijo obrambne mehanizme gostitelja. Različni stresni dejavniki (transport živali, prestavljanje živali, veterinarski posegi idr.) slabijo delovanje obrambnih mehanizmov (Kovacs, 1990; Dungworth, 1993; Taylor in sod., 2010).

Neustrezne mikroklimatske razmere so najpomembnejši okoljski etiološki dejavnik za pojav BRDC. Pri tem imajo pomembno vlogo: povečana količina prašnih delcev v zraku, neustrezna temperatura zraka, neustrezna relativna in absolutna vlažnost zraka, neustrezno gibanje zraka, povečana prisotnost škodljivih plinov v zraku, kot so amoniak, metan, ogljikov dioksid, vodikov sulfid idr. (Kovacs, 1990; Dungworth, 1993; Taylor in sod., 2010).

Povečane koncentracije škodljivih plinov povzročijo draženje in povečano sekrecijo žlez in motnje v funkciji mukociliarnega aparata, prašni delci pa so lahko prenašalci kužnih agensov. Stresni dejavniki povzročajo zaradi tvorbe stresnih hormonov zmanjšanje fagocitne aktivnosti obrambnih celic in slabo vplivajo na imunost (Griffin, 1989; Dungworth, 1993; Carroll in Forsberg, 2007).

2.2.2.2 Dejavniki, ki izhajajo iz organizma gostitelja

S temi dejavniki je bodisi možno razložiti povečano dovzetnost govedi za okužbe dihal (anatomske značilnosti) bodisi neposredno vplivajo na pojav in potek bolezni dihal (nespecifična in specifična obramba) (Tizard, 2009).

V primerjavi z mesojedi in s konji so pljuča pri govedu z veznim tkivom izrazito razdeljena na posamezne pljučne režnjiče. Vsak od teh predstavlja funkcionalno celoto, saj je vsak posamezni pljučni režnjič vezan na svoj bronhij s pripadajočimi krvnimi žilami (Dungworth, 1993).

Tako je upočasnjeno ali celo onemogočeno širjenje infekta z enega pljučnega režnjiča na drugega. Zaradi odsotnosti kolateralnega ventilacijskega sistema pri govedu okvara posameznega bronhija zmanjša ventiliranost pripadajočega pljučnega režnjiča. Ob popolni obstrukciji takšnega bronhija pride do popolne atelektaze tega režnjiča, kar je pri govedu pogost pojav (Dungworth, 1993).

Poleg tega ima govedo v primerjavi z drugimi domačimi živalskimi vrstami manjšo alveolarno površino. Tudi volumen prsnega koša pri teletih je relativno manjši v primerjavi z mladiči

drugih vrst velikih domačih živali. Zaradi tega je rezidualna kapaciteta pljuč manjša, pojav pljučne atelektaze pa pogostejši (van Bömmel, 2000).

2.2.2.3 Biološki etiološki dejavniki govejega respiratornega bolezenskega kompleksa

V literaturi je opisana cela vrsta povzročiteljev iz vrst virusov in bakterij, ki lahko povzročajo pnevmonična obolenja v sklopu BRDC. Od virusnih povzročiteljev literatura najpogosteje navaja naslednje viruse: bovini alfaherpesvirus 1 (BoHV-1), bovini respirovirus 3 (BPI 3), bovini ortopneumovirus (BRSV), Pestivirus A in B (BVDV) in bovini adenovirusi (BAdV). Od bakterijskih povzročiteljev bolezni dihal so najpogosteje omenjene naslednje bakterije: *Pasteurella multocida multocida* (*P. multocida*), *Mannheimia haemolytica* (*M. haemolytica*), *Histophilus somni* (*H. somni*), *Trueperella pyogenes* (*T. pyogenes*), *Mycoplasma bovis* (*M. bovis*), *Mycoplasma dispar* (*M. dispar*), *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Streptococcus* spp., *Escherichia coli* (*E. coli*) in *Salmonella* spp. (Lillie, 1974; Autio in sod., 2007; Booker in sod., 2008).

2.2.2.3.1 Bovini alfaherpesvirus 1 (Bovini herpes virus tipa 1, BoHV-1)

Bovini alfaherpesvirus 1 (BoHV-1) pri govedu primarno povezujemo s kliničnim sindromom rinotraheitisa, pustularnega vulvovaginitisa in balanopostitisa, z abortusi, neplodnostjo, s konjunktivitisi in z encefalitisi (Dungworth, 1993; Lopez, 2011).

Številni avtorji BoHV-1 opisujejo tudi kot enega od etioloških dejavnikov za pojav BRDC (Ellis in sod., 2009; Hodgins in sod., 2002; Nuotio in sod., 2007; Taylor in sod., 2010; Jones in Chowdhury, 2010).

BoHV-1 je razvrščen v družino Herpesviridae, v kateri se nahajajo herpesvirusi ptic, sesalcev in plazilcev. BoHV-1 spada v poddružino Alphaherpesvirinae, rod Varicellovirus. Herpesvirusni virion je sestavljen iz dvojne linearne DNK (dsDNK) molekule, kapside in lipoproteinske ovojnice. Virioni merijo v premeru od 120 do 250 nm. Njihova nukleokapsida ima ikozaedrično obliko, sestavljeno iz 162 kapsomer. Herpesvirusi se replicirajo v jedru gostiteljevih celic, kar povzroči nastanek eozinofilnih intranuklearnih inkluzij (MacLachlan in Dubovi, 1999).

BoHV-1, ki povzroča infekciozni bovini rinotracheitis (IBR), je serološko identičen virusu, ki povzroča pri ženskih živalih infekciozni pustularni vulvovaginitis (IPV), pri moških živalih pa infekciozni balanopostitis (IBP). Razlike med navedenimi izolati najdemo v nukleotidnem zaporedju virusne DNA. Kljub temu se navedeni izolati med seboj razlikujejo v molekularni zgradbi (Rijsewijk in sod., 1999).

IBR je akutna nalezljiva bolezen goveda, ki se kaže v vnetju zgornjih dihalnih poti, sapnika in očesnih veznic. Bolezen je razširjena skoraj po vsem svetu. Klinično se bolezen izraža pri pitovnem govedu, manj pri govedu v mlečnih rejah (Dungworth, 1993; Nuotio, 2007).

Glavni vir okužbe so: nosni izcedki, aerosol iz dihal, izcedki iz genitalij, seme, plod in njegova tkiva (Nandi in sod., 2009).

Klinično se bolezen kaže z vročino, s kašljem in seroznim izcedkom iz nosu. Solzenje je pogosto. Če bolezen traja dlje časa, nosni izcedek preide v mukopurulentnega, pridružijo se znaki dispneje. Patomorfološka slika je odvisna od tega, ali gre za čisto infekcijo z virusom ali so se tej pridružile bakterije. Pri čisti virusni infekciji najdemo seromucinozni rinotraheitis in konjunktivitis. Pri hujših oblikah s sekundarno bakterijsko infekcijo najdemo na sluznici sapnika mukopurulentni eksudat, krvavitve, erozije, celo ulceracije. Spremembe so najhujše v predelu grla, žrela in sapnika. Od bakterij se v teh primerih najpogosteje pridružijo bakterije iz rodov *Mannheimia* sp., *Pasteurella multocida* spp., *Mycoplasma* spp. in *Fusobacterium necrophorum* (*F. necrophorum*) (Dungworth, 1993; Lopez, 2011).

Pljuča pri milejši obliki bolezni niso prizadeta. V hujših primerih, ko virus močno prizadene obrambno sposobnost dihal, pogosto ugotovimo sekundarne bakterijske infekcije pljuč. V teh primerih se pojavi huda fibrinozna pnevmonija ali plevropnevmonija. V primerih zamašitve dihalnih poti z eksudatom pride do intersticijskega emfizema pljuč. Pri fulminantni obliki bolezni sekundarna bakterijska infekcija nima nobene vloge/ Pri tej obliki virus povzroči nekrotični bronhitis, bronchiolitis, v alveolah pa najdemo serofibrinozni eksudat. (Dungworth, 1993; Lopez, 2011).

Pri novorojenih teletih obstaja posebna, t. i. generalizirana oblika bolezni. Takšna teleta imajo vročino, nosni in očesni izcedek, so pobita, anoreksična in imajo težave pri dihanju. Zaradi hudih vnetnih sprememb v predelu žrela včasih klinično ugotovimo laringealni stertor. Patomorfološko ugotovimo rinitis in erozivni faringitis. Lahko je prizadet tudi epiglotis. Preostali deli dihal so neprizadeti. Pri tej obliki najdemo najhujše patološke spremembe na sluznici požiralnika in predželodcev, ki so pokriti z nekrotičnimi, mlečnim sesirkom podobnimi oblogami. Nekroza sega vse do proprije, v kateri najdemo intenzivno nevtrofilno infiltracijo (Dungworth, 1993; Lopez, 2011).

Patohistološke spremembe so odvisne od poteka bolezni. Pri milejših oblikah najdemo na sluznicah zgornjih dihal serozno do mukopurulentno vnetje s posameznimi nekrozami epitelijskih celic. Pri malignem poteku bolezni najdemo obsežne nekroze sluznic pokrite s fibrinskimi oblogami. Izrazita je tudi infiltracija z nevtrofilnimi granulociti in mononuklearnimi celicami. Včasih v epitelijskih celicah sluznice dihal lahko vidimo acidofilne intranuklearne inkluzije, predvsem v tkivih, fiksiranih s kislimi fiksativi. Inkluzije so značilne le za obdobje od 2 do 3 dni po infekciji, zato jih vidimo večinoma le pri eksperimentalno okuženih živalih (Dungworth, 1993; Lopez, 2011).

V ohranjenih epitelijskih celicah ob robu sprememb lahko najdemo intranuklearne inkluzije. V limfatičnem sistemu zgornjih dihal tako prizadetih telet ugotovimo akutni limfadenitis s fokalno kortikalno nekrozo. Nekrotična žarišča lahko ugotovimo tudi v ledvicah, vranici in jetrih. V

jetrih so žarišča povečini velika 1 do 2 mm in so ponavadi omejena na desni jetrni reženj (Dungworth, 1993; Lopez, 2011).

2.2.2.3.2 *Bovini respirovirus 3 (Bovini virus parainfluenze tipa 3, BPI-3)*

Bovini respirovirus 3 (BPI-3) je skupaj s humanim respirovirusom tipa 3 (HPI-3) razvrščen v red *Mononegavirales*, v družino *Paramyxoviridae*, v rod *Respirovirus* (Collins in sod., 1996; Alexander in sod., 2000).

Virioni, značilni za družino *Paramyxoviridae*, so pleomorfne oblike, sferični do filamentozni, veliki okrog 150 do 350 nm. Njihov genom predstavlja negativno orientirana enojna vijačnica RNK velikosti od 13 do 19 kbp. Virioni imajo lipoproteinsko ovojnico z glikoproteinskimi izrastki (MacLachlan in Dubovi, 1999).

BPI3 lahko pri govedu povzroča akutno respiratorno bolezen. BPI3 lahko povzroči pljučnico kot samostojni etiološki dejavnik, pogosteje pa je skupaj z drugimi respiratornimi patogeni (Lillie in sod., 1974; Dungworth, 1993; Tegtmeier in sod., 1999; Fulton in sod., 2009; Härtel in sod., 2004; Booker in sod., 2008; Autio in sod., 2007; Lopez, 2011).

Ena od najpomembnejših determinant patogenosti BPI3 je sposobnost replikacije v alveolarnih makrofagih. S tem ko virus invadira makrofage, zmanjša njihovo fagocitno sposobnost ter sposobnost tvorbe intracelularnih radikalov, s tem pa je prizadeta baktericidna obramba alveol (Dungworth, 1993).

Čista okužba z BPI3 lahko poteka klinično inaparentno, možni pa so tudi kašelj, rahlo povišana temperatura, tahipneja in mukozno do mukoznognojen izcedek iz nosu. Čista virusna infekcija se najpogosteje pojavlja pri teletih, starih od 2 tednov do nekaj mesecev, in ne povzroča poginov (Dungworth, 1993).

Sicer pa lahko BPI3 povzroči bronhointersticijsko pljučnico. Zgodnje patomorfološke spremembe so omejene na atelektatična do konsolidirana škrlatno rdeča žarišča na kranioventralnih delih pljuč. Če bolezen traja dlje, žarišča med seboj konfluirajo. BPI3 se replicira v epitelijskih celicah sluznice dihalnih poti. V pljučih se replicira v alveolarnih celicah tipa II in v makrofagih. V hudih primerih bolezni patohistološko ugotovimo akutni bronhitis in bronhiolitis. Vnetni proces se pozmeje razširi tudi na alveole. Bronhiolarni in alveolarni eksudat je sestavljen pretežno iz nevtrofilcev; prisotni so tudi edem in krvavitve. Od 2 do 4 dni po infekciji je bronhiolarni epitelij ponekod hiperplastičen, vakuoliziran in nekrotičen. V tej fazi lahko najdemo intracitoplazemske inkluzije v vakuoliziranih epitelijskih celicah bronhiolov, lahko pa tudi bronhov. Redkeje najdemo inkluzije v alveolarnih celicah tipa II. BPI3 ima namreč v svoji ovojnici F-glikoprotein, ki je sposoben spajati (cell fusion; fuzija celic) plazmamembrano celic gostiteljic. Zato je možno, da v bronhiolih včasih najdemo večjedrne celice. Eksudat v bronhiolih in alveolah je sestavljen iz makrofagov, limfocitov, nevtrofilcev in serofibrinoznega materiala. Zaradi bronhiolarne obstrukcije so alveole atelektatične. Limfociti in plazmatke se zbirajo okrog krvnih žil, bronhiolov in v alveolarnih septih. Največjo celičnost

vnetnih sprememb ugotovimo približno od 6 do 12 dni po infekciji, ko lahko vidimo hiperplazijo bronhiolarnega epitelija in alveolarnih celic tipa II. Zgodnji obliterirajoči bronhiolitis lahko ugotovimo že, ko so pnevmonične spremembe na vrhuncu, pogosteje pa pri sekundarnih bakterijskih invazijah. Kako hude in kako obsežne bodo poškodbe alveol, je odvisno od virulence virusa, načina inokulacije in imunosti gostitelja. Na splošno pa velja, da so poškodbe pljuč pogostejše in hujše pri eksperimentalnih okužbah kot pri naravni okužbi. Pri naravnih okužbah so večinoma bolj prizadeti bronhi in bronhioli kot pa pljuča (Dungworth, 1993; Lopez, 2011).

2.2.2.3.3 *Bovini orthopneumovirus (Bovini respiratorni sincicijski virus BRSV)*

Bovini orthopneumovirus (BRSV) je danes priznan kot najpogostejši virusni etiološki dejavnik BRDC (Larsen in sod., 2001). BRSV je uvrščen v red *Mononegavirales*, v družino *Pneumoviridae*, v rod *Orthopneumovirus*. Za viruse iz družine *Pneumoviridae* je značilno, da njihov genom predstavlja negativno usmerjena nesegmentirana enojna vijačnica RNK, njena velikost je od 13 do 18 kbp. Virioni so obdani z ovojnico in pleomorfne oblike: od okroglastih s premerom okrog 150 nm do filamentoznih, ki lahko dosežejo dolžino do 5 µm in imajo premer od 60 do 100 nm (MacLachlan in Dubovi, 1999; Valarcher in Tylor, 2007).

V družino *Pneumoviridae* spadajo še drugi sorodni respiratorni virusi: humani ortopneumovirus (HRSV) in mišji respiratorni sincicijski virus (PVM) (Valarcher in Taylor, 2007).

Virulentni sevi virusa so najpogosteje opisani kot sinergistični infekcijski agensi pri pojavu BRDC, vendar je virus tudi sam sposoben povzročati izbruhe respiratornih bolezni, pri čemer so možni posamezni pogini živali, predvsem mlajših od enega leta (Dungworth, 1993; Lopez, 2011; Blodörn in sod., 2015).

Pogosto se infekciji z BRSV pridruži sekundarna bakterijska infekcija. *P. multocida*, *M. haemolytica* in *H. somni* so najpogosteje izolirane bakterije iz pljuč z BRSV naravno okuženih telet (Viuff in sod., 1996).

Naravni gostitelj BRSV je govedo, vendar ga lahko najdemo tudi pri ovcah, kozah, bizonih, gamsih in kamelidih. Virus je bil prvič izoliran v Švici. Temu so sledili dokazi o izbruhih virusa v Belgiji, Veliki Britaniji, na Japonskem in v ZDA. Danes je BRSV geografsko zelo razširjen in ga najdemo v Evropi, Ameriki in Aziji (Valarcher in Taylor, 2007).

Virus se najprej replicira v epiteljskih celicah nosne sluznice, nato se razširi po bronhialnem drevesu do bronhiolov in alveol. Inkubacijska doba je od 2 do 5 dni. Okužba je klinično lahko inaparentna, omejena na zgornja dihal; lahko se razširi na spodnja dihal. Glavni klinični znaki infekcije zgornjih dihal so kašelj, seromukozni izcedek iz nosu in oči ter tahipneja. Pri hujši sliki bolezni se lahko pojavijo neješčnost, zmerna pobitost, padec mlečnosti pri molznicah, povišana telesna temperatura, polipneja (frekvenca dihanja več kot 60 na minuto) in ekspiratorna dispneja (Valarcher in Taylor, 2007).

Pri hudo prizadetih živalih, kjer so prizadeta spodnja dihalna, se pojavi dispnoično dihanje z odprtim gobcem, iztegnjenim jezikom, s slinjenjem in prisilnim dihanjem (Dungworth, 1993; Lopez, 2011).

BRSV povzroči hudo obliko bolezni pretežno pri teletih, vendar lahko tudi pri odraslem govedu. Če večina govedi v neki čredi še nikoli ni prišla v stik z BRSV, se bolezen pojavi pri govedu vseh starosti te črede. Če so bolezenski znaki prisotni samo pri mladih teletih, kažejo na to, da virus kroži znotraj črede (Valarcher in Taylor, 2007).

Bolezen se v zmernem temperaturnem pasu najpogosteje pojavlja jeseni ali zgodaj pozimi. Najobčutljivejše so pozno odstavljenе mlade živali (Dungworth, 1993), obolevnost živali je zelo visoka, smrtnost pa od 0 do 20 % (Viuff in sod., 1996).

Seroprevalenca pri govedu je visoka in se giblje med 30 in 70 %. BRSV naj bi bil odgovoren za približno 60 % izbruhov respiratornih obolenj v mlečnih čredah govedi in za približno 70 % izbruhov v mesnih čredah govedi (Valarcher in Taylor, 2007).

Okužba telet v bioloških poskusih ne daje vedno klinične slike bolezni. Večinoma so pri poskusnih teletih zaznali samo milo klinično sliko brez patoloških sprememb. Šele z več dni zapored ponavljajočo se intratrahealno okužbo so nekateri avtorji uspeli pri poskusnih teletih povzročiti zmerno do hudo bolezensko sliko (Tjørnehøj in sod., 2003).

Maternalna protitelesa deloma zaščitijo mlada teleta pred klinično zaznavno obliko bolezni (Valarcher in Taylor, 2007).

Opisani so primeri pojava bolezni pri govedu, ki je bilo cepljeno z inaktiviranimi cepivi proti BRSV (Schreiber in sod., 2000).

Bolezen se med živalmi prenaša z direktnim stikom ali aerosolom, omenjajo pa tudi možnost prenosa bolezni prek človeka kot pasivnega prenašalca virusa (Valarcher in Taylor, 2007).

Valarcher s sodelavci (2001) je uspel dokazati, da virus lahko perzistira v pljučnih bezgavkah živali, ki so prebolele okužbo z BRSV še več tednov po infekciji. BRSV naj bi se ohranjal v limfocitih B okuženih živali (Valarcher in sod., 2001).

Predilekcijsko mesto za vdor BRSV so spodnje dihalne poti. Virus lahko napade epitelijske celice bronhiolov, alveolarne celice tipa I in II ter se v njih replicira. Dokazano je njegovo škodljivo delovanje prek degranulacije mastocitov, zaradi česar pride do sproščanja mediatorjev vnetja, med drugimi histamina, ki povzroči bronhokonstrikcijo tudi v tistih delih pljuč, ki niso neposredno kolonizirana z BRSV (Dungworth, 1993; Larsen in sod., 2001; Lopez, 2011).

Patoanatomske spremembe pri naravno okuženem poginulem govedu se kažejo kot bronhointersticijska pljučnica pretežno kranioventralnih delov pljuč. Makroskopsko so to lobularna ali nekoliko večja konsolidirana žarišča kranioventralnih delov pljuč. Zelo pogosto je navzoč intersticijski emfizem kavdalnih delov pljuč, ko v njihovem interlobularnem intersticiju večkrat nastajajo prave bulozne spremembe (Dungworth, 1993; Lopez, 2011; Sacco in sod., 2014).

Kavdodorzalni deli pljuč so najpogosteje razširjeni, napihnjeni, saj v njih ponavadi nastanejo interlobularne, lobularne in subpleuralne emfizematozne spremembe. Včasih lahko v posameznih manjših bronhih pnevmoničnih predelov pljuč vidimo mukopurulentni eksudat. Traheobronhialne in mediastinalne bezgavke so navadno povečane in sočne. Če se virusni infekciji pridruži sekundarna bakterijska infekcija, so patološke spremembe očitnejše, njihov videz pa je odvisen od bakterijskega povzročitelja (Valarcher in Taylor, 2007).

V bronhih pnevmoničnih in atelektatičnih predelov večkrat najdemo mukopurulentni eksudat. Histološko ugotovimo vnetje traheje, bronhov, bronhiolov in proksimalnih delov pljučnih acinusov. Posebna značilnost bronhiolarnega in alveolarnega odziva na infekcijo z BRSV je nastanek sincicijskih celic velikank, ki nastanejo iz epitelijskih celic bronhiolov in alveol. V peribronhiolarnem intersticiju je vidno zbiranje zmerne števila limfocitov in plazmatk. Pri eksperimentalni okužbi z BRSV nastane bronhointersticijska pljučnica, ki doseže svoj vrh približno od 5 do 8 dni po okužbi. Za to časovno obdobje je značilno nastajanje sincicijskih celic velikank, med katerimi jih ima veliko intracitoplazemske inkluzije. Pri okuženih živalih se posledice okužbe z BRSV kažejo kot fibrozni obliterirajoči bronhiolitis (Dungworth, 1993; Lopez, 2011).

Ultrastrukturne spremembe v alveolarnih celicah eksperimentalno okuženih telet z BRSV od 4 do 8 dni po infekciji se kažejo kot nekroza pnevmocitov tipa I, pnevmociti tipa II pa večinoma reagirajo s hipertrofijo, hiperplazijo, z degeneracijo, nekrozo in s formacijo sincicijskih celic. Hipertrofija in hiperplazija pnevmocitov II povzročita zadebelitev alveolarnih sten ali celo okluzijo alveol. Prisotnost nevtrofilcev je vezana na bližino z BRSV inficiranih alveolarnih celic, vendar replikacija virusa v nevtrofilcih ali makrofagih ni bila ugotovljena (Bryson in sod., 1991; Viuff in sod., 2002; Lopez, 2011).

2.2.2.3.4 Bovini adenovirusi (BAdV)

Družina *Adenoviridae* spada v red *Ortevirales* in je razdeljena v pet rodov: *Atadenovirus*, *Aviadenovirus*, *Ichtadenovirus*, *Mastadenovirus* in *Siadenovirus*. Za govedo so patogeni štirje serotipi, ki so na podlagi morfologije, rasti na celičnih kulturah, morfologije intranuklearnih inkluzij in drugih značilnosti razvrščeni v dva rodova: *Atadenovirus* in *Mastadenovirus*. V rod *Atadenovirus* je razvrščen goveji atadenovirus D, v rod *Mastadenovirus* pa so razvrščeni goveji mastadenovirusi A, B in C (Dungworth, 1993; Maclachlan in Dubovi, 1999; Lopez, 2011, Graham in sod., 2005).

Za družino *Adenoviridae* je značilno, da njihov genom predstavlja negativno usmerjena linearna dvojna vijačnica DNA (dsDNA), velikosti od 26 do 45 kbp. Virioni merijo od 80 do 100 nm, so brez ovojnice in so izometrične zgradbe (Maclachlan in Dubovi, 1999).

Razširjeni so po vsem svetu. Najdemo jih v prebavilih in dihalih klinično zdravih govedih, pogosteje pa klinično bolnih. BAdV je leta 1959 prvič izoliral Klein iz fecesa zdrave krave (Klein in sod., 1959).

Čeprav so BAdV znani že več kot 50 let, njihova vloga pri pojavu bolezni ni povsem razjasnjena (Hodgins in sod., 2002).

Najdemo jih v prebavilih in dihalih zdravih in bolnih živali. Pri govedu najpogosteje povzročajo klinično asimptomatično ali blago obolenje zgornjih dihal (Dungworth, 1993, Graham in sod., 2005). Pri teletih občasno lahko povzročijo hujše respiratorno ali enterično obolenje (Maclachlan in Dubovi, 1999).

Protitelesa proti BAdV večkrat najdemo pri živalih, okuženih z BRSV, BPI3 in BVDV. Njihova vloga v BRDC ni povsem razjasnjena (Dungworth, 1993; Narita in sod., 2003).

Pri eksperimentalnih okužbah telet z BAdV sicer kliničnih znakov bolezni niso ugotovili. Makroskopske patološke spremembe so bile omejene na mesto inokulacije kot majhna vlekajna žarišča na pljučih. Tudi patohistološke spremembe so bile dokaj skromne; med drugim so ugotovili infiltracijo nevtrofilcev v sluznici bronhiolov in nekrozo posameznih epitelijskih celic sluznice bronhiolov. V nekaterih epitelijskih celicah sluznice bronhiolov so ugotovili eozinofilne intranuklearne inkluzije (Dungworth, 1993; Narita in sod., 2003).

Pri posameznih eksperimentalno okuženih teletih so bile spremembe nekoliko hujše; njihovi bronhioli so bili polni nekrotičnih epitelijskih celic, fibrina, makrofagov in nevtrofilcev. V pljučih so ugotovili povečano število alveolarnih celic tipa II, v nekaterih od njih so bile vidne intranuklearne inkluzije (Narita in sod., 2002; Narita in sod., 2003; Graham in sod., 2005).

2.2.2.3.5 *Pestivirus A in B (Virus bovine virusne diareje, BVDV)*

Bovina virusna diareja je bila prvič opisana v New Yorku leta 1946. Gre za akutno, zelo nalezljivo virusno bolezen, ki se pri okuženi živali kaže s povišano telesno temperaturo, z drisko, s spremembami na sluznicah, z levkopenijo in je le redko smrtna (Brownlie in sod., 1987; Dungworth, 1993).

Mukozna bolezen je bila prvič opisana leta 1953 v Iowi v ZDA. Bolezen se klinično kaže z vročino, s sluzastim izcedkom iz nosnic, z anoreksijo, s sluzasto, pogosto krvavo drisko in z dehidracijo. V prebavilih patomorfološko redno najdemo erozije, ulceracije in krvavitve. V okuženi reji zbolijo od posamezne do nekaj živali (le perzistentni izločevalci), ki v nekaj tednih poginejo.

Povzročitelja bovine virusne diareje sta majhna virusa RNK, po novem imenovana *Pestivirus A* (prej BVDV 1) in *Pestivirus B* (prej BVDV 2), ki ju razvrščamo v družino *Flaviviridae*, v rod *Pestivirus*. Njun genom predstavlja enojna vijačnica RNK, ki je sestavljena iz približno 10 do 12 kbp. Virioni so veliki od 40 do 60 nm, sferične oblike in imajo ovojnico (Maclachlan in Dubovi, 1999).

V *in vitro* razmerah se rast virusa na celičnih kulturah kaže v dveh oblikah. Razlikujemo citopatogeni biotip virusa (cp BVDV), ki na celični kulturi povzroča citopatski efekt, in necitopatogeni biotip virusa (ncp BVDV), ki ne povzroča citopatskega efekta. Večino virusnih

okužb živali povzročijo ncp BVDV. BVDV lahko okuži ovce, koze, prašiče in divje prežvekovalce v ujetništvu. Opisan je tudi pri nekaj vrstah antilop v Afriki, pri afriških in indijskih bizonih ter alpakah in lamah (Dungworth, 1993; Maclachlan in Dubovi, 1999).

BVDV je pomemben patogen, ki v govedorejski proizvodnji po svetu povzroča visoke izgube tako v mlečnih kot tudi v mesnih rejah govedi (Maclachlan in Dubovi, 1999).

Kako bo bolezen potekala v sami čredi in kako se bo širila med čredami, je večinoma odvisno od vrste reje, imunskega statusa črede, vključno s cepljenji, in od prisotnosti ali odsotnosti perzistentno okuženih živali (PI) (Maclachlan in Dubovi, 1999).

Potek bolezni pri posamezni živali je odvisen od starosti živali in od njenega gravidnostnega statusa. Glede na navedeno obstajajo: postnatalna infekcija pri negravidnem govedu, infekcija bregelj krav, perzistentno okužena teleta in mukozna bolezen.

Za okužbo z BVDV je občutljivo govedo vseh starosti, v enzootično okuženih rejah pa je okužba najpogostejša pri mladem govedu. Teleta, ki so prejela zaščitna maternalna protitelesa s kolostrumom, običajno ne kažejo kliničnih znamenj bolezni. Potem ko maternalna protitelesa izginejo iz krvi, to je v času od 3 do 8 mesecev starosti živali, se takšna teleta hitro okužijo, če pridejo v stik z okuženo živaljo. Klinična slika je najpogostejše blaga. Inkubacijska doba je od 5 do 7 dni, spremljata jo bifazni dvig telesne temperature in leukopenija. Posamezne živali dobijo drisko, pri njih je lahko prisoten tudi nosni in očesni izcedek, na ustni sluznici se lahko razvijejo erozije in ulcera. Pri kravah molznicah je najopaznejši padec mlečnosti. Ker je BVDV imunosupresiven, se pri okuženih živalih pogosto pojavijo oportunistične okužbe dihal in prebavil, zaradi česar se poveča smrtnost pri okuženih živali (Maclachlan in Dubovi, 1999).

Transplacentalna okužba plodov se pojavlja pri bregelj telicah in tudi pri odraslih bregelj kravah, ki se še niso srečale z BVDV. Posledice okužbe so odvisne od starosti fetusa v času okužbe in od vrste virusa. Posledica okužbe v zgodnjem stadiju brejosti sta najpogostejše odmrtnost zarodka in njegova resorpcija. Okužba v obdobju od 100 do 125 dni gestacije se pogosto kaže z nastankom perzistentno okuženega telata ali s hudimi okvarami plodu, zaradi katerih lahko plodovi odmrejo ali so ob rojstvu prizadeti. Teleta, ki preživijo tovrstno okužbo z BVDV, so perzistentni nosilci virusa vse življenje. Plodovi, ki se okužijo po 125. dnevu brejosti, proizvedejo nevtralizacijska protitelesa, ki nevtralizirajo BVDV in ta v organizmu ni več prisoten. Abortusi so mogoči v vseh fazah brejosti (Maclachlan in Dubovi, 1999; Bolin, 2002).

Če se BVDV vnese v dovezetno čredo, kjer je bregelj veliko število živali, ali rejec uporablja sinhronizacijo gonitev, lahko pričakujemo povečan delež PI telet v naslednjem obdobju telitev. Takšna teleta so slabotna, zahirana, njihova mortalnost je v prvem letu življenja lahko tudi do 50 % (Maclachlan in Dubovi, 1999).

Mukozna bolezen (MB) se razvije samo pri PI in pri živali, pri katerih sta prisotna oba biotipa virusa. Intrauterino se teleta pretežno okužijo z necitopatogenim tipom virusa. Za pojav mukozne bolezni (MB) mora poleg necitopatogenega tipa virusa biti prisoten še citopatogeni biotip virusa. Z molekularnimi metodami so ugotovili, da citopatogeni tip virusa najpogostejše nastane zaradi mutacije, insercije, delacije ali prerazporeditve dela genoma v necitopatogenem

biotipu virusa pri živalih PI. Znotraj okužene reje se živali PI prek superinfekcije od obolele živali z MB okužijo s citopatogenim biotipom virusa. Ker so teleta PI imunotolerantna do novega citopatogenega biotipa virusa, se razvije huda oblika bolezni. Klinična slika MB poteka mnogo bolj dramatično od akutne okužbe z BVDV. MB lahko pri živalih PI v okuženi reji izbruhne nenadoma in se vedno konča s poginom živali, lahko pa se vleče tedne in celo mesece s ponavljajočimi izboljšanji in poslabšanji stanja, dokler žival ne shira in pogine. Tako obolele živali imajo povišano telesno temperaturo, so anoreksične, imajo profuzno vodeno drisko, nosni izcedek, erozivni in ulcerativni stomatitis. Živali so dehidrirane in hirajo, zaradi česar poginejo (Maclachlan in Dubovi, 1999).

Postnatalna okužba z BVDV pri teletih poteka prek dihal. Virus naseli nosno sluznico in tonzile. Tu se najprej razmnoži, nato se razširi v regionalne bezgavke. Največjo količino virusa najdemo v limfatičnem tkivu črevesja. Večina okužb z BVDV je klinično inaparentnih. Teleta, ki zbolijo za akutno obliko bolezni, imajo erozivne spremembe v vseh delih prebavil (v ustih, požiralniku, predželodcih, siriščniku in črevesju). V distalnih delih črevesja so izrazite hemoragične nekroze Peyerjevih plošč (Maclachlan in Dubovi, 1999).

Primarno mesto vdora v organizem so tonzile, kjer se virus namnoži, posebej v epitelijskih celicah kript in v orofaringealnem limfatičnem tkivu. Celice makrofagno-fagocitnega sistema nato virus занesejo v bezgavke. Kakšen bo potek bolezni, je odvisno od tipa virusa, časa okužbe in imunskega statusa živali (Dungworth, 1993).

Na splošno poznamo naslednje oblike bolezni:

- bovino virusno diarejo (BVD),
- perzistentno okužene živali (živali PI),
- mukozno bolezen (MB),
- BVD in sekundarne infekcije,
- trombocitopenično obliko BVD.

Okužba z BVDV deluje supresivno na sintezo interferona, oslabi limfocitno funkcijo, slabi razmnoževanje, kemotakso monocitov in delovanje nevtrofilcev ter proizvodnjo protiteles. Naštete spremembe so pri akutni BVD sicer prehodne narave, pri kronični obliki in pri mukozni bolezni (MB) pa trajajo dlje časa. Zaradi imunosupresivnega delovanja virusa, katerega mehanizmi do sedaj še niso povsem pojasnjeni, so pogosto opisane mešane okužbe z BVDV pri IBR, goveji korici, goveji kugi, infekciji z BRSV, bovinih rota- ter koronavirusih kot tudi pri okužbah z bakterijo *M. haemolytica* in s salmonelami (Dungworth, 1993).

Fulton s sodelavci (2009) je ugotavljal prevalenco BVDV in prevalenco perzistentno okuženih živali (PI) v pitovnih rejah govedi v južni Oklahomi in v severnem centralnem Teksasu. Skupno je bilo pregledanih 30 govejih čred, v katerih je bilo skupaj 4530 telet. Odvzeli so vzorce kože z uhljev in jih testirali na antigen BVDV. Vzorce so preiskali z IHC in antigenim testom ELISA (antigen capture ELISA; ACE). Pozitivna teleta so ponovno vzorčili in tako dokazali, ali gre za PI. Vzorce so odvzeli tudi od krav, pri katerih so bila teleta PI. Od 4530 pregledanih telet je bilo 25 PI telet (0,55 %) in ta so pripadala 5 različnim čredam (16,7 %). Dve čredi sta imeli več PI telet, tri črede so imele samo po eno PI tele. Samo ena od krav, katerih teleta so

bila PI, je bila prav tako PI (4 %). Vsi izolati BVDV so pripadali genotipu BVDV1b (Fulton in sod., 2009).

2.2.2.3.6 Betakoronavirus 1 (*Bovini koronavirusi*, BCV)

Betakoronavirusi 1 (BCV) so v svetu zelo razširjeni in so pomemben patogen pri domačih in divjih prežvekovalcih. Povzročajo respiratorna obolenja in driske pri teletih ter zimsko drisko pri odraslem govedu. Bolezni povzročajo občutne ekonomske izgube in zmanjšujejo dobrobit živali (Oma in sod., 2016).

BCV je klasificiran v red *Nidovirales*, podred *Cornidovirineae*, v družino *Coronaviridae*, v poddružino *Orthocoronavirinae*, v rod *Betacoronavirus*, podrod *Embecovirus*, vrsta *Betacoronavirus 1*.

Najprej je bilo znano, da BCV povzročajo driske pri teletih, pozneje so spoznali, da je povzročitelj zimske driske pri govedu (Liu in sod., 2006).

Poleg črevesja lahko BCV napada tudi dihala, zato pravimo, da je pnevmoenterični virus. Lahko se izloča z nosnimi izcedki in blatom (Saif in sod., 2010).

Isti sevi virusa povzročajo tako enterično kot tudi respiratorno obliko bolezni. Najbolj so ogrožena teleta v času od 4. do 16. tedna starosti. Obbolele živali imajo vročino, serozni izcedek iz nosu, kihajo in kašljajo. Virus se primarno replicira v epiteliju nosne in sapnikove sluznice ter le občasno v pljučih (Caswell in Williams, 2016).

Virion BCV je pleomorfne do sferične oblike, velik od 80 do 220 nm, obdan z dvojno ovojnico. Njegov genom predstavlja enojna vijačnica pozitivno usmerjene RNA molekule, sestavljena iz 27 do 32 kbp (Maclachlan in Dubovi, 1999).

Virionova molekula RNA kodira pet glavnih stukturalnih beljakovin: spike (S) glikoprotein (ORF4), membranski protein (ORF9), nukleokapsidni protein (ORF10), hemaglutinin-esterazni protein (ORF3) in majhni membranski protein (ORF8) (Liu in sod., 2006).

Na splošno so BCV zelo razširjeni. Povezujemo jih z blažjimi respiratornimi obolenji ali s pljučnicami pri mladem govedu v starosti od 2 do 6 mesecev. Pri okuženih živalih jih je mogoče izolirati iz nosnih izcedkov, pljuč, črevesja in fecesa. Rezervoar BCV so lahko prostoživeči divji prežvekovalci in tudi tisti v oborah. BCV je bil ugotovljen pri jelenih, vodnih bivolih, alpakah itd. (Saif in sod., 2010; Tsunemitsu, 1999).

Opisanih je nekaj primerov izbruhov respiratornih obolenj brez prisotnosti drugih respiratornih patogenov pri govedu v južni Italiji. Pri treh izbruhih od štirih so bila klinična znamenja vezana na dihala, pri dveh pa na dihala in črevesje. Zbolela so teleta v starosti od 2 do 3 mesecev. BCV so dokazali v nosnih in fekalnih vzorcih kot tudi v očesnih brisih bolnih živali. IVCK je bila uspešna pri treh izbruhih od štirih, ko so BCV izolirali na HRT-18 celicah (Decaro in sod., 2008).

Isti sev virusa lahko povzroči bolezenske znake pri živalih vseh starosti. Obolevnost je ponavadi visoka, smrtnost pa nizka. V času obolenja okužene živali ponavadi izločajo virus tako z nosnim izcedkom kot tudi prek fecesa (Liu in sod., 2006).

Okužba BCV se med živalmi širi prek fekalno oralne poti, najverjetneje pa tudi prek aerosola (Saif in sod., 2010).

BCV so začeli povezovati z respiratornimi obolenji pri govejih pitancih sredi devetdesetih let prejšnjega stoletja (Decaro in sod., 2008).

Storz s sodelavci (2000) je poročal o izbruhu respiratornega obolenja pri govejih pitancih v ZDA. Ob izbruhu respiratornega obolenja v čredi je poginilo 26 govejih pitancev. Pri 25 je bila dokazana okužba z BCV. Tej se je pridružila okužba z bakterijama vrste *M. haemolytica* in *P. multocida*, kar se je izražalo v hudih pljučnicah (Hasoksuz in sod., 1999; Storz in sod., 2000a; Storz in sod., 2000b).

Lathrop je s sodelavci (2000) ugotovil, da so goveji pitanci, pri katerih so v nosnih izcedkih ugotovili virus, v krvi pa protitelesa proti BCV, 1,6-krat pogosteje zbolevali za pljučnico kot pitanci brez BCV. Na klavni liniji so pri takšnih govedih 2,2-krat pogosteje ugotovili patološke spremembe na pljučih kot pri govedih brez BCV (Lathrop in sod., 2000).

Podobno so pri teletih, ki so z nosnim izcedkom izločala BCV 2,7-krat oziroma 1,5-krat pogosteje ugotovili respiratorno obolenje kot pri teletih, ki virusa niso izločala (Hasoksuz in sod., 1999; Thomas in sod., 2006).

Thomas in njegovi sodelavci (2006) so ugotovili, da je izločanje BCV prek dihal in črevesja pri pitovnem govedu pogosto, vrh pa doseže prvi do četrti dan po prihodu v čredo. V eni od študij so testirali vzorce 3 dni pred odpremo živali v novo čredo. Ugotovili so, da izločanje BCV poteka najprej prek nosnega izcedka, temu sledi izločanje prek fecesa (Saif in sod., 2010).

Pri visokem deležu govejih pitancev (približno 90 %) se v krvi pojavijo protitelesa proti respiratornem BCV približno 3 tedne po prihodu v novo čredo. Številne študije dokazujejo, da goveda, ki pridejo v novo čredo z relativno visokim titrom protiteles proti respiratornem BCV, po prihodu manj pogosto izločajo virus, manj pogosta je serokonverzija in pri njih je manj pogost pojav BRD (Saif in sod., 2010).

Nekateri avtorji ugotavljajo, da ima infekcija z respiratornim BCV negativen vpliv na prirast govejih pitancev, kar povezujejo z neposrednim vplivom BCV na zdravje črede. Nasprotno drugi avtorji ugotavljajo, da imajo seropozitivne živali boljše priraste (Thomas in sod., 2006).

Pri teletih je najhujša enterična oblika bolezni, ki se pojavlja pretežno v starosti od 1 do 3 tednov. Respiratorna oblika bolezni pri teletih v starosti od 2 do 6 mesecev poteka običajno v milejši obliki in se klinično kaže s kašljem, povišano telesno temperaturo, z inapetenco, izcedkom iz nosu in pogosto poteka skupaj z drisko. Eksperimentalne študije so ugotovile izločanje virusa tako prek nosnih izcedkov kot tudi prek fecesa v povprečju 5 dni od pojava kliničnih znakov. V raziskavah na terenu pa so se ob pristnosti stresorjev in drugih povzročiteljev respiratornih obolenj pojavile pljučnice s pogini živali.

Pri mladem pitanem govedu je klinična slika hujša. Kaže se s povišano telesno temperaturo, z dispnejo, s pljučnico, hujšanjem in pogini. Pojavi se pretežno v prvem tednu po prihodu v pitališče. Ob izbruhih BRDC se virusu pogosto pridružita bakteriji *M. haemolytica* in *P. multocida*, ki povzročita gnojno, fibrinozno in nekrotično pljučnico (Saif in sod., 2010).

Respiratorna oblika pri odraslih govedih poteka v hudi obliki v primerih, ko je prisoten stres, ki zviša nivo kortikosteroidov v krvi. Ti sprožijo imunosupresijo in znižajo število CD4 in CD8 T-celic ter nivo citokinov (Giomarelli in sod., 2003; Jung in sod., 2007; Zhang in sod., 2008).

Tako so ugotovili povečanje izločanja BCV pri govedih, ki so jih tretirali z deksametazonskimi preparati (Tsunemitsu in sod., 1999).

Podobno so ugotovili tudi pri prašičih (Jung in sod., 2007; Zhang in sod., 2008).

Bronhiolarna nekroza je tipična patološka sprememba, ki jo BCV povzroča v dihalih obolelih telet. Nekateri avtorji navajajo pojav sincicijskih celic v bronhiolih govejih pitancev, okuženih z BCV in bakterijskimi povročitelji pljučnic, vendar so sincicijske celice verjetneje posledica prisotnosti BRSV (Caswell in Williams, 2016).

2.2.2.3.7 *Mannheimia haemolytica*

Mannheimia haemolytica (*M. haemolytica*) je uvrščena v družino *Pasteurella multocidaceae*. Bakterije iz navedene družine so sicer normalni prebivalci nosno-žrelne in ustne sluznice, saj pri živalih živijo tipični komenzalski način življenja (Dungworth, 1993; Rice in sod., 2007).

M. haemolytica je gramsko negativna, negibljiva majhna kokoidno paličasta bakterija, ki meri okrog 0,2 µm. Pri barvanju po Gramu se v razmazih pogosto barvajo bipolarno. Večina sevov na krvnem agarju povzroča beta hemolizo (Woolums, 2013a).

Za govedo je najbolj patogena *M. haemolytica*, ki je glavni povzročitelj fibrinozne bronhopnevmnije pri govedu. Njene determinante patogenosti so: adhezini, levkotoksin, kapsularni lipopolisaharidi in proteaze (Dungworth, 1993; Singh in sod., 2011; Lopez, 2011; Caswell, 2014).

Eden od najpomembnejših kliničnih pojmov pri govedu je bolezen govejih pitancev, ki se pojavlja po transportu, t. i. sheeping fever. Živali običajno zbolijo 3 dni do 3 tedne po transportu. Klinično se bolezen kaže kot pobitost živali, povišana telesna temperatura, neješčnost, težko dihanje in mukopurulentni izcedek iz nosu. Kašelj in dispneja se večinoma pojavita kasneje. Z antibiotiki zdravljene živali večinoma takoj reagirajo na zdravljenje, a so povratniki dokaj pogosti. Morbidnost pri bolezni je od 15 do 45 %, mortalnost pa 1 do 5 %.

Pri mlajših govedih se klinično bolezen kaže kot enzootska pnevmonija telet. Zbolijo večinoma teleta, stara od 1 do 4 mesecev. Čeprav literatura večinoma govori o enzootski pnevmoniji, je v resnici njen pojav lahko sporadičen, enzootski ali poteka celo v obliki večjih izbruhov. Obolela teleta so febrilna, hiperpneična, dispneična, pobita in neješča. Za pojav omenjenih bolezenskih slik je potrebna prisotnost nekaterih dejavnikov tveganja, kot so slaba kakovost

zraka, slaba obrambna sposobnost dihal zaradi npr. povečane prisotnosti amoniaka, nezadostna kolostralna imunost, izpostavljenost živali različnim virusnim in mikoplazemskim povzročiteljem ter stres (Dungworth, 1993; Singh in sod., 2011).

Patomorfološke spremembe pri akutni oz. fulminantni obliki so zelo hude. Spremenjeni so večinoma kranioventralni deli pljuč, kjer najdemo lobarno pljučnico ali lobarno bronhopnevmonijo. Vidna so žarišča koagulacijske nekroze in v večini primerov vnetje popljučnice. Patološke spremembe so najhujše v kranialnih in srednjih delih pljuč, redko jih najdemo tudi v kavdalnih delih. Spremembe na rezni ploskvi so velike od 0,5 do 5 cm, ostro omejene od okolnega neprizadetega tkiva, temno rdeče barve in čvrste konsistence. V bronhih lahko najdemo gnojni eksudat ali krvavitve. Interlobularna septa so polna fibrinoznega ali serofibrinoznega eksudata in so zato razširjena, kar na rezni ploskvi včasih daje marmoriran videz pljuč. Pri hudih primerih so pljuča pokrita s fibrinskimi krpami, v prsni votlini pa najdemo serofibrinozni eksudat. Plevritis včasih spremlja tudi vnetje osrčnika (Schiefer in sod. 1978; Dungworth, 1993; Singh in sod., 2011).

Pri živalih, ki preživijo hudo fulminantno obliko, pogosto najdemo posledice v obliki sekvestrov, bronhiektazij, abscesov in vezivnih adhezij pljuč na porebrnico. Sekvestri vsebujejo nekrotično tkivo, ki plava v tekočem kazeoznem eksudatu, okrog njega pa nastaja vezivna kapsula. Bronhiektazije so razširitve dihalnih poti, napolnjene z gnojem in obdane z vezivnim tkivom. Pri pregledu pljuč jih na hitro lahko zamenjamo z abscesi. Bronhiektazije in abscese večkrat naseli *Trueperella pyogenes*, lahko pa tudi druge oportunistične bakterije. Subakutne in kronične spremembe, povzročene z bakterijami iz družine *Pasteurella multocidaceae*, so svetlejše rdeče barve, včasih sivkaste, konsistenca pa variira od trde do gumijaste. Blage akutne primere, ki se v pljučih kažejo kot atelektatična in konsolidirana žarišča, ni mogoče makroskopsko ločiti od virusnih pljučnic (Dungworth, 1993).

Patohistološka slika pri infekciji z *M. haemolytica* in *H. somni* je dokaj dramatična; v pljučih ugotovimo fibrinozno do gnojno bronhopnevmonijo z nekrozami levkocitov. Alveoli in majhni bronhioli so napolnjeni z nevtrofilnimi granulociti, makrofagi, s fibrinom, z edemsko tekočino, eritrociti, nekrotičnimi odluščenimi celicami in s kolonijami bakterij. Nekroza intraalveolarnih levkocitov je značilnost okužbe z bakterijo *M. haemolytica*, ker bakterijski levkotoksin ubija levkocite gostitelja. Zaradi posebne razporeditve svojega blago bazofilnega kromatina so nekrotični levkociti po svojem videzu zelo podobni ovsnim zrnom (»oat cells«). V alveolarnih septih pogosto vidimo trombozo arteriol, venul in kapilar. S fibrinskimi trombi so trombozirane mezovalne interlobularnih septov. Pri akutni fulminantni pljučnici, povzročeni z bakterijo *H. somni*, včasih najdemo gnojni flebitis s fibrinoidno nekrozo žilne stene (Dungworth, 1993).

Pri živalih, ki so preživele akutno fulminantno obliko bolezni, najdemo v pljučnem tkivu številne makrofage in večjedrne histiocite, ki odstranjujejo fibrin in ostale produkte vnetja; vidno je tudi brstenje fibroblastov, ki mestoma preraščajo v alveolah nakopičen fibrin (Dungworth, 1993).

Opisane spremembe na pljučih so zelo podobne tistim pri infekcijah z bakterijo *H. somni* (Fulton in sod., 2009; Szeredi in sod., 2010).

2.2.2.3.8 *Pasteurella multocida multocida subsP. multocida*

P. multocida je gramsko negativna, fakultativno anaerobna, negibljiva bakterija. Morfološko so to kokoidni bacili, veliki okrog 0,2 µm, ki se pojavljajo posamič, v parih ali redko v kratkih verigah. Njeni gostitelji so govedo, kunci, prašiči, psi, mačke in ptice. Pri svojih gostiteljih lahko povzročajo številne bolezenske entitete: atrofični rinitis pri prašičih, pljučnice pri prežvekovalcih, hemoragično septikemijo in mastitise pri govedu, številne hude bolezni pri perutnini (Woolums, 2013a).

Pri govedu je potek pnevmonične infekcije z bakterijo *P. multocida* podoben tisti pri infekciji z bakterijo *M. haemolytica*, le da je manj fulminanten, rezultat pa je fibrinozna ali fibrinopurulentna bronhopnevmonija. Količina fibrina v eksudatu je manjša, v spremenjenih delih najdemo posamezne tromboze, omejene nekroze ter gnojni bronhitis in bronhiolitis (Dabo in sod., 2007; Hotchkiss in sod., 2010; Klima in sod., 2014).

2.2.2.3.9 *Histophilus somni*

H. somni je gramsko negativen pleomorfni kokobacil, velikosti <1 µm x 1–3 µm, ki včasih lahko tvori daljše filamente in je eden od pogostejših bakterijskih etioloških dejavnikov, ki se pojavlja pri BRDC. Poleg tega lahko povzroča tromboembolični meningoencefalitis, pljučnico, sepo, miokarditis, abortuse in druge reprodukcijske motnje (Woolums, 2013b).

Patogen je tudi za ovce, bizone in muflone. Njegove determinante patogenosti so lipopolisaharidi, protein, na katerega se vežejo imunoglobulini, glavni zunanji membranski protein (MOMP), OMP in eksopolisaharid (Corbel, 2007).

Patološke spremembe na pljučih, ki jih povezujejo z omenjeno bakterijo, so: fibrinozna pnevmonija, gnojna bronhopnevmonija, pljučni abscesi, vaskulitis, tromboza in nekrotični bronhiolitis (Andrews in sod., 1985; Corbel, 2007; Lopez, 2011).

Pri nekaterih eksperimentalno okuženih teletih, ki so jih intrabronhialno okužili z bakterijsko kulturo *H. somni*, so bili patohistološko ugotovljeni nekrotični bronhiolitis, degeneracija alveolarnih makrofagov, nevtrofilni do fibrinoidni vaskulitis, krvavitve in nekroza najbolj prizadetih delov pljuč. Bronhiolarni epitelij je bil deloma ali v celoti odluščen, lumen bronhiolov pa napolnjen z odluščenimi celicami. Stena pripadajočih krvnih žil je bila pogosto nekrotična. Makrofagi so bili večinoma degenerirani, s homogeno rahlo bazofilnimi jedri in z nejasnimi citoplazemskimi robovi. Pogosto so bili prisotni nekrotična žarišča in krvavitve (Gogolewski in sod., 1987; Corbeil, 2007; Panciera in Confer, 2010; Agnes in sod., 2013).

2.2.2.3.10 *Trueperella pyogenes*

Trueperella pyogenes (*T. pyogenes*) je gramsko pozitivna bakterija, ki spada v družino *Actinomycetaceae*. To so fakultativno anaerobne majhne kokoidne ali pleomorfne paličke, velike okrog 0,5 x 2 µm, ki se pojavljajo posamič, v parih ali v kratkih verigah. V parih so večkrat postavljene v obliki črke V. Njeni gostitelji so govedo, ovce, koze, prašiči in druge živalske vrste. *T. pyogenes* je tipična piogena oportunistična bakterija, ki v gostitelju spodbudi nastanek gnoja (Nagaraja, 2013; Ribeiro in sod., 2015).

Mikrob pri svojih gostiteljih povzroča mastitis, abscese, pljučnice in vnetja bezgavk. Klinična slika je odvisna od lokacije in obsežnosti procesa, ki ga bakterija povzroča (Ribeiro in sod., 2015).

T. pyogenes živi na nosnožrelni sluznici živali, v primeru kroničnih pljučnic pogosto naseli pljučno tkivo in v njem povzroči nastanek abscesov, ki se razvijejo približno v treh tednih, inkapsulirajo pa v štirih tednih (Ribeiro in sod., 2015).

Večkrat jo je mogoče izolirati skupaj z *M. bovis* iz abscesov v pljučih (Caswell in Williams, 2016).

2.2.2.3.11 *Mycoplasma bovis*

Mycoplasma bovis (*M. bovis*) je eden od glavnih povzročiteljev pljučnic pri teletih. Prvič so jo izolirali leta 1961 v ZDA pri kravi, ki je zbolela za mastitisom. Pozneje se je z živalmi razširila na Bližnji vzhod, v Evropo, Severno Afriko, Daljni vzhod in južno Ameriko. Danes o njej poročajo po vsem svetu (Nicholas in Ayling, 2003; Maunsell in sod., 2011).

M. bovis je majhen pleomorfen mikrob, fakultativni anaerob, ki spada v družino *Mycoplasmataceae*. Njen genom meri 1080 kbp., nima celične stenice in ima nizek G + C indeks. Na splošno so sicer mikoplazme občutljive na vplive okolja, *M. bovis* je med odpornejšimi, saj v čistilnih gobicah in v mleku pri temperaturi 4 °C preživi tudi 2 meseca. V vodi preživi približno 2 tedna (Nicholas in Ayling, 2003; Strait in Madsen, 2013).

Čeprav so dokazali, da *M. bovis* povzroča pljučnico pri govedu, sta njena prava vloga in patogeneza same infekcije še vedno dokaj nejasni. Sprva so menili, da je *M. bovis* oportunistična bakterija v dihalih zdravih govedi (Rosendal in Martin, 1986). Pozneje so ugotovili, da je prisotnost *M. bovis* v govejih pljučih vedno povezana z vnetnimi spremembami pljuč in da jo je le redko mogoče izolirati iz pljuč zdravih govedi (Thomas in sod., 2002). Nekateri študije kažejo na to, da je *M. bovis* najpogostejše ugotovljeni respiratorni patogen pri kroničnih pljučnicah pitovnih telet (Haines in sod., 2001) in najpogostejši patogen pri fatalnih bronhopnevmonijah pitovnih telet (Adegboye in sod., 1995; Shahriar in sod., 2002; Gagea in sod., 2006). Številne študije ugotavljajo, da *M. bovis* po infekciji oslabi obrambne mehanizme gostitelja, kar privede do invazije drugih respiratornih patogenov, kot so *P. multocida*, *M. haemolytica* in *H. somni* (Caswell in Archambault, 2007).

M. bovis je odgovorna za približno četrtno do tretjino vseh navedenih izgub; po mnenju nekaterih avtorjev je ta delež celo podcenjen. V ZDA so te izgube, ki se kažejo v slabših prirastih in slabši kakovosti trupov na klavni liniji, ocenjene na 32 milijonov dolarjev letno. Izgube zaradi mastitisov, ki jih povzroča *M. bovis*, pa znašajo pri močno okuženih čredah približno 108 milijonov dolarjev (Nicholas in Ayling, 2003).

Pogostnost in s tem tudi vloga *M. bovis* sta večkrat prezrti in podcenjeni v nasprotju z bakterijami, kot so *M. haemolytica*, *P. multocida* in *H. somni*. Ugotovljeno je, da je *M. bovis* lahko povsem primarni patogen, ki je sposoben povzročiti bolezni, kot so mikoplazemska pljučnica pri teletih, mikoplazemski artritis ali mikoplazemski mastitis. *M. bovis* povezujejo tudi z endometritisi, s salpingitisi, z ooforitisi, abortusi in s seminovezikulitisi, ki so jih uspeli reproducirati tudi eksperimentalno (Pfutzner in Sachse, 1996). Okužbo z *M. bovis* povezujejo tudi s keratokonjunktivitisom (Kirby in Nicholas, 1996; Nicholas in Ayling, 2003).

M. bovis ni ubikvitaren mikrob, je pa zelo razširjen v enzootsko okuženih govejih populacijah. Bolezen se vnese v deviško čredo z novo nabavljenimi teleti ali mladim govedom, ki izloča mikoplazme. Okužena goveda lahko izločajo mikoplazme skozi dihalo več mesecev ali celo let. Živali se okužujejo prek dihal, zobnih kanalov in prek spolovil. Umetno osemenjevanje z okuženim semenom je pogosta pot okužbe. Moške živali se okužujejo prek spolovil ob stiku z okuženimi ženskimi živalmi. Okužba je ascendentna in lahko vodi prek prepucija in uretre do orhitisa, kar privede do zmanjšane kakovosti semena, ki pa je tudi okuženo (Nicholas in Ayling, 2003).

Eksperimentalne infekcije ponavadi povzročajo klinično inaparentno bolezen, virulentni sevi mikroba pa lahko povzročijo hude pljučnice. Mikoplazme je mogoče izolirati iz pljuč zdravih telet, vendar je prevalenca izolatov pri teletih s pljučnico večja (Nicholas in Ayling, 2003).

Klinična študija endemične pljučnice, pri katerih so izolirali *M. bovis* in bakterijo *P. multocida*, je pokazala, da skoraj polovica telet izloča mikoplazme pri starosti pet dni in približno 90 % pri starosti 4 tedne. Pri teletih bolezen poteka v obliki fibrinozne pnevmonije pri starosti 10 do 15 dni. Tako bolna teleta so pobita, imajo vročino, pospešeno dihanje, imajo nosni izcedek, blag do trdovraten kašelj in so neješča. Pojav bolezni se najpogosteje začne novembra in doseže vrh januarja. Pogini se lahko v nekaterih čredah nadaljujejo tudi v pomladnem času ali še pozneje na paši, pri čemer gre povečini za posledice same mikoplazemske pljučnice (Nicholas in Ayling, 2003).

Patološke spremembe na pljučih naravno okuženih telet se kažejo kot eksudativna bronhopnevmonija, dokaj velika žarišča koagulacijske nekroze, obrobjena z vnetnimi celicami. Kronična oblika bolezni se kaže kot t. i. cuffing pnevmonija, pri kateri pride do hiperplazije peribronhialnega limfatičnega tkiva, kar privede do kompresije in zoženja bronhov ter bronhiolov in atelektaze pripadajočega pljučnega parenhima. Antigene *M. bovis* je najpogosteje mogoče najti na periferiji nekrotičnih žarišč, v nekrotičnem eksudatu, v makrofagih in nevtrofilcih (Nicholas in Ayling, 2003).

V povezavi s kroničnimi bronhopnevmonijami, povzročenimi zlasti z *M. bovis*, so pri govedu pogosto opisane bronhiektazije, ki so napolnjene z belo do rumenkasto belo mazavo vsebino.

Včasih je vsebina teh sprememb bolj suha, lahko tudi sirasta, zato se pri mikoplazemski pljučnici v literaturi večkrat pojavlja pojem kazeonekrotičnih sprememb (Dungworth, 1993; Caswell in Willams, 2016).

2.2.2.3.12 Drugi bakterijski povzročitelji

V strokovni literaturi se kot možni bakterijski povzročitelji BRDC navajajo še streptokoki, stafilokoki, *Pseudomonas* sp., salmonelle idr. (Caswell, 2014; Lopez, 2011).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 ŽIVALI

V študiji smo obravnavali goveda in jih razdelili v dve osnovni skupini. V prvo skupino, ki smo jo poimenovali skupina P, smo uvrstili poginula goveda. V drugo skupino, poimenovano skupina Ž, smo uvrstili živa, vendar bolna goveda s kliničnimi znamenji BRDC. V študijo smo vključili tudi primerjalni skupini, ki smo ju za poginule živali poimenovali skupina Pk, za žive živali pa skupina Žk.

Na začetku smo v raziskavo vključevali le govedo, staro od enega do 24 mesecev. Kasneje smo pri svojem delu ugotovili tudi fatalne primere BRDC pri govedu, starejšem od 24 mesecev, zato smo v študijo vključili tudi to govedo, pri čemer smo rezultate preiskav prikazali ločeno za vsak starostni razred posebej. Na podlagi starosti živali smo govedo razvrstili v tri starostne razrede. V starostni razred I smo uvrstili teleta, stara od enega do šest mesecev, v starostni razred II smo razvrstili mlado govedo, staro od 7 do 24 mesecev. V starostni razred III smo razvrstili odraslo govedo, starejše od 24 mesecev.

Živali smo zbirali od konca leta 2012 do sredine leta 2016 v osrednji Sloveniji, na Gorenjskem, Dolenjskem in na Štajerskem.

Podatke o posameznem govedu smo dobili v potnih listih in aplikaciji VOLOS, prek katere se vodi centralni register govedi (CRG) v Republiki Sloveniji.

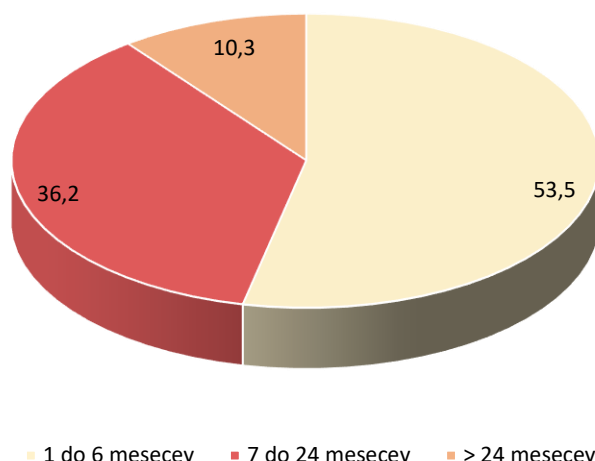
3.1.1 Poginula goveda (skupina P)

V skupino P smo uvrstili 116 poginulih govedi, ki so jih pripeljali v secirnico VF-NVI z anamnezo, da so poginile zaradi respiratornega obolenja, pri raztelesbi pa smo ugotovili pljučnico. Poleg teh smo v skupino P vključili tudi naključno izbrane kadavre brez anamneze, pri katerih smo z raztelesbo ugotovili pljučnico. Kadavre govedi iz skupine P in vzorce, ki smo jih odvzeli med raztelesbo, smo označevali z veliko črko P in zaporedno številko (npr. P1, P2, P3 ...).

V Prilogi tabel (tabela 26) so prikazani osnovni podatki o govedu iz skupine P. Prikazani so kategorija živali, starost v mesecih, izvor, oznaka reje, iz katere izhaja truplo, in vrsta proizvodnje, s katero se v posamezni reji ukvarjajo.

Trupla vseh govedi iz skupine P je na kmetijskih gospodarstvih prevzela Veterinarsko higienska služba (VHS) NVI.

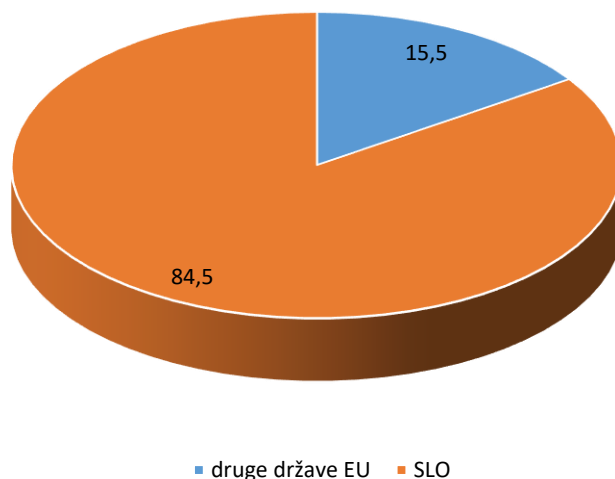
V starostnem razredu I je bilo 62 telet (53,5 %), v starostnem razredu II 42 govedi (36,2 %) in v starostnem razredu III 12 govedi (10,3 %). Starostna struktura govedi iz skupine P je prikazana na sliki 1.



Slika 1: Delež zastopanosti posameznega starostnega razreda govedi iz skupine P (v %)

Figure 1: The percentage representing age groups of cattle from the P-group

V skupini P je bilo 98 govedi (84,5 %) iz Slovenije in 18 govedi (15,5 %) iz drugih državah EU (Madžarska, Češka, Romunija, Slovaška in druge). Izvor živali smo razbrali iz oznak na ušesnih znamkah. Izvor govedi iz skupine P je prikazan na sliki 2.



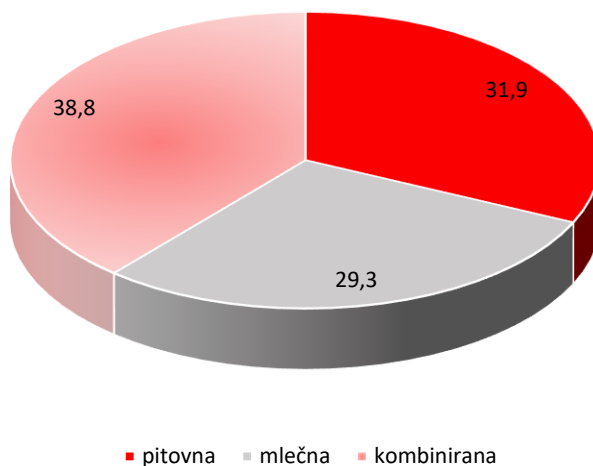
Slika 2: Delež govedi v skupini P glede na njihov izvor (v %)

Figure 2: The percentage of cattle in the P-group according to their origin

Govedo iz skupine P je bilo iz 79 različnih rej. Glede na proizvodno usmerjenost smo vse reje razdelili v tri podskupine. V prvo podskupino smo uvrstili govedo iz pitovnih rej, v drugo govedo iz mlečnih in v tretjo govedo iz kombiniranih, večinoma tradicionalnih rej, v katerih so se ukvarjali tako z mlečno proizvodnjo kot tudi s pitanjem pretežno lastnih živali. Na podlagi

podatkov, pridobljenih iz aplikacije VOLOS, smo ugotovili, da je bilo iz pitovnih rej 37 govedi (31,9 %), iz mlečnih rej 34 govedi (29,3 %) in iz kombiniranih rej 45 govedi (38,8 %). Na enak način smo dobili tudi podatke o številčnosti posamezne reje.

Zastopanost posameznih vrst rej govedi iz skupine P je prikazan na sliki 3.



Slika 3: Delež govedi iz skupine P glede na proizvodno usmerjenost reje (v %)

Figure 3: The percentage of cattle from the P-group according to the type of production

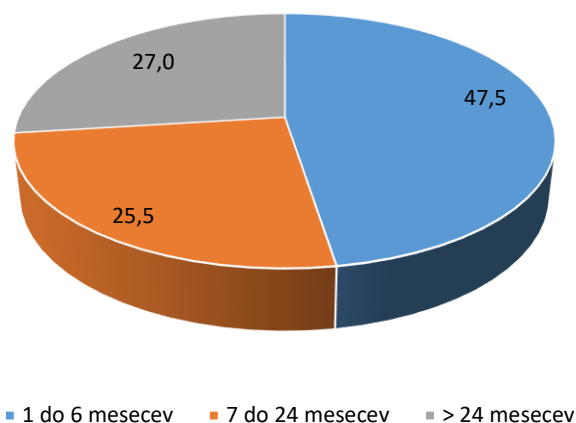
3.1.2 Primerjalna skupina poginulih govedi (Pk)

V primerjalno skupino Pk smo vključili 16 govedi. Pri teh živalih ob raztelesbi nismo ugotovili pljučnice. Osnovni podatki o govedih iz skupine Pk so v Prilogi 1 (tabela 27). Vzorce iz primerjalne skupine poginulih živali smo označevali z oznako Pk in zaporedno številko posamezne živali (npr. Pk1, Pk2, Pk3 ...).

3.1.3 Klinično bolna goveda (skupina Ž)

V drugo osnovno skupino smo vključili 137 klinično bolnih govedi s kliničnimi znamenji BRDC različnih pasem, spolov in porekla. Vzorce, odvzete v tej skupini, smo označili z veliko črko Ž in zaporednimi številkami (npr. Ž1, Ž2, Ž3 ...). Goveda smo izbrali in vključili v študijo na podlagi podatkov, ki so nam jih posredovali veterinarji praktiki. Živali so bile iz rej, v katerih so bili opaženi izbruhi respiratornih obolenj pri govedu. Osnovni podatki o živalih iz skupine Ž so predstavljeni v tabeli 3 Priloge tabel.

Upoštevajoč starost živali smo tudi v skupini Ž goveda razvrstili v tri starostne razrede. V starostnem razredu I je bilo 65 telet (47,4 %), v starostnem razredu II 35 mladih govedi (25,6 %) in v starostnem razredu III 37 odraslih govedi (27,0 %). Deleži posameznega starostnega razreda v skupini Ž so prikazani na sliki 4.

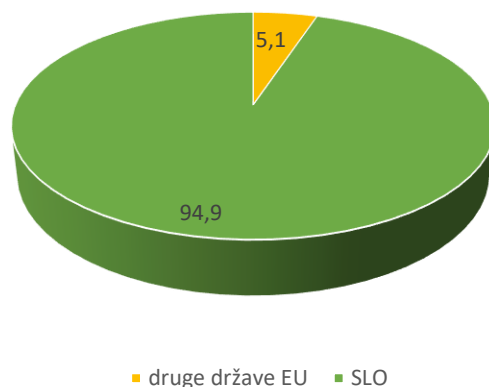


Slika 4: Delež zastopanosti posameznega starostnega razreda govedi iz skupine Ž (v %)

Figure 4: The percentage representing age groups of cattle from the Ž-group

Glede na državo izvora živali (provenienco) smo goveda razdelili v skupino živali slovenskega izvora in v skupino živali iz drugih držav EU.

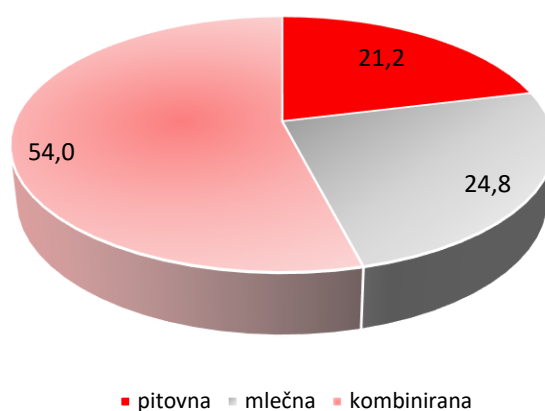
V skupini Ž je bilo 130 govedi (94,9 %) slovenskega porekla, 7 govedi (5,1 %) pa je bilo iz drugih držav EU (Češka in Avstrija). Izvor goved v skupini Ž je prikazan na Sliki 5.



Slika 5: Delež govedi iz skupine Ž glede na njihov izvor (v %)

Figure 5: The percentage of cattle from the Ž-group according to their origin

Goveda iz skupine so bila iz 31 različnih rej, od katerih je bilo 6 pitovnih (19,4 %), 5 mlečnih (16,1 %) in 20 kombiniranih rej (64,5 %). Iz pitovnih rej je bilo 29 govedi (21,2 %), iz mlečnih rej 34 govedi (24,8 %) in iz kombiniranih rej 74 govedi (54,0 %). Zastopanost vseh treh tipov proizvodnje v skupini Ž je prikazana na sliki 6.



Slika 6: Delež govedi iz skupine Ž glede na proizvodno usmerjenost reje (v %)

Figure 6: The percentage of cattle from the Ž-group according to the type of production

3.1.4 Primerjalna skupina klinično bolnih govedi (skupina Žk)

V primerjalno skupino Žk smo vključili 12 klinično zdravih govedi, ki najmanj eno leto pred odvzemom vzorcev niso kazala znakov BRCD. Vzorce iz primerjalne skupine živih govedi smo označevali s črkama Žk in zaporedno številko (npr. Žk1, Žk2, Žk3 ...). Osnovni podatki o govedih iz skupine Žk so prikazani v tabeli 33.

3.2 RAZTELESBA

Pri vseh govedih iz skupine P in skupine Pk smo opravili popolno raztelesbo in ugotavljali makroskopske spremembe s poudarkom na pljučnicah. Pri raztelesbi smo ugotavljali s prostim očesom vidne in z drugimi čutili zaznavne patološke spremembe na organih.

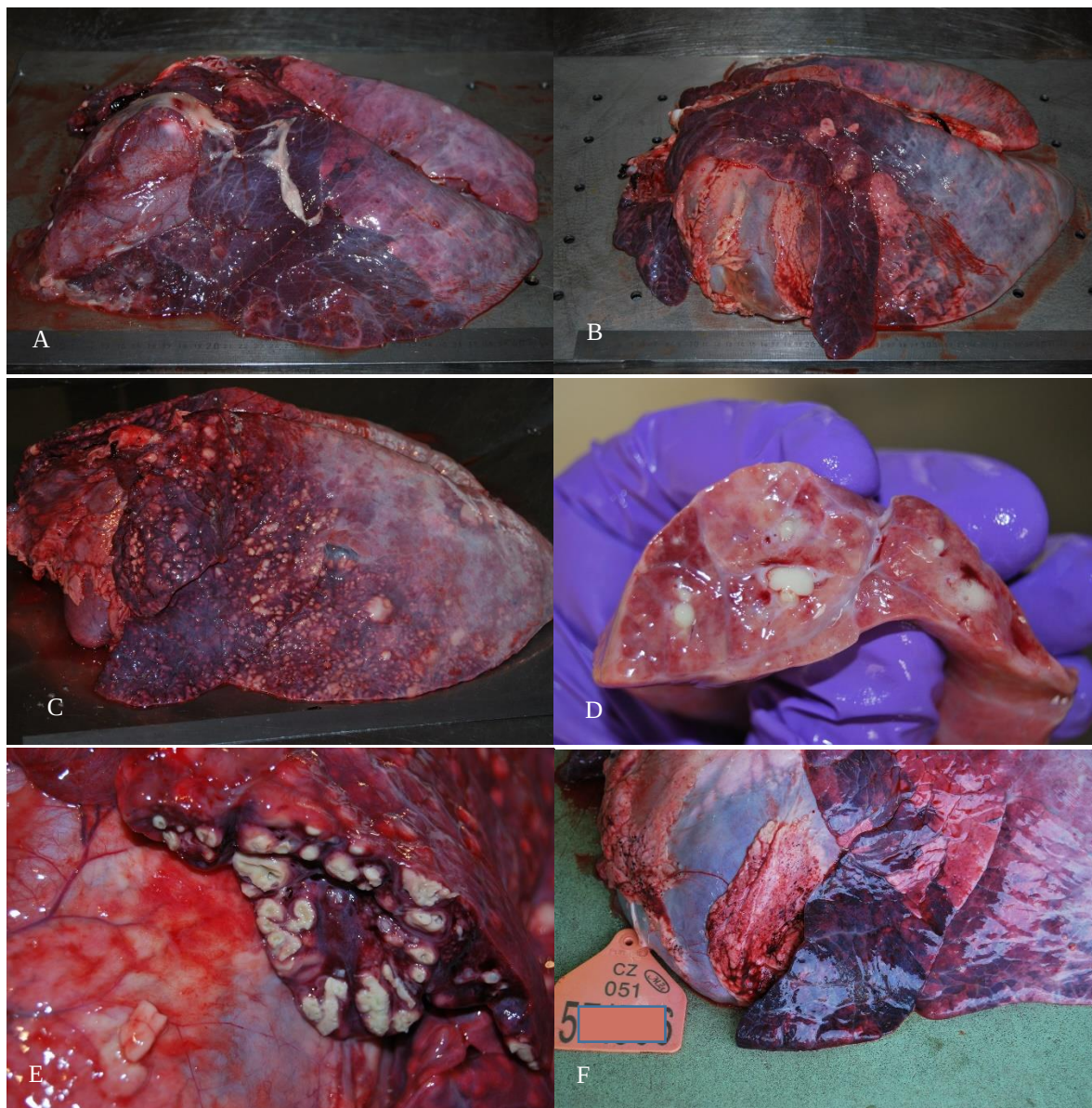
3.2.1 Klasifikacija pnevmoničnih sprememb

Najprej smo ocenili osnovne značilnosti pljučnice in jo na podlagi tega označili kot: gnojna bronhopnevmonija (1), fibrinozna bronhopnevmonija (2), intersticijska pljučnica (3), bronhointersticijska pljučnica (4), embolična pljučnica (5) in granulomatozna pljučnica (6).

Merilo za določitev vrste pljučnice je bila prisotnost naslednjih sprememb in značilnosti:

- Gnojna bronhopnevmonija (1)

V bronhih je gnojen ali sluzasto gnojen eksudat, pljučno tkivo je čvrsto elastične konsistence, temno rdeče do sivkasto rdeče barve; spremembe so lahko difuzne ali fokalne, v obliki gnojnih žarišč; koščki pljuč potonejo v kozarčku s fiksativom.



Slika 7: Primeri gnojne bronhopnevmonije

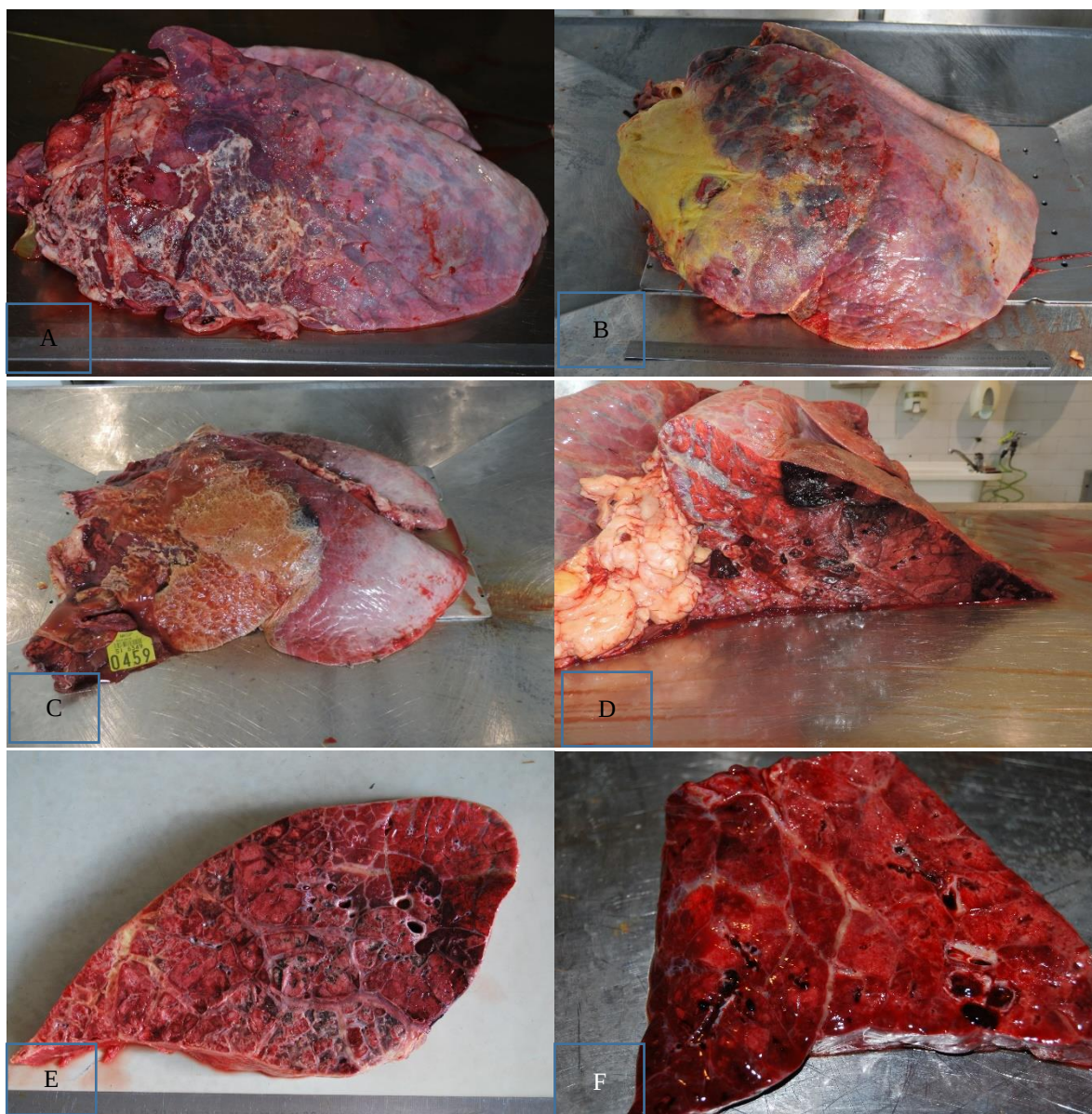
Figure 7: Examples of purulent bronchopneumonia

Na zgornjih fotografijah lahko vidimo različne primere gnojnih bronhopnevmonij. Akutna gnojna bronhopnevmonija, prizadeti deli so temno rdeče barve (A). Podobno kot na sliki A, vidna je konsolidacija kranialnih pljučnih režnjev (B). Kronična gnojna bronhopnevmonija; na pljučih so številna rumenkasto bela gnojna žarišča. Poleg kranialnih pljučnih režnjev so spremenjeni tudi prednji deli kavalnih režnjev (C). Pnevmonični pljučni reženj na prerezu, iz

bronhov se na pritisk izceja gnoj (D). Prečni prerez pljučnega režnja s slike C; številne bronhiektazije napolnjene z gnojno nekrotičnim eksudatom (E). Akutna gnojna bronhopnevmonija, pljučno tkivo je temno rdeče barve (F).

- Fibrinozna bronhopnevmonija (2)

V bronhih je fibrinozen ali gnojen eksudat, pljučno tkivo je temno rdeče do vijolično rdeče barve, na prerezu marmorirano; posamezni režnjiči so nekrotični, interlobularni intersticij je zaradi nabiranja eksudata razmaknjen; lahko je prisoten serofibrinozni plevritis, pogosto pa tudi sladkoben vonj nekrotičnega tkiva; koščki pljuč potonejo v kozarčku s fiksativom.



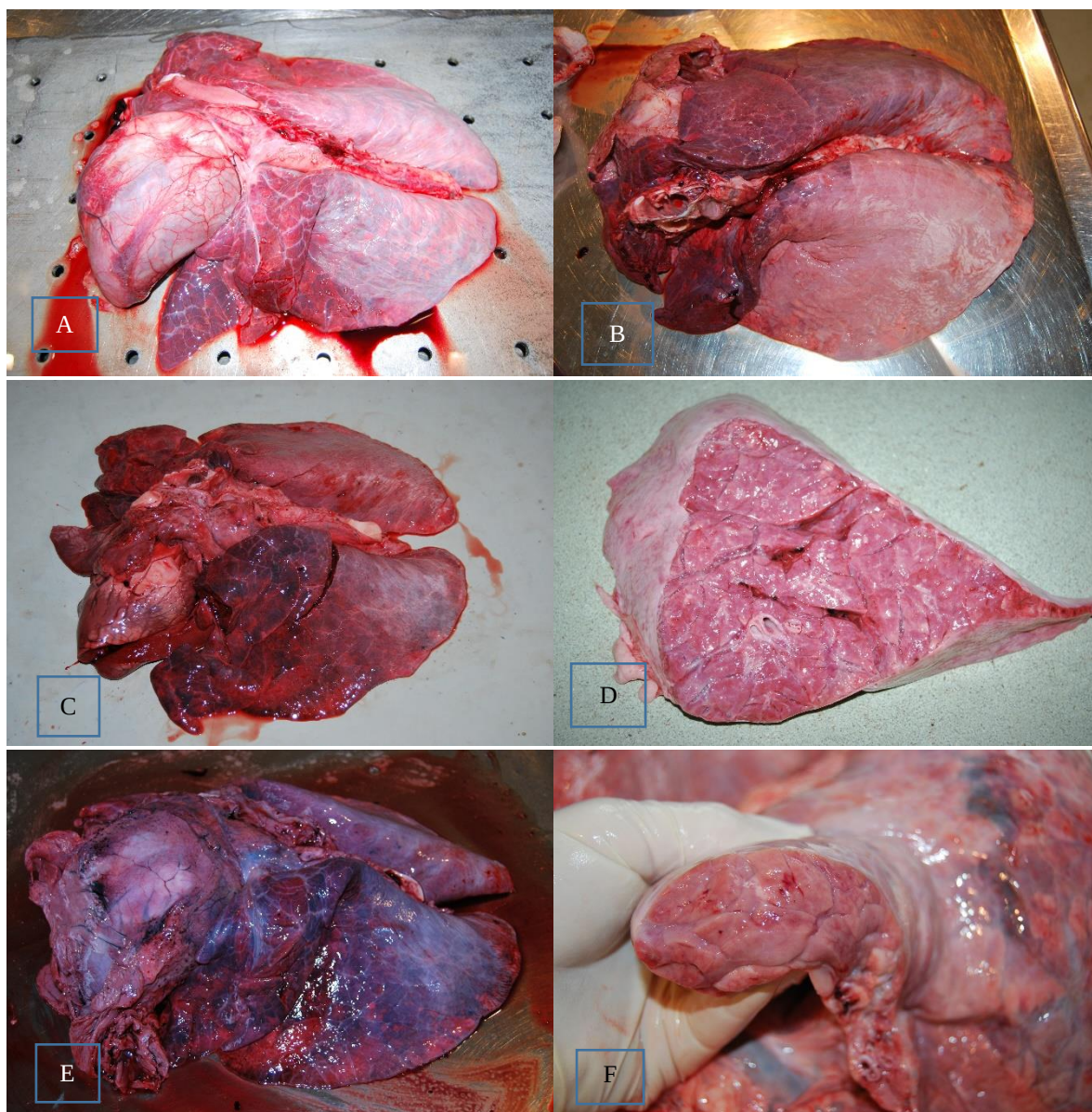
Slika 8: Primeri fibrinozne bronhopnevmonije

Figure 8: Examples of fibrinous bronchopneumonia

Na sliki 8 lahko vidimo primere fibrinozne bronhopnevmonije. Akutna fibrinozna bronhopnevmonija (A). Akutni fibrinozni plevritis kranainalnih delov pljuč; citronsko rumena barva fibrinskih oblog (B). Pnevmonično spremenjeni deli pljuč so prekriti s fibrinom (C). Prečni prerez pljučnega režnja – posamezni režnjiči so hemoragični (D). Značilen marmoriran videz pljučnega tkiva, številni režnjiči so nekrotični, interlobularni intersticij je zaradi eksudata razširjen, zato so meje med njimi poudarjene. Prežetost pljučnega tkiva s fibrinom, interlobularni intersticij je razmaknjen (F).

- Intersticijska pljučnica (3)

Pljuča so slabo kolabirana, mesnate konsistence, rdeče do sivkasto rdeče barve, difuzno uniformnega izgleda; bronhiji so brez eksudata; koščki pljuč plavajo na površini fiksativa.



Slika 9: Primeri intersticijske pljučnice

Figure 9: Examples of interstitial pneumonia

Na sliki 9 vidimo primere intersticijskih pljučnic. Akutna intersticijska pljučnica, vidimo kranioventralno razporeditev pnevmoničnih sprememb (A). Prizadeti pljučni režnji so polnokrvni in čvrstješi na otip (B). Difuzna razporeditev pnevmoničnih sprememb (C). Mesnata konsistenca, temnejša rdeča barva pljučnega tkiva (D). Difuzna razporeditev pnevmoničnih sprememb (E). Rožnato sivkasta barva, kronična intersticijska pljučnica (F).

- Bronhointersticijska pljučnica (4)

Pljuča so mesnate konsistence, svetlo rdeče barve, interlobularni intersticij je napihnjen; lahko nastanejo večje votline, napolnjene z zrakom; v razmaknjenem interlobularnem intersticiju so lahko prisotne krvavitve; koščki pljuč plavajo na površini fiksativa ali lebdiijo v njem.



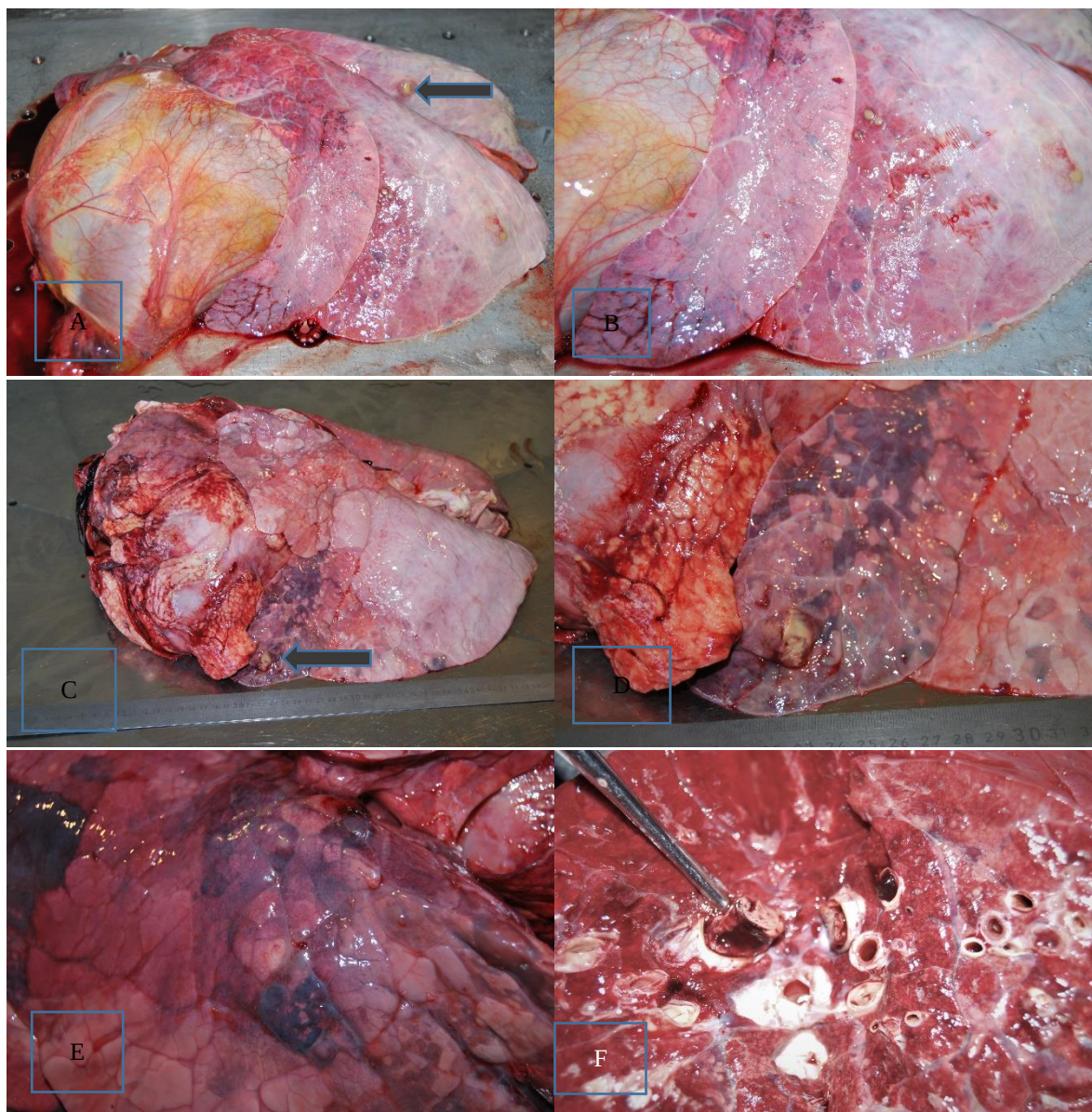
Slika 10: Primeri bronhointersticijske pljučnice

Figure 10. Examples of bronchointerstitial pneumonia

Na sliki 10 vidimo primere bronhointersticijskih pljučnic. Akutna bronhointersticijska pljučnica; kranioventralna razporeditev pnevmoničnih sprememb, kavdalni deli so emfizematozni (A). Pnevmonično spremenjeni kranialni deli pljuč so slabše vidni zaradi napihnenosti kavdalnih delov pljuč (B). Čvrsta konsistenca in temno rdeča barva pnevmonično spremenjenih delov pljuč; izrazit bulozni emfizem kavdalnega pljučnega režnja (C). Zaradi hudega emfizema privzdignjena popljučnica (D). Akutna bronhointersticijska pljučnica, na prečnem prerezu je vidno mesnato pljučno tkivo; interlobularni intersticij je zaradi akutnega emfizema razmaknjen (E). Komplikacija bronhointersticijske pljučnice – zaradi ekstremnega buloznega emfizema je popljučnica počila, kar je privedlo do pnevmotoraksa (F).

- Embolična pljučnica (5)

Po pljučih so vidna različno velika omejena vnetna žarišča, ki so na prerezu temno rdeče, rumene ali rjavkasto zelene barve; obrobljena so s hemoragičnim pasom, na njihovem prerezu je pogosto vidno nastajanje plina v patološko spremenjenem tkivu; koščki spremenjenih delov pljuč povečini plavajo na površini ali lebdiijo v fiksativu.



Slika 11: Primeri embolične pljučnice

Figure 11: Examples of embolic pneumonia

Slika 11 ponazarja primere embolične pljučnice. Embolična pljučnica; posamezna vnetna žarišča po pljučih (puščica) (A). Povečava pljuč s slike A; posamezna majhna temno rdeča in rumena vnetna žariča po pljučih (B). Fokalno pnevmonično žarišče na kavdalnem delu levega kranialnega pljučnega režnja (C). Povečana slika pljuč iz slike C (D). Akutna embolična pljučnica, hemoragično vnetno žarišča, okolni pljučni režnjiči so neprizadet (E) Zaradi metastaziranja procesa iz oddaljenega vnetnega žarišča je prišlo do tromboze ene od pljučnih arterij (F).

- Granulomatozna pljučnica

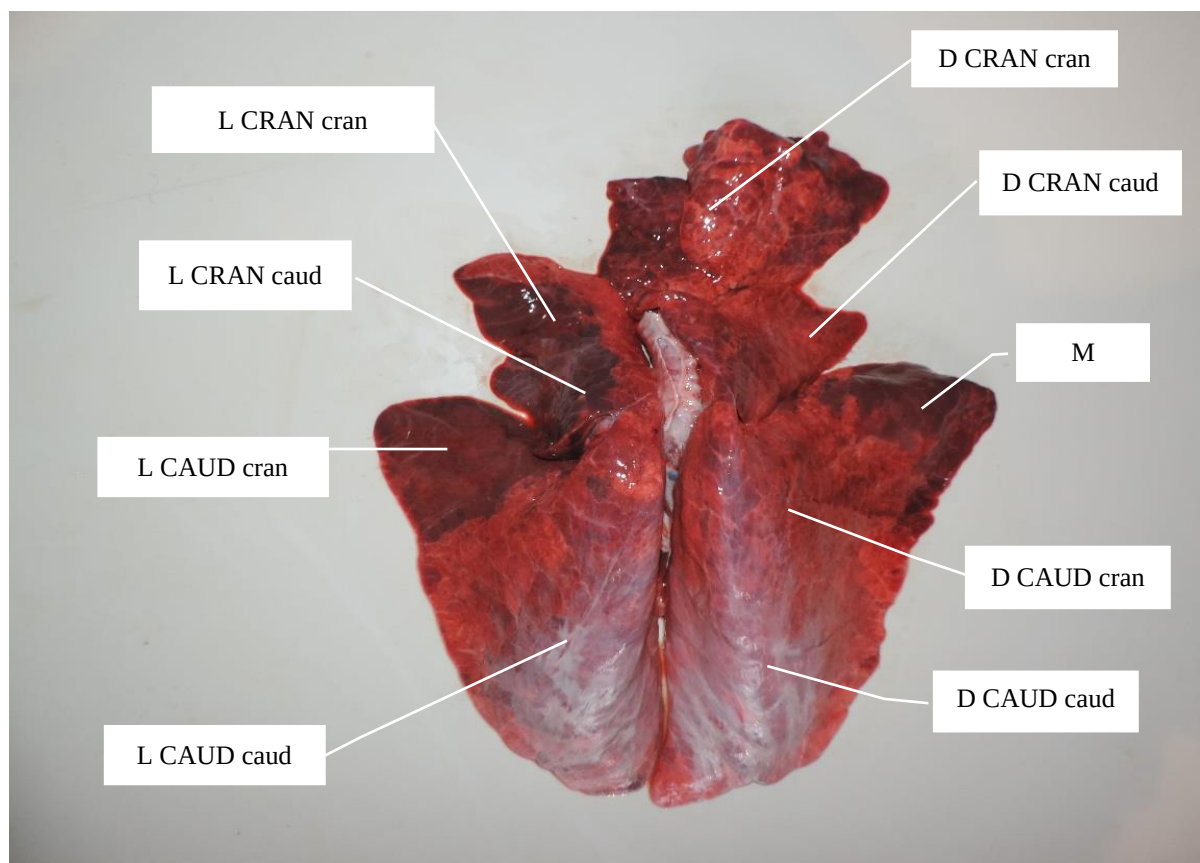
Pljuča so posuta z nekrotičnimi žarišči; na prerezu je vidna kazeozna nekroza prizadetega tkiva, ki se je iz tkiva ne da izluščiti; kako se obnašajo koščki pljuč v fiksativu, je odvisno od velikosti patoloških sprememb v samem vzorcu pljuč.

Pri patoanatomskem pregledu pljuč smo ocenili tudi starost pnevmoničnih sprememb. Za akutne smo označili gnojne spremembe brez abscesov, fibrinozne spremembe, hemoragične spremembe in svetlo rdeče mesnate spremembe pljučnega tkiva, ob katerih je bil prisoten izrazit emfizem interlobularnega intersticija.

Pri kroničnih pnevmoničnih procesih smo ugotovili abscese, vezivasto konsistenco spremenjenih delov pljuč, pnevmonične spremembe z adhezijami plevre in bronhiektazije, napolnjene z gnojnim eksudatom.

3.2.2 Ocena obsežnosti pnevmoničnih sprememb

Nadalje smo z makroskopskim pregledom ocenjevali obseg pljučnice v posameznih delih pljuč: v prednjem delu levega kranialnega pljučnega režnja (L CR cr), zadnjem delu levega kranialnega pljučnega režnja (L CR caud), prednjem delu levega kaudalnega pljučnega režnja (L CAUD cr), zadnjem delu levega kaudalnega pljučnega režnja (L CAUD caud), prednjem delu desnega kranialnega pljučnega režnja (D CR cr), zadnjem delu desnega kranialnega pljučnega režnja (D CR caud), medialnem pljučnem režnju (M), prednjem delu desnega kaudalnega pljučnega režnja (D CAUD cr) in zadnjem delu desnega kaudalnega pljučnega režnja (D CAUD caud).



Slika 12: Goveja pljuča – prikaz pljučnih režnjev.

Figure 12: Bovine lungs - display of pulmonary lobes.

Legenda za sliko 12: L CRAN cran – prednji del levega kranialnega pljučnega režnja, L CRAN caud – zadnji del levega kranialnega pljučnega režnja, L CAUD cran – prednji del levega kaudalnega pljučnega režnja, L CAUD caud – zadnji del levega kaudalnega pljučnega režnja, D CRAN cran – prednji del desnega kranialnega pljučnega režnja, D CRAN caud – zadnji del desnega kranialnega pljučnega režnja, M – medialni pljučni režanj, D CAUD cran – prednjem delu desnega kaudalnega pljučnega režnja, D CAUD caud – zadnji del desnega kaudalnega pljučnega režnja.

Obsežnost s pljučnico zajetega dela v posameznem delu pljuč smo ocenjevali s stopnjami od 0 do 4, pri čemer je bila stopnja:

0 = brez pljučnice,

1 = pljučnica zajema približno 1 do 25 % posameznega dela pljučnega režnja,

2 = pljučnica zajema približno 26 do 50 % posameznega dela pljučnega režnja,

3 = pljučnica zajema približno 51 do 75 % posameznega dela pljučnega režnja,

4 = pljučnica zajema približno 76 do 100 % posameznega dela pljučnega režnja.

Končno oceno obsežnosti pnevmoničnih sprememb za posamezni del pljuč smo za vsak tip pljučnice izrazili kot srednjo vrednost (mediano) ugotovljenih frekvenc ocene obsežnosti pri vseh govedih iz skupine P.

3.3 PATOHISTOLOŠKA PREISKAVA

Pri 113 govedih iz skupine P smo iz odvzetih vzorcev opravili patohistološko preiskavo. Vzorčili smo kranialni, medialni in kaudalni pljučni reženj, pri čemer smo iz posameznega pljučnega režnja vedno odvzeli patološko spremenjen del. Površina odvzetih vzorcev je bila približno 2 cm², debelina pa 0,5 cm.

Odvzete vzorce smo shranili v kozarčkih z 10-odstotnim puferiranim formalinom (pH = 7,2) in kozarčke ustrezno označili. Vzorce smo fiksirali na sobni temperaturi najmanj tri dni. Po fiksaciji smo vzorce vložili v ustrezno označene plastične košarice in jih pripravili za vklop v parafin. Fiksirane koščke organov smo vklopili v parafin v aparaturi Thermo Scientific™ Excelsior™ ES. V parafin vklopljene koščke smo zalili v parafinske blokce z aparaturo Thermo Scientific™ Microm EC 350-2. Iz tako pripravljenih blokcev smo na drsnem mikrotomu Leica™ SM 2000R narezali 4 µm debele parafinske tkivne rezine. Predmetna stekelca s prilepljenimi tkivnimi rezinami smo približno za dve uri postavili v termostat na približno

45 °C. Parafinske tkivne rezine smo v aparaturi Shandon™ Varistain 24-3 (Velika Britanija) najprej deparafinizirali, nato pa obarvali s hematoksilinom in eozinom (HE) – jedra celic so se obarvala modro, citoplazma in druge strukture pa rožnato do rdeče. Obarvane tkivne rezine smo v omenjeni aparaturi dehidrirali v alkoholih naraščajoče koncentracije in jih zbistrili v ksilolu. Tkivne rezine smo nato pokrili s kapljico sintetične smole za pokrivanje tkivnih rezin in nanjo poveznili pokrivno stekelce ter posušili na zraku. Patohistološke preparate smo pregledali s svetlobnim mikroskopom Nikon™ Alphaphot – 2 YS2 pri 40-kratni, 100-kratni in 400-kratni povečavi. Patohistološke spremembe smo fotografirali s kamero Nikon™ DX-DB2 na mikroskopu Nikon™ Microphot-FXA. Pri obdelavi slike smo uporabljali računalniški program NIS-ELEMENTS F 3.2 Nikon™ in kontrolno enoto Nikon™ DS-U2. Obdelava vzorcev organov in izdelava tkivnih rezin za patohistološko preiskavo sta bili opravljena na Inštitutu za patologijo, divjad, ribe in čebele (IPDRČ) VF.

3.3.1 Ocena patohistoloških sprememb

V vsakem vzorcu pljuč smo določili vrsto patološkega procesa in ocenili njegovo razporeditev. Vrste patološkega procesa smo določili po kriterijih, navedenih v tabeli 1. Definicije patoloških procesov so povzete po Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology of Domestic Animals (Caswell in Williams, 2016).

Razporeditev patohistoloških sprememb smo ocenili s stopnjami:

0 = brez sprememb,

1 = fokalne ali multifokalne spremembe,

2 = obsežna fokalna sprememba,

3 = zelo obsežna fokalna sprememba ali obsežne multifokalne spremembe,

4 = difuzna sprememba (sprememba, ki zajema celo tkivno rezino).

Tabela 1: Merila za določitev vrste patološkega procesa v pljučih

Table 1: Criteria for determining the type of pathological changes in lungs

Oznaka	Patološki proces	Opis patohistoloških sprememb
1	Kataralni bronhitis	V bronhih je eksudat s posameznimi odluščenimi epitelijskimi celicami bronhialne sluznice in posameznimi granulociti.
2	Mukopurulentni bronhitis	V bronhih je eksudat z veliko sluzi in granulociti.
3	Fibrinozni bronhitis	V bronhih je eksudat, bogat s fibrinom.
4	Fibrinozno gnojni bronhitis	V bronhih je eksudat s številnimi granulociti in fibrinom.
5	Gnojni bronhitis	V bronhih je eksudat s številnimi granulociti in posameznimi epitelijskimi celicami bronhialne sluznice.
6	Kronični bronhitis	Epitelij bronhialne sluznice je hiperplastičen/ulceriran ali skvamozno metaplaziran; v sluznici so vidni infiltrati limfocitov, plazmatk in včasih tudi makrofagov ter granulocitov.
7	Bronhiektazije	Razširitve bronhov, napolnjene z nekrotičnim eksudatom, pri čemer hrustančno tkivo izginja in ga nadomešča vezivno tkivo.
8	Bronhiolarna nekroza	Epitelijske celice sluznice bronhiolov so nabrekle in propadajo; v svetlinah bronhiolov so nekrotične epitelijske celice s sincicijskimi celicami ali brez njih.
9	Obliterirajoči bronhiolitis	V svetline bronhiolov vraščajo z epitelom pokriti vezivni polipi, ki lahko svetlino bronhiolov popolnoma zapolnijo.
10	Gnojna bronhopnevmonija	Bronhioli in alveole so napolnjeni z eksudatom, v katerem prevladujejo granulociti.
11	Fibrinozna bronhopnevmonija	Bronhioli in alveole so napolnjeni z eksudatom, v katerem prevladuje fibrin.
12	Fibrinonekrotična pnevmonija	Multifokalne (koagulacijske) nekroze, prežete s fibrinom in obdane s pasom ovsenih celic.
13	Kazeozne nekroze	Kazeozne nekroze
14	Kronična gnojna bronhopnevmonija	Bronhioli in alveole so napolnjeni z eksudatom, v katerem prevladujejo granulociti, ob tem nastajajo fokalni ali multifokalni abscesi.
15	Aspiracijska pnevmonija	V bronhih in bronhiolih so poleg eksudata prisotni rastlinski delci.
16	Intersticijska pnevmonija	Intervalveolarni intersticij je zadebeljen in hipercelularen, v alveolah so prisotni edem ali hialine membrane.

17	Intersticijska fibroza	Interalveolarni intersticij je zadebeljen, v njem so številni zreli vezivni elementi.
18	Bronhointersticijska pnevmonija	Svetlina bronhiolov je polna nekrotičnih epitelijskih celic in interalveolarni intersticij je hiperceličen.
19	Embolična pnevmonija	V pljučnih žilah so multifokalni septični emboli ali so prisotni multifokalni hematogeni abscesi.
20	Granulomska pnevmonija	V pljučih so številni granulomi.
21	Fibrinozni plevritis	Na plevri so fibrinske obloge.
22	Gnojni plevritis	Plevra je infiltrirana s številnimi granulociti.
23	Fibrinozno gnojni plevritis	Fibrinske obloge, prežete s številnimi granulociti na plevri.
24	Adhezije/fibroza plevre	Plevra je zadebeljena zaradi prisotnosti zrelega veznega tkiva.
25	Krvavitve	V alveolah, v okolici krvnih žil in septih so prisotne krvavitve.
26	Emfizem	Alveoli so razmaknjeni, njihova stena je popokana; lahko je razmaknjen interlobularni intersticij, v njem so nastale različno velike votline, napolnjene s plinom.
27	Hiperplazija BALT	Limfatično tkivo okrog bronhov brsti.

3.3 IMUNOHISTOKEMIČNA PREISKAVA (IHC)

Na vzorcih kranialnih pljučnih režnjev naključno izbranih govedi iz skupine P smo opravili imunohistokemične preiskave (IHC) na prisotnost šestih različnih povzročiteljev BRDC. Na bakterijo *M. bovis* smo pregledali vzorce pljuč 108 govedi, na BRSV vzorce pljuč 101 govedi, na BPI3 vzorce pljuč 98 govedi, na BoHV-1 vzorce pljuč 102 govedi, na BAdV vzorce pljuč 96 govedi in na BVDV vzorce pljuč 100 govedi iz skupine P.

IHC smo opravili na parafinskih tkivnih rezinah, debeline 4 µm, ki smo jih prenesli na objektna stekelca, prevlečena s 3-aminopropiltrietoksilanom (APTES), in jih nato sušili v termostatu pri temperaturi 45 °C čez noč. Tkivne rezine smo pred imunohistokemičnim označevanjem deparafinizirali v aparaturi Varistain (Shandon®).

V tabeli 2 so prikazana protitelesa, ki smo jih uporabili za dokaz specifičnih antigenov povzročiteljev BRDC v tkivnih rezinah.

Tabela 2: Seznam uporabljenih protiteles pri IHC in njihove osnovne značilnosti

Table 2: List of used antibodies at IHC and their main characteristics

Antigen	Oznaka protiteles	Specifičnost vezave	Material in razredčitev	Proizvajalec
BAdV	mišje mAb proti adenovirusu klon 2/6 in 20/11, kat. oznaka: MAB805	41 serotipov BAdV	parafinske rezine 1 : 1000	Millipore
BoHV-1	mišje mAb proti bovinemu herpesvirusu 1 F2	BoHV-1	parafinske rezine 1 : 3000	VMRD
BVDV	mišje mAb proti pestivirusom, specifično za BVDV, kat. oznaka: MABMIX	Pestivirusi	parafinske rezine 1 : 200	VLA
<i>M. bovis</i>	mišje mAb proti <i>Mycoplasma bovis</i> , kat. oznaka: MAB970	<i>M. bovis</i>	parafinske rezine 1 : 1000	Millipore
BPI3	mišje mAb proti virusu BPI3, kat. oznaka: BIO 290	BPI3	parafinske rezine 1 : 20	Bio-X Diagnostics
BRSV	mišje mAb proti BRSV, kat. oznaka: 210-70-BRSV	BRSV	parafinske rezine 1 : 500	VMRD

Legenda: mAb – monoklonska protitelesa, pAb – poliklonska protitelesa

Za imunohistokemično označevanje antigenov smo uporabili komercialno dostopen kit Dako REAL™ EnVision™ Detection System Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse (DAKO, kat. št. K5007). Postopek za označevanje antigenov je naslednji:

1. Deparafinizacija tkivnih rezin do vode.
2. Demaskiranje antigenov v mikrovalovni pečici:
 - v vrelem citratnem pufru pH 6,0 s trajanjem 10 minut – BoHV 1, PI 3,
 - v vrelem citratnem pufru pH 6,0 v trajanju 20 minut – BAdV,
 - v EDTA 10 minut – BRSV, *Mycoplasma bovis*.Hlajenje rezin v pufru TBST (Tris-Buffered–Saline–Tween) pH 7,5 do sobne temperature.
3. Kratko spiranje z destilirano vodo.
4. Inkubacija s primarnimi protitelesi, razredčenimi v DAKO Cytomation Antibody Diluent (DAKO, kataloška oznaka S0805). Na podlagi predhodne optimizacije postopka smo v tej fazi uporabili primarna protitelesa. Uporabljena protitelesa so prikazana v tabeli 2.
5. Kratko spiranje v izpiralnem pufru (pet minut).
6. Inhibicija endogene peroksidaze v Peroxidase-Blocking Solution, Dako REAL™ (DAKO, kataloška oznaka S2023) 30 minut.
7. Inkubacija s sekundarnimi protitelesi (kozja protitelesa specifična proti mišjim ali kunčjim protitelesom), konjugirana s polimerom, označenim s hrenovo peroksidazo, iz vizualizacijskega kita DAKO REAL™ EnVision™ Detection System Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse (DAKO, kat. št. K5007) (steklenička A), v vlažni komori na sobni temperaturi 20 minut.
8. Kratko spiranje v izpiralnem pufru 5 minut.
9. Inkubacija z delovno raztopino substrata s 3-diaminobenzidinom (DAB). Raztopino barvnega substrata smo pripravili pred uporabo tako, da smo v pufer iz kita (Substrate Buffer – steklenička B) dodali kromogen iz kita (DAB + Chromogen – steklenička C), v razmerju 1 ml pufera in 20 µl kromogena. Označene tkivne rezine smo inkubirali pri sobni temperaturi sedem minut.
10. Spiranje z destilirano vodo in nato kontrastiranje z Mayerjevim hematoksilinom 1 minuto.
11. Spiranje v izpiralnem pufru PBS 1 minuto.
12. Spiranje v tekoči vodi 20 minut, dehidracija v naraščajoči vrsti alkoholov, bistrenje v ksilolu in pokrivanje s sintetično smolo.

Kot izpiralni pufer smo uporabili pufer TBST s pH 7,5. Najprej smo pripravili 900 ml osnovne raztopine TBST, ki se pripravi tako, da 60,57 g Tris base (Sigma®) dodamo 87,66 g NaCl in 850 ml destilirane vode. Tako pripravljeno osnovno raztopino smo uravnali s HCl na pH 7,5, pri čemer je približna poraba HCl 34 ml.

1000 ml delovne raztopine smo pripravili tako, da smo 100 ml osnovne raztopine TBST dodali 900 ml destilirane vode in 0,5 ml Tween 20®.

Pozitivna reakcija pri imunohistokemičnem postopku s substratom je vidna kot rjav netopen reakcijski produkt. Jedra celic se po kontrastiranju s hematoksilinom obarvajo nežno modro.

V vsakem od imunohistokemičnih postopkov smo uporabili tudi kontrole. Za pozitivno kontrolo pri imunohistokemičnem označevanju smo uporabili parafinske tkivne rezine, v katerih je bil določen povzročitelj predhodno dokazan z RT-qPCR ali s qPCR.

Kot negativno kontrolo smo uporabili poznan negativni vzorec tkiva na iskani antigen.

Ponovljivost IHC reakcije smo kontrolirali tako, da smo v vsako serijo barvanja vzorcev vključili poznan pozitivni vzorec tkiva na iskani antigen. Rezultate IHC reakcije smo ocenili s primerjavo reakcije na pozitivni in negativni kontroli.

3.4 BAKTERIOLOŠKA PREISKAVA

Klasično bakteriološko preiskavo iz vzorcev pljučnega tkiva smo opravili pri 107 govedih iz skupine P, pri 50 govedih iz skupine P smo bakteriološko pregledali bris nosne sluznice, pri 9 govedih s plevritisom smo pregledali tudi bris plevre. Ker smo želeli pridobiti informacijo o morebitnem septikemičnem poteku BRDC, smo pri 80 govedih iz skupine P s klasično bakteriološko preiskavo pregledali tudi vzorec tkiva vranice, pri 69 pa vzorec jetrnega tkiva.

Splošna aerobna gojiščna bakteriološka preiskava je bila opravljena neposredno iz vzorcev pljuč na krvnem agarju (hranljivi agar s 5 % dodane krvi) in agarju po Drigalskem. Po potrebi je bila poleg gojiščne preiskave opravljena tudi biokemična determinacija posameznih vrst bakterij.

Vse bakteriološke preiskave so bile opravljene na Enoti za bakteriologijo Inštituta za mikrobiologijo in parazitologijo (IMP) VF.

3.5 VIROLOŠKE PREISKAVE

Virološke preiskave smo opravili tako iz vzorcev tkiv govedi iz skupine P kot tudi iz vzorcev, odvzetih govedim iz skupine Ž. Preiskave iste vrste smo opravili tudi na vzorcih govedi obeh pripadajočih primerjalnih skupin (Pk, Žk).

3.5.1 Virološke preiskave pri govedih iz skupine P

3.5.1.1 Izolacija virusov na celični kulturi pri govedih iz skupine P (IVCK P)

Pri 116 govedih iz skupine P smo opravili IVCK. Približno za oreh velike vzorce pljuč teh govedi, ki smo jih odvzeli ob raztelesi, smo v digestoriju s sterilnimi škarjami razrezali na drobne koščke, ki smo jih zgnetli s kompletom Precells Lysing kit® (Bertin technologies, France) v gojišču RPMI v razmerju 1 : 5. Suspenzijo tkiva smo centrifugirali pri $1000 \times g$ v centrifugi Rotanta 46 RS (Hettich, Nemčija), nato pa supernatant filtrirali skozi filter Minisart™ s porami $0,45 \mu m$. Filtrat smo do uporabe hranili v epruvetah pri temperaturi $< -60^\circ C$.

IVCK smo opravili na celični kulturi BT – Bovine Turbinal (Svanova, Švedska). Celice smo množili v gojišču DMEM (Thermo Fisher Scientific, Gibco BRL, Velika Britanija), ki smo mu dodali 10-odstotni fetalni serum (Thermo Fisher Scientific, Gibco BRL, Velika Britanija) in antibiotik-antimikotik (Anti-anti, Thermo Fisher Scientific, Gibco BRL, Velika Britanija).

Postopek izolacije virusov smo izvajali na mikrotiterskih ploščah s 96 jamicami (TPP, Švica). Celično kulturo BT smo tripsinizirali in v posamezne jamice mikroplošč pipetirali po $100 \mu l$ celične suspenzije (300.000 do 400.000 celic/ml). Po 24-urni inkubaciji pri $37^\circ C$ smo v prvo jamico kolone pipetirali po $50 \mu l$ filtriranega vzorca. S prenašanjem po $50 \mu l$ vsebine jamice smo pripravili dvakratne redčitve suspenzije vzorca. Na vsako ploščo smo vključili tudi stolpec jamic, kjer smo v vdolbinice pipetirali le celice, kar smo uporabili kot negativno kontrolo oz. kot kontrolo rasti celične linije BT. Kot pozitivno kontrolo smo uporabili poznano pozitiven vzorec BRSV, ki smo ga nanegli na celično kulturo kot ostale preiskovane vzorce.

Pod invertnim svetlobnim mikroskopom smo v posameznih jamicah vsakodnevno spremljali morebiten pojav citopatskega efekta ali pojav bakterijske kontaminacije. Pojav rasti citopatogenih virusov smo dokazovali po nadaljnji slepi pasaži. Necitopatogenih virusov v našem primeru nismo dokazovali.

3.5.1.2 Dokazovanje respiratornih patogenov z molekularnimi metodami (RT-qPCR, qPCR)

Pri delu z molekularnimi metodami (RT-qPCR, qPCR) ugotavljanja respiratornih patogenov smo uporabili materiale, ki so bili prosti DNA-az in RNA-az, vsa pipetiranja smo opravili s

kalibriranimi pipetami. Pri izvajanju postopkov smo uporabljali rokavice za enkratno uporabo, ki smo jih po potrebi takoj zamenjali z novimi. Pri enem izvajanju izolacije nukleinskih kislin smo hkrati izolirali največ 12 vzorcev.

3.5.1.2.1 Izolacija RNA in DNA iz vzorcev pljuč govedi iz skupine P

Odvzete vzorce pljuč smo takoj po prispetju v laboratorij homogenizirali v 2 ml gojišča RPMI (Gibco, UK) in jih do nadaljevanja preiskave shranili v zamrzovalniku pri $< -50^{\circ}\text{C}$.

Za izolacijo nukleinskih kislin RNA in DNA iz preiskovanih vzorcev smo uporabili komercialni komplet reagentov QIAamp® Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Germany) in izolacijo izvedli po navodilih proizvajalca. Princip izolacije nukleinskih kislin temelji na selektivni vezavi RNA in DNA na membrano iz silikatnega gela, vezanega na QIAamp kolonice.

Najprej smo za posamezni vzorec v 1,5-mililitrskih epruvetah (Eppendorf; Nemčija) pripravili mešanico 560 μl pufra AVL in 5,6 μl "carrier" RNA.

Mešanici smo dodali 140 μl preiskovanega vzorca in vsebino epruvete premešali na vorteksu ter inkubirali 10 minut pri sobni temperaturi. Epruvete smo na kratko centrifugirali (angl. spin down), da smo odstranili tekočino s pokrovčkov epruvet.

Vzorcem smo dodali 560 μl absolutnega (99 %) etanola (Merck, ZDA), na kratko premešali na vorteksu in centrifugirali.

Iz 1,5-mililitrske epruvete smo na QIAamp® kolono prenesli 630 μl mešanice in centrifugirali 1 minuto pri 6.000 x g. Filtrat zbirne epruvete smo zavrgli in kolonice vstavili v nove zbirne epruvete ter na kolono nanesti preostanek mešanice iz 1,5-mililitrske epruvete.

QIAamp® kolonice smo vstavili v nove zbirne epruvete in na posamezno kolonico nanesti 500 μl pufra AW1 ter centrifugirali 1 minuto pri 6.000 x g.

QIAamp® kolonice smo vstavili v nove zbirne epruvete in na posamezno kolonico nanesti 500 μl pufra AW2 ter centrifugirali 3 minute pri 14.000 x g.

QIAamp® kolono smo prenesli v 1,5-mililitrsko epruveto (Eppendorf, Nemčija) in v sredino membrane kolone nanesti 60 μl pufra AVE. Nato smo inkubirali 1 minuto in centrifugirali 1 minuto pri 6000 x g. Kolono smo zavrgli, izolirano RNA in DNA pa do nadaljevanja preiskav shranili pri $< -50^{\circ}\text{C}$.

3.5.1.2.2 Dokazovanje 7 respiratornih patogenov s komercialnim RT-qPCR kompletom LSI VetMAX™ Screening Pack Ruminants Respiratory Pathogens

Vzorci smo testirali s komercialnim kompletom LSI VetMAX™ Screening Pack Ruminants Respiratory Pathogens (TaqMan® real-time PCR kit for detection of seven major ruminant pathogens, LSI, Francija), ki omogoča hkratno dokazovanje 7 različnih respiratornih patogenov

z metodama qPCR in RT-qPCR. Komercialni kit vsebuje sedem reakcijskih mešanic za dokazovanje sedmih različnih respiratornih patogenov in eno pozitivno kontrolo (mešanica vsebuje nukleinske kisline vseh sedmih patogenov). Za kontrolo prisotnosti inhibitorjev nam služi interna pozitivna kontrola (IPC), ki je sestavni del reakcijske mešanice in je uporabljena pri vsakem vzorcu, testiranem na posamezni patogen. Komercialni komplet LSI VetMAX™ Screening Pack Ruminants Respiratory Pathogens omogoča dokazovanje nukleinskih kislin naslednjih patogenov: *M. bovis*, *H. somni*, *P. multocida*, *M. haemolytica*, BCoV, BRSV in BPI3. Test smo izvajali po navodilih proizvajalca. Najprej smo si naredili načrt razporeditve testiranih vzorcev v optični ploščici. Na eni plošči smo lahko hkrati testirali največ 12 preiskovanih vzorcev, vsak vzorec na 7 različnih patogenov. Na vsako optično ploščico smo vključili vseh sedem pozitivnih kontrol (vrstica H) za kontrolo pravilnosti izvedbe postopka (tabela 3).

Tabela 3: Shema optične ploščice za 12 preiskovanih vzorcev, testiranih na 7 različnih respiratornih patogenov
Table 3: Scheme of optical plate for 12 examined samples tested for 7 different respiratory pathogens

	Vzorec 1	Vzorec 2	Vzorec 3	Vzorec 4	Vzorec 5	Vzorec 6	Vzorec 7	Vzorec 8	Vzorec 9	Vzorec 10	Vzorec 11	Vzorec 12
A	M. bo.	M. bo.	M. bo.	M. bo.	M. bo.	M. bo.	M. bo.	M. bo.	M. bo.	M. bo.	M. bo.	M. bo.
B	H. som.	H. som.	H. som.	H. som.	H. som.	H. som.	H. som.	H. som.	H. som.	H. som.	H. som.	H. som.
C	P. mul.	P. mul.	P. mul.	P. mul.	P. mul.	P. mul.	P. mul.	P. mul.	P. mul.	P. mul.	P. mul.	P. mul.
D	M. hae.	M. hae.	M. hae.	M. hae.	M. hae.	M. hae.	M. hae.	M. hae.	M. hae.	M. hae.	M. hae.	M. hae.
E	BCV	BCV	BCV	BCV	BCV	BCV	BCV	BCV	BCV	BCV	BCV	BCV
F	BRSV	BRSV	BRSV	BRSV	BRSV	BRSV	BRSV	BRSV	BRSV	BRSV	BRSV	BRSV
G	BPI3	BPI3	BPI3	BPI3	BPI3	BPI3	BPI3	BPI3	BPI3	BPI3	BPI3	BPI3
H	M. bo. kontrola	M. bo. kontrola	P. mul. kontrola	M. hae. kontrola	BoCV kontrola	BRSV kontrola	BPI3 kontrola					

V posamezno jamico optične ploščice smo s pipeto nanesti po 20 µl reakcijske mešanice in dodali 5 µl izolirane nukleinske kisline posameznega vzorca. Na ustrezno mesto smo dodali po 5 µl pozitivne kontrole. Optično ploščico smo zatesnili s samolepilno folijo, jo na kratko centrifugirali in pomnoževanje nukleinskih kislin izvedli na kalibrirani aparaturi Mx3005P (Stratagen, ZDA). Vsako jamico mikroploščice s preiskovanimi vzorci in kontrolami smo označili z dvema detekcijskima sondama: FAM-NFQ (sonda za dokazovanje pomnoževanja posameznega patogena) in HEX-TAMRA (sonda za dokazovanje pomnoževanja interne pozitivne kontrole).

Pomnoževanje nukleinskih kislin je na aparaturi Mx3005P potekalo:

- reverzna transkripcija 10 min pri 45 °C,
- denaturacija 10 min pri 95 °C,
- 45 ciklov: denaturacija 15 s pri 95 °C in pomnoževanje 60 s pri 60 °C.

Po koncu pomnoževanja smo določili avtomatsko bazno linijo in Ct vrednosti za posamezni vzorec odčitati za obe sondi. Vzorce smo ovrednotili kot pozitivne ali negativne po navodilih proizvajalca (Tabela 4).

Tabela 4: Vrednotenje rezultatov na podlagi Ct vrednosti

Table 4: Valuation of results based on Ct-value

Rezultat	Sonda za posamezni respiratorni patogen (FAM)	Sonda IPC (HEX)
Pozitiven	ct < 45	ct < 45 ali ct > 45
Negativen	ct > 45	ct < 45
Neveljaven rezultat	ct > 45	ct > 45

3.5.1.2.3 Dokazovanje nukleinske kisline BVDV s komercialnim RT-qPCR kompletom PrioCHECK® BVDV RT-PCR

Za dokazovanje nukleinske kisline BVDV v preiskovanih vzorcih smo uporabili komercialni kit PrioCHECK® BVDV RT-PCR (Prionics, Švica). Test omogoča dokazovanje BVDV genotipa 1 in genotipa 2. Za kontrolo prisotnosti inhibitorjev smo uporabili interno pozitivno kontrolo (IPC), ki je del reakcijske mešanice in je uporabljena pri vsakem vzorcu. Test smo izvajali po navodilih proizvajalca.

Na protokolnem listu smo pripravili načrt razporeditve preiskovanih vzorcev in vnosa reagentov na optično ploščico. V posamezno jamico optične ploščice smo vnesli po 19,75 µl reakcijske mešanice (PCR Master Mix), 0,25 RT-Mix in tej mešanici dodali 5 µl izolirane nukleinske kisline posameznega vzorca. V vsako izvedbo testa smo vključili tudi po en pozitivni in negativni kontrolni vzorec, ki je sestavni del diagnostičnega kompleta.

Pomnoževanje nukleinskih kislin je na aparaturi Mx3005P potekalo:

- reverzna transkripcija 20 min pri 50 °C,
- denaturacija 5 min pri 95 °C,
- 45 ciklov: denaturacija 15 s pri 95 °C in pomnoževanje 45 s pri 60 °C.

Po koncu pomnoževanja smo določili avtomatsko bazno linijo in Ct vrednosti za posamezni vzorec odčitati za obe sondi. Vzorce smo ovrednotili kot pozitivne ali negativne na virus BVD po navodilih proizvajalca (tabela 5).

Tabela 5: Vrednotenje rezultatov na podlagi Ct vrednosti za BVDV

Table 5: Valuing of the results based on Ct-values for BVDV

Rezultat	Sonda BVD (FAM)	Sonda IPC (HEX)
Pozitiven BVDV	ct < 45	ct < 45 ali ct > 45
Negativen BVDV	ct > 45	ct < 45
Neveljaven rezultat	ct > 45	ct > 45

3.5.1.2.4 Dokazovanje nukleinske kisline BoHV-1 s komercialnim kompletom RT-PCR LSI VetMAX™ IBR gB

Za dokazovanje nukleinske kisline BoHV-1, povzročitelja IBR/IPV, v preiskovanih vzorcih smo uporabili LSI VetMAX™ IBR gB (Life Technologies, ZDA). Test omogoča dokazovanje nukleinske kisline BoHV-1 v regiji genoma, ki kodira virusni protein gB. Za kontrolo prisotnosti inhibitorjev nam služi pomnoževanja interne pozitivne kontrole (IPC), katere reagenti so del reakcijske mešanice, ki omogoča pomnoževanje nukleinske kisline IPC vsakega vzorca. Test smo izvajali po navodilih proizvajalca.

Na protokolu smo pripravili načrt razporeditve preiskovanih vzorcev in vnos reagentov na optično ploščico. V posamezno jamico optične ploščice smo vnesli po 20 µl reakcijske mešanice (Mix IBR) in dodali 5 µl izolirane nukleinske kisline posameznega vzorca. V vsako izvedbo testa smo vključili tudi po en vzorec pozitivne kontrole iz kita.

Pomnoževanje nukleinskih kislin je na aparaturi Mx3005P potekalo:

- reverzna transkripcija 2 min pri 50 °C,
- denaturacija 10 min pri 95 °C,
- 45 ciklov: denaturacija 15 s pri 95 °C in pomnoževanje 1 min pri 60 °C.

Po koncu pomnoževanja smo določili avtomatsko bazno linijo in Ct vrednosti za posamezni vzorec odčitati za obe sondi. Vzorce smo ovrednotili kot pozitivne ali negativne na BoHV-1 po navodilih proizvajalca (Tabela 6).

Tabela 6: Vrednotenje rezultatov na podlagi Ct vrednosti za BoHV-1

Table 6: Valuing of the results based on Ct-values for BoHV-1

Rezultat	Sonda BoHV-1 (HEX)	Sonda IPC (FAM)
Pozitiven BoHV-1	ct < 45	ct < 45 ali ct > 45
Negativen BoHV-1	ct > 45	ct < 45
Neveljaven rezultat	ct > 45	ct > 45

3.5.1.2.5 Dokazovanje nukleinske kisline BAdV s protokolom za dokaz serotipov BAdV 4, 5, 6, 7, 8 (4–8)

Za dokazovanje nukleinske kisline BAdV (4–8) v preiskovanih vzorcih smo uporabili enake začetne oligonukleotide in sondo, kot sta jih v svoji raziskavi uporabila Wong in Xagorarakis (2010).

Tabela 7: Začetni oligonukleotidi uporabljeni pri dokazovanju BAdV

Table 7: Initial oligonucleotides used for proving the BAdV

Ime oligonukleotidnega začetnika oz. sonde	Zaporedje nukleotidov 5' - 3'	Dolžina zaporedja
BAdV4-8F	CRA GGG AAT AYY TGT CTG AAA ATC	24
BAdV4-8R	AAG GAT CTC TAA ATT TYT CTC CAA GA	26
BAdV4-8-sonda	FAM-TTC ATC WCT GCC ACW CAA AGC TTT TTT-BHQ-1	27

Za dokazovanje nukleinske kisline BAdV (4–8) smo uporabili komercialne reagente QuantiTect Virus Kit (Qiagen, Nemčija). Interne pozitivne kontrole (IPC) v to izvajanje nismo vključili, ker smo morebitno prisotnost inhibitorjev na istih vzorcih ugotavljali že pri predhodno izvedenih dokazovanjih respiratornih patogenov z molekularno diagnostiko. Na protokolnem listu smo pripravili načrt razporeditve preiskovanih vzorcev in vnos reagentov na optično ploščico. V posamezno jamico optične ploščice smo odpipetirali po 8,5 µl ddH₂O, 3 µl reakcijske mešanice (5xPCR Master Mix), 0,5 µl oligonukleotidnega začetnika BAdV4-8F (koncentracije 20 pmol/µl), 0,5 µl oligonukleotidnega začetnika BAdV4-8R (koncentracije 20 pmol/µl), 0,5 µl sonde BAdV4-8F (koncentracije 10 pmol/µl) in dodali 2,5 µl izolirane nukleinske kisline posameznega vzorca. V vsako izvedbo testa smo vključili tudi po en vzorec pozitivne kontrole.

Pomnoževanje nukleinskih kislin je na aparaturi Mx3005P potekalo:

- denaturacija 15 min pri 95 °C,
- 45 ciklov: denaturacija 10 s pri 95 °C, prileganje začetnih oligonukleotidov in sonde 30 s pri 54 °C in pomnoževanje 1 min pri 60 °C.

Po koncu pomnoževanja smo določili avtomatsko bazno linijo in Ct vrednosti za posamezni vzorec odčitati za sondo FAM. Vzorce smo ovrednotili kot pozitivne ali negativne na virus BAdV (4-8) (Tabela 8).

Tabela 8: Vrednotenje rezultatov na podlagi Ct vrednosti za BAdV

Table 8: Valuation of results based on Ct-values for BAdV

Rezultat	Sonda BAdV (4–8) (FAM)
Pozitiven BAdV (4–8)	ct < 45
Negativen BAdV (4–8)	ct > 45

3.5.2 Virološke preiskave pri govedih iz skupine Ž

3.5.2.1 Odvzem nosnih brisov pri govedih iz skupine Ž

Pri vseh 137 govedih iz skupine Ž smo iz nosnega brisa opravili virološko diagnostiko povzročiteljev BRDC. Nosne brise smo odvzeli klinično bolnim govedom, ki so kazala znamenja BRDC. Pri odvzemu brisa smo vatenko uvedli čim globlje v nosno votlino in postrgali po sluznici, pri tem pa pazili, da se držalo vatenke ne zlomi. Nosne brise smo odvzeli s komercialno dostopnimi vatenkami Virocult® (MW 951S, UK) proizvajalca Sigma. Te so sestavljene iz držala, na katerem je navitje iz najlonskega materiala, ter epruvete s transportnim medijem. Po odvzemu smo brise dostavili v laboratorij najkasneje v 24 urah, pri tem pa jih hranili pri temperaturi od +2 do +8 °C. V laboratoriju smo jih do obdelave hranili zamrznjene pri temperaturi < -60 °C.

3.5.2.2. Izolacija virusov na celični kulturi pri govedih iz skupine Ž (IVCK Ž)

IVCK smo opravili iz nosnih brisov 137 govedi iz skupine Ž. V epruveto z vatenko Virocult®, na kateri je bil bris nosne sluznice, smo dodali 5 ml gojišča RPMI 1640 (ThermoFisher Scientific, Gibco, BRL, Velika Britanija). Epruveto z vatenko smo nato vorteksirali in vatenko dobro oželi. Nato smo epruveto centrifugirali v hlajeni centrifugi pri 1000 ×g v centrifugi Rotanta 46 RS (Hettich, Nemčija). Med tem smo pripravili vijalki, eno za qPCR oz. RT-qPCR in drugo za IVCK, ter ju označili z nalepkami. Za potrebe IVCK smo vzorec še filtrirali skozi filter Minisart™ za enkratno uporabo z 0,45 µm velikimi porami, da smo odstranili bakterije. Po končanem postopku smo iz epruvete odpipetirali približno 1000 µl gojišča v vsako od obeh vijalk. Ostanek gojišča smo skupaj z epruveto zavrgli.

Celice TB za izolacijo virusa smo množili v gojišču DMEM (Thermo Fisher Scientific, Gibco BRL, Velika Britanija), ki smo mu dodali 10 % fetalnega seruma (Thermo Fisher Scientific, Gibco BRL, Velika Britanija) in antibiotik-antimikotik (Thermo Fisher Scientific, Gibco BRL, Velika Britanija). Izolacijo smo opravili po postopku, opisanem v poglavju 3.6.1.1.

3.5.2.3. Izolacija RNA in DNA iz nosnih brisov govedi iz skupine Ž

Za izolacijo RNA in DNA iz nosnih brisov govedi iz skupine Ž smo uporabili enake metode kot za izolacijo RNA in DNA iz vzorcev pljuč govedi iz skupine P.

3.5.2.4 Dokazovanje 7 respiratornih patogenov s komercialnim kompletom LSI VetMAX™ Screening Pack Ruminants Respiratory Pathogens iz nosnih brisov govedi iz skupine Ž

Vzorci 137 nosnih brisov smo testirali s komercialnim kompletom LSI VetMAX™ Screening Pack Ruminants Respiratory Pathogens (TaqMan® real-time PCR kit for detection of seven major ruminant pathogens, LSI, Francija) na povsem enak način kot vzorce pri govedih iz skupine P.

3.5.2.5 Dokazovanje nukleinske kisline BVDV s komercialnim kompletom PrioCHECK® BVDV RT-PCR iz nosnih brisov govedi iz skupine Ž

Za dokazovanje nukleinske kisline BVDV v preiskovanih vzorcih smo uporabili komercialni kit PrioCHECK® BVDV RT-PCR (Prionics, Švica). Postopek je povsem enak tistemu, ki smo ga opisali pri govedih iz skupine P.

3.5.2.6 Dokazovanje nukleinske kisline BoHV-1 s komercialnim kompletom LSI VetMAX™ IBR gB iz nosnih brisov govedi iz skupine Ž

Za dokazovanje nukleinske kisline BoHV-1 v preiskovanih vzorcih smo uporabili LSI VetMAX™ IBR gB (Life Technologies, ZDA). Postopek je povsem enak tistemu, ki smo ga opisali pri govedih iz skupine P.

3.5.2.7 Dokazovanje nukleinske kisline BAdV s protokolom za dokaz serotipov BAdV 4, 5, 6, 7, 8 (4–8) v nosnih brisih govedi iz skupine Ž

Za dokazovanje nukleinske kisline BAdV (4–8) v nosnih brisih smo uporabili povsem enak postopek kot pri govedih iz skupine P.

3.5.2.8 Serološke preiskave krvnih vzorcev govedi iz skupine Ž

Pri 88 govedih iz skupine Ž smo opravili serološke preiskave na 7 povzročiteljev BRDC. Vzorce krvi, pri katerih se je serum že izločil, smo 10 minut centrifugirali pri 1000 ×g v centrifugi Rotanta 46 RS (Hettich, Nemčija), nato smo serume prelili v manjše epruvete po 1 ml in jih do izvedbe testa hranili pri –20 °C.

3.5.2.9 Multiscreen test ELISA (Bio-X)

Protitelesa proti virusu BRSV, BPI3, BAdV 3 ter bakterijam *M. haemolytica* in *M. bovis* smo ugotavljali v testu ELISA (Multiscreen™ AbELISA bovine Respiratory; BIO K 369; Bio-X Diagnostic, Belgija). Pri izvedbi testov smo upoštevali navodila proizvajalcev testov. Mikroplošče smo spirali z ustreznim pufrom, priloženim kompletu. Vrednosti optične gostote smo izmerili s spektrofotometrom (Sunrise™ absorbance microplate reader Tecan). Vse reagentne in plošče ELISA smo do uporabe hranili v hladilniku na +2 do +8 °C.

V posamezne kolone jamic mikroplošče kompleta Multiscreen™ AbELISA bovine Respiratory (Bio-X, Danska) so vezani antigeni posameznih patogenov v zaporedju BRSV, BPI3, *M. bovis*, *M. haemolytica*, BAdV 3. Preiskovane vzorce ter pozitivne in negativne kontrolne serume smo v pufru za redčenje razredčili v razmerju 1 : 100. Po predhodno pripravljenem protokolu smo v posamezne jamice pipetirali po 100 µl predhodno redčenih vzorcev pozitivnega in negativnega seruma in mikroploščo inkubirali 1 uro pri 21 °C (+/-3 °C). Po 3-kratnem spiranju mikroplošče s pufrom za spiranje smo v vsako jamico vnesli po 100 µl delovne razredčine konjugata (protitelesa proti govejim imunoglobulinom, označena s hrenovo peroksidazo). Mikroploščo smo ponovno inkubirali 1 uro pri 21 °C (+/-3 °C). Po končani inkubaciji smo mikroploščo ponovno 3-krat sprali s izpiralnim pufrom in nato v vsako jamico vnesli po 100 µl delovne razredčine substrata (tetramethylbenzidine). Po 10-minutni inkubaciji na sobni temperaturi smo reakcijo zaustavili z dodatkom 50 µl raztopine za zaustavljanje (1molarna fosforna kislina). Optično gostoto smo odčitali s spektrofotometrom Sunrise Tecan (Švica) pri valovni dolžini 450 nm. Test smo upoštevali kot veljaven, če je optična vrednost (OD) kontrolnega pozitivnega seruma presegla zahtevano OD vrednost za posamezni patogen. Prisotnost ali odsotnost protiteles proti posameznemu patogenu smo določili na podlagi izračuna razmerja med OD vrednostjo vzorca in OD vrednostjo pozitivnega seruma. Količnik smo pomnožili z vrednostjo 100. Na podlagi tabele, ki jo prilaga proizvajalec diagnostičnega kompleta, smo lahko za vsak vzorec na vseh pet patogenov hkrati določili končni rezultat. Rezultat smo kvalitativno opredelili kot pozitiven ali negativen.

3.5.2.10 Test ELISA za dokaz protiteles proti virusu BoHV-1

Za dokazovanje protiteles proti virusu BoHV-1 smo uporabili komercialno ELISA Svanovir® IBR-Ab (Boehringer Ingelheim, Švedska). V neparnih kolonah so v jamicah vezani celokupni antigeni virusa BoHV-1, v parnih kolonah pa so v jamiceah vezani t. i. negativni antigeni (antigeni celične linije, na kateri je bil gojen virus) tako, da se vsak vzorec na mikroploščo nanaša v dvojniku. V skladu z navodili proizvajalca smo vse reagente kompleta ELISA najprej ogreli na sobno temperaturo ter izpolnili protokol razporeditve vzorcev na mikroplošči. Pripravili smo delovno razredčino (1 : 20) raztopine za spiranje mikroplošč (fosfatni pufer z dodatkom Tween). V vse jamice mikroplošče smo vnesli po 90 µl pufru za spiranje mikroplošč. V parno in neparno jamico mikroplošče smo glede na predhodni razpored vnesli po 10 µl preiskovanega vzorca ter pozitivnega in negativnega kontrolnega seruma. Mikroplošče smo inkubirali 1 uro na 37 °C +/- 1 °C. Po inkubaciji smo plošče temeljito 3-krat sprali z izpiralnim pufrom, jih osušili s papirnato brisačo in v vsako jamico vnesli po 100 µl HRP konjugata. Po enourni inkubaciji na 37 °C +/- 1 °C smo mikroplošče ponovno sprali in jih osušili. V vse jamice smo nato vnesli po 100 µl substrata. Reakcijo smo zaustavili po 10-minutni inkubaciji na sobni temperaturi z dodatkom raztopine za zaustavljanje reakcije (1M fosforna kislina). Adsorbenco smo izmerili s čitalcem Sunrise, Tecan. Optične vrednosti v jamici z vzorcem smo korigirali tako, da smo OD vrednosti, izmerjene v jamici s pozitivnim antigenom, odšteli od vrednosti jamice z negativnim antigenom. Končne vrednosti, izražene v odstotkih za posamezni vzorec, smo dobili po formuli: (OD vzorca korigirana x 100/OD pozitivne kontrole, korigirana). Glede na navodila proizvajalca je bil test veljaven, če je bila korigirana OD vrednost pozitivne kontrole večja od 0,5, OD vrednost negativne kontrole pa je enaka ali manjša od 7 %. Posamezni vzorec smo proglasili za pozitivnega, ko je bila izračunana vrednost enaka ali večja od 10 %, za negativnega pa, ko je bila ta vrednost manjša od 10 %.

3.5.2.11 Test ELISA za dokaz protiteles proti virusu BVDV

Za dokazovanje protiteles proti BVDV smo uporabili komercialno ELISA Svanovir® BVDV-Ab proizvajalca Boehringer Ingelheim, Švedska. Gre za indirektni ELISA. Neparne kolone jamic so pokrite s celokupnimi antigeni BVDV, parne pa s t. i. negativnim antigenom, tako da se vsak vzorec na mikroploščo nanaša v dvojniku. Pred pričetkom dela smo najprej vse reagente ELISA kompleta segreli na sobno temperaturo ter izpolnili protokol razporeditve vzorcev na mikroplošči. Skladno z navodili proizvajalca smo pripravili delovno razredčino (1 : 20) raztopine za spiranje mikroplošč (fosfatni pufer z dodatkom Tween). V vse jamice mikroplošče smo vnesli po 90 µl pufru za redčenje vzorcev (sample diluent buffer). V parno in neparno jamico mikroplošče smo glede na predhodni razpored vnesli po 10 µl preiskovanega vzorca, pozitivnega in negativnega kontrolnega seruma. Mikroplošče smo inkubirali 1 uro na 37 °C +/- 1 °C. Po inkubaciji smo plošče temeljito trikrat sprali z izpiralnim pufrom, jih osušili s papirnato brisačo in v vsako jamico vnesli po 100 µl HRP konjugata. Po enourni inkubaciji na 37 °C +/-

1 °C smo mikroplošče ponovno sprali in jih osušili. V vse jamice smo nato vnesli po 100 µl substrata. Reakcijo smo zaustavili po 10-minutni inkubaciji na sobni temperaturi z dodatkom raztopine za zaustavljanje reakcije (1molarna fosforna kislina). Adsorbanco smo izmerili s čitalcem Sunrise, Tecan. Optične vrednosti v jamici z vzorcem smo korigirali tako, da smo vrednosti, dobljene v jamici s pozitivnim antigenom, odšteli od vrednosti jamice z negativnim antigenom. Končne vrednosti, izražene v odstotkih za posamezni vzorec, smo dobili s formulo: OD vzorca, korigirana $\times 100 / \text{OD pozitivne kontrole, korigirana}$. Glede na navodila proizvajalca je bil test veljaven, če je bila korigirana OD vrednost pozitivne kontrole večja od 0,5, vrednost negativne kontrole pa enaka ali manjša od 5 %. Posamezni vzorec smo proglasili za pozitivnega, ko je bila izračunana vrednost enaka ali večja od 10 %, za negativnega pa, ko je bila ta vrednost manjša od 10 %.

3.6 STATISTIČNA ANALIZA

Izračune prevalence posameznih bakterijskih in virusnih povzročiteljev bolezni dihal pri govedu smo pripravili z opisnimi statističnimi metodami v programu Microsoft Excel (2010). Za nadaljnje statistične analize smo uporabili program R 3.4.2 (R Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <http://www.R-project.org/>). Pri tem smo upoštevali rezultate preiskav 89 govedi iz skupine P, starih od 1 do 24 mesecev, pri katerih smo opravili vse preiskave. Povezavo med prevalenco posameznih vrst pljučnic in njihovimi povzročitelji smo ugotavljali s testom hi-kvadrat za neodvisnost in Fisherjevim eksaktnim testom. Ta dva testa smo uporabili tudi za ugotavljanje povezanosti med prevalenco posameznih vrst pljučnic oziroma povzročiteljev in med vsemi tremi tipi reje. Poleg tega smo s testom deležev za dva vzorca testirali razlike med mlečnimi in pitovnimi rejami. Pri vseh testih je bilo za statistično značilnost uporabljeno merilo p-vrednost nižja od 0,05.

Ujemanje med IHC rezultati in RT-qPCR, qPCR pri diagnostiki povzročiteljev bolezni dihal pri govedu smo ugotavljali s koeficientom kappa po Cohenu. To smo izvedli samo pri tistih govedih iz skupine P, pri katerih smo opravili obe navedeni diagnostični metodi (*M. bovis* 108 govedi, BRSV 101 govedo, BPI3 98 govedi, BoHV-1 102 govedi, BAdV 96 govedi in BVDV 100 govedi).

Interpretacija vrednosti koeficienta kappa je bila naslednja: $\leq 0,00$ – slabo ujemanje; 0,01–0,20 – rahlo ujemanje; 0,21–0,40 – zmerno ujemanje; 0,41–0,60 – dobro ujemanje; 0,61–0,80 – odlično ujemanje; 0,81–1 – skoraj popolno ujemanje.

4 REZULTATI

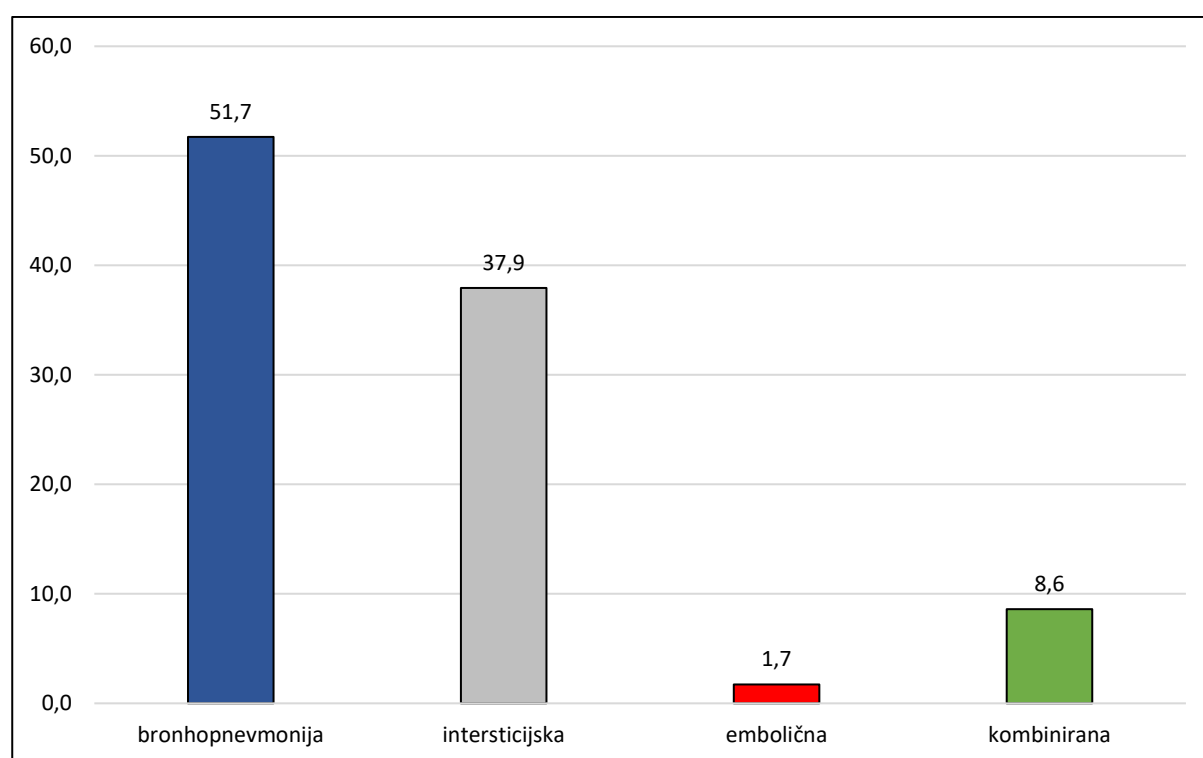
4.1 Rezultati pri poginulih govedih

4.1.1 Rezultati raztelesbe

4.1.1.1 Rezultati in klasifikacije pnevmoničnih sprememb pri govedih iz skupine P

Pri vseh 116 govedih iz skupine P smo patoanatomsko ugotovili pljučnice, ki so se med seboj razlikovale po morfologiji, po obsežnosti in njihovi lokaciji.

Pri 60 govedih (51,7 %) smo z raztelesbo ugotovili bronhopnevmonijo, pri 44 govedih (37,9 %) intersticijsko pljučnico, pri 2 govedih (1,7 %) embolično pljučnico in pri 10 govedih (8,6 %) kombinacijo bronhopnevmonije in intersticijske pljučnice. Delež posameznih vrst pljučnic, ugotovljenih z raztelesbo, je prikazan na sliki 13.

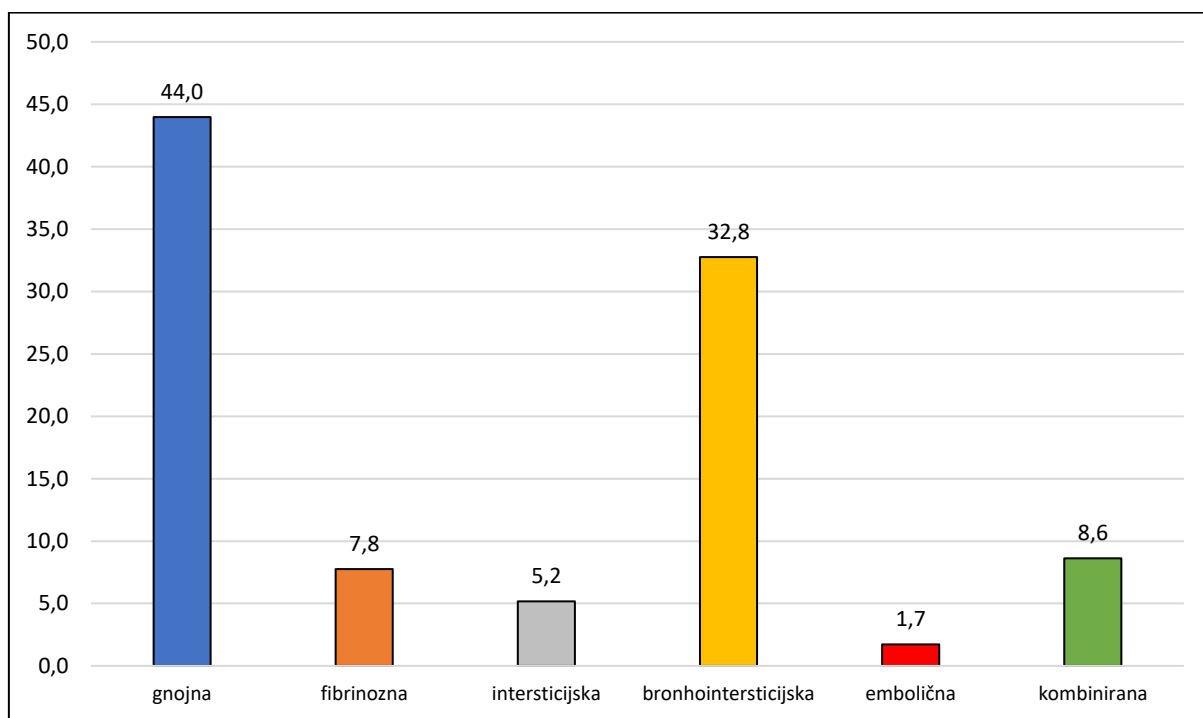


Slika 13: Delež posameznih vrst pljučnic, ugotovljenih z raztelesbo 116 govedi iz skupine P (v %)

Figure 13: The percentage of pneumonia types found with the autopsy of 116 cattle from the P-group

Dve vrsti pljučnic, bronhopnevmonijo in intersticijsko pljučnico, smo nato razdelili: bronhopnevmonijo na gnojno in fibrinozno, intersticijsko pa na bronhointersticijsko in intersticijsko. Na podlagi opisanih kriterijev smo tako pri 51 govedih (44,0 %) ugotovili gnojno

bronhopnevmonijo, pri 38 govedih (32,8 %) bronhointersticijsko pljučnico, pri 9 govedih (7,8 %) fibrinozno bronhopnevmonijo, pri 6 govedih (5,2 %) intersticijsko pljučnico in pri 2 govedih (1,7 %) embolično pljučnico. Pri 10 govedih smo ugotovili kombinacijo dveh pljučnic (8,6 %). Delež posameznih vrst pljučnic, ki smo jih ugotovili pri raztelesenih govedih skupine P, so prikazani na sliki 14.



Slika 14: Delež posamezne vrste pljučnice, ugotovljene z raztelesbo pri 116 govedih iz skupine P (v %)

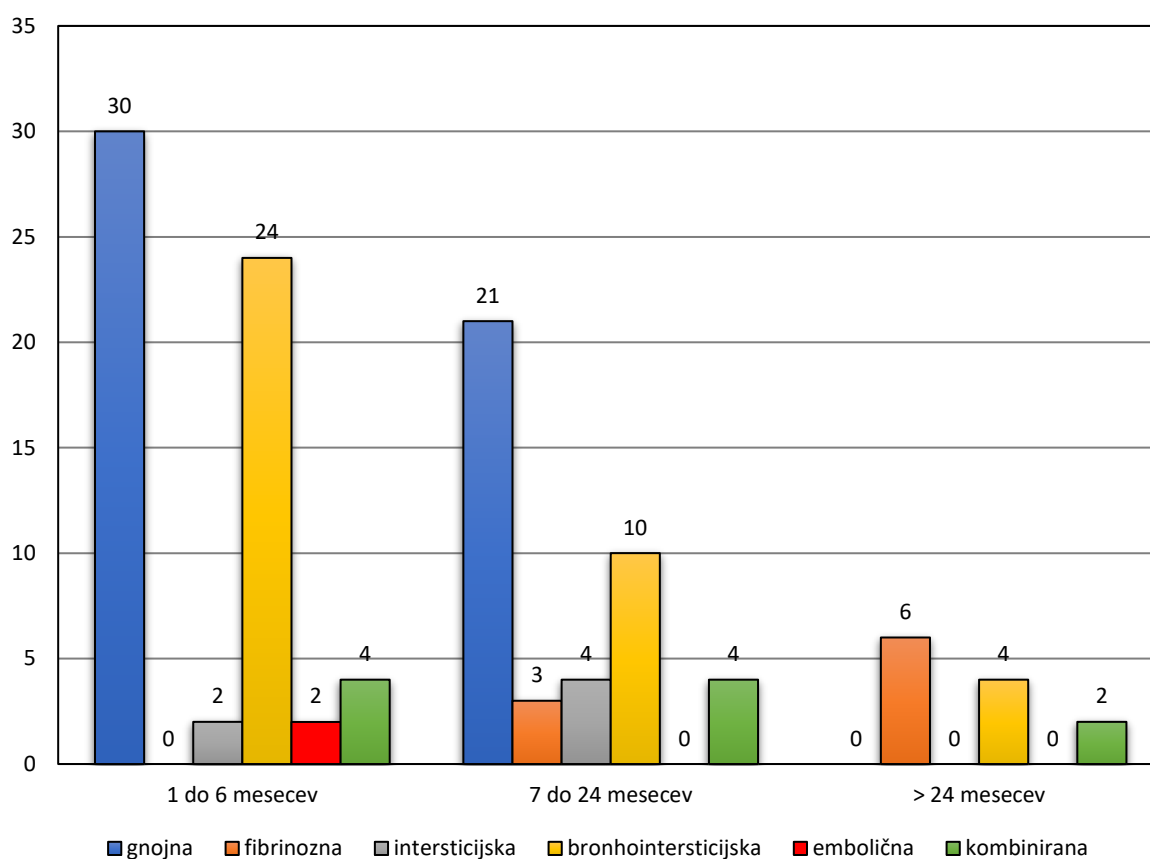
Figur 14: The percentage of individual pneumonia types found with the autopsy of 116 cattle from the P-group

Število ugotovljenih primerov posamezne vrste pljučnice se je znotraj posameznih starostnih razredov razlikovalo. V starostnem razredu I (od 1 do 6 mesecev) iz skupine P smo pri 30 govedih ugotovili gnojno bronhopnevmonijo (48,4 %), pri 24 govedih bronhointersticijsko pljučnico (38,7 %), pri dveh govedih intersticijsko pljučnico (3,2 %) in prav tako pri dveh govedih embolično pljučnico (3,2 %). V tem starostnem razredu nismo ugotovili nobenega primera fibrinozne bronhopnevmonije. Pri štirih govedih tega starostnega razreda smo ugotovili kombinacijo dveh vrst pljučnic (6,5 %).

V starostnem razredu II (od 7 do 24 mesecev) iz skupine P smo pri 21 govedih ugotovili gnojno bronhopnevmonijo (50,0 %), pri 10 govedih bronhointersticijsko pljučnico (23,8 %), pri štirih govedih intersticijsko pljučnico (9,5 %) in pri treh govedih fibrinozno bronhopnevmonijo (7,1 %). Kombinacijo dveh vrst pljučnic smo ugotovili pri 4 govedih iz tega starostnega razreda skupine P (9,5 %).

V starostnem razredu III (govedo, ki je starejše od 24 mesecev) iz skupine P smo pri 6 govedih ugotovili fibrinozno bronhopnevmonijo (50,0 %), pri štirih govedih bronhointersticijsko pljučnico (33,3 %) in pri dveh govedih kombinacijo dveh vrst pljučnic (16,7 %).

Število ugotovljenih primerov posamezne vrste pljučnice po posameznih starostnih razredih je prikazano na sliki 15.



Slika 15: Število posamezne vrste pljučnice, ugotovljene s patoanatomske preiskavo pri 116 govedih iz skupine P

Figure 15: The number of individual types of pneumonias, detected with the pathoanatomic examination of 116 cattle from the P-group

4.1.1.2 Rezultati ocene obsežnosti pnevmoničnih sprememb pri govedih iz skupine P

Rezultati ocene razporeditve in obsežnosti pnevmoničnih sprememb, ugotovljenih z raztelesbo, so za vsako vrsto pljučnice posebej prikazani na sliki 16.

gnojna				4	D CRAN cran	fibrinozna		4
	L CRAN cran	4		4	D CRAN caud		4	4
	L CRAN caud	4		4	M		4	4
	L CAUD cran	3		2	D CAUD cran		2	1
	L CAUD caud	0		0	D CAUD caud		0	0
intersticijska				3		bronhointersticijska		4
		3		3			4	4
		3		3			4	4
		1		1			3	3
		0		0			2	2
embolična				1		kombinirane		4
		1		1			4	4
		1		0,5			4	4
		0,5		0,5			3	3
		0,5		0,5			2	2

Slika 16: Shematični prikaz obsežnosti pnevmoničnih sprememb pri različnih vrstah pljučnic, ugotovljenih pri 116 govedih iz skupine P, določen na podlagi mediane

Figure 16: The diagram showing the extent of pneumonic changes at different types of pneumonias, detected in 116 cattle from the P-group (determined according to the median)

Legenda: 0 = brez pljučnice; 1 = od 1 do 25 % posameznega dela pljučnega režnja, zajetega s pljučnico; 2 = od 25 do 50 % posameznega dela pljučnega režnja, zajetega s pljučnico; 3 = od 51 do 75 % posameznega dela pljučnega režnja, zajetega s pljučnico; 4 = 76 do 100 % posameznega dela pljučnega režnja, zajetega s pljučnico; L = leva stran, D = desna stran; x = ni režnja; L CRAN cran – prednji del levega kranialnega pljučnega režnja, L CRAN caud – zadnji del levega kranialnega pljučnega režnja, L CAUD cran – prednji del levega kavdalnega pljučnega režnja, L CAUD caud – zadnji del levega kavdalnega pljučnega režnja, D CRAN cran – prednji del desnega kranialnega pljučnega režnja, D CRAN caud – zadnji del desnega kranialnega pljučnega režnja, M – medialni pljučni režen, D CAUD cr – prednji del desnega kavdalnega pljučnega režnja, D CAUD caud – zadnji del desnega kavdalnega pljučnega režnja.

4.1.1.3 Rezultati ocene starosti pnevmoničnih sprememb pri govedih iz skupine P

Na podlagi makroskopskega pregleda ugotovljenih patoloških sprememb pri govedih iz skupine P smo ocenili, da so bile pri 71 govedih (61,2 %) spremembe na pljučih akutne, pri 45 govedih (38,8 %) pa kronične.

4.1.2 Rezultati raztelesbe govedi iz skupine Pk

Z raztelesbo pri nobeni od 16 govedi iz skupine Pk nismo ugotovili pljučnice. Goveda iz skupine Pk so poginila zaradi drugih vzrokov, ki so naštet v tabeli 9.

Tabela 9: Vzrok pogina pri govedih iz skupine Pk

Table 9: The cause of death of the cattle from the Pk-group

Vzrok pogina pri govedih iz skupine Pk	Število	Delež (v %)
spremembe v položaju prebavil	3	18,8
timpanija in/ali dilatacija predželodcev	3	18,8
degeneracija miokarda	2	12,5
kaheksija	2	12,5
klostridijska enterotoksemija	2	12,5
distokija	1	6,3
sum zastrupitve	1	6,3
travma	1	6,3
vnetje potrebušnice	1	6,3
Skupaj	16	100

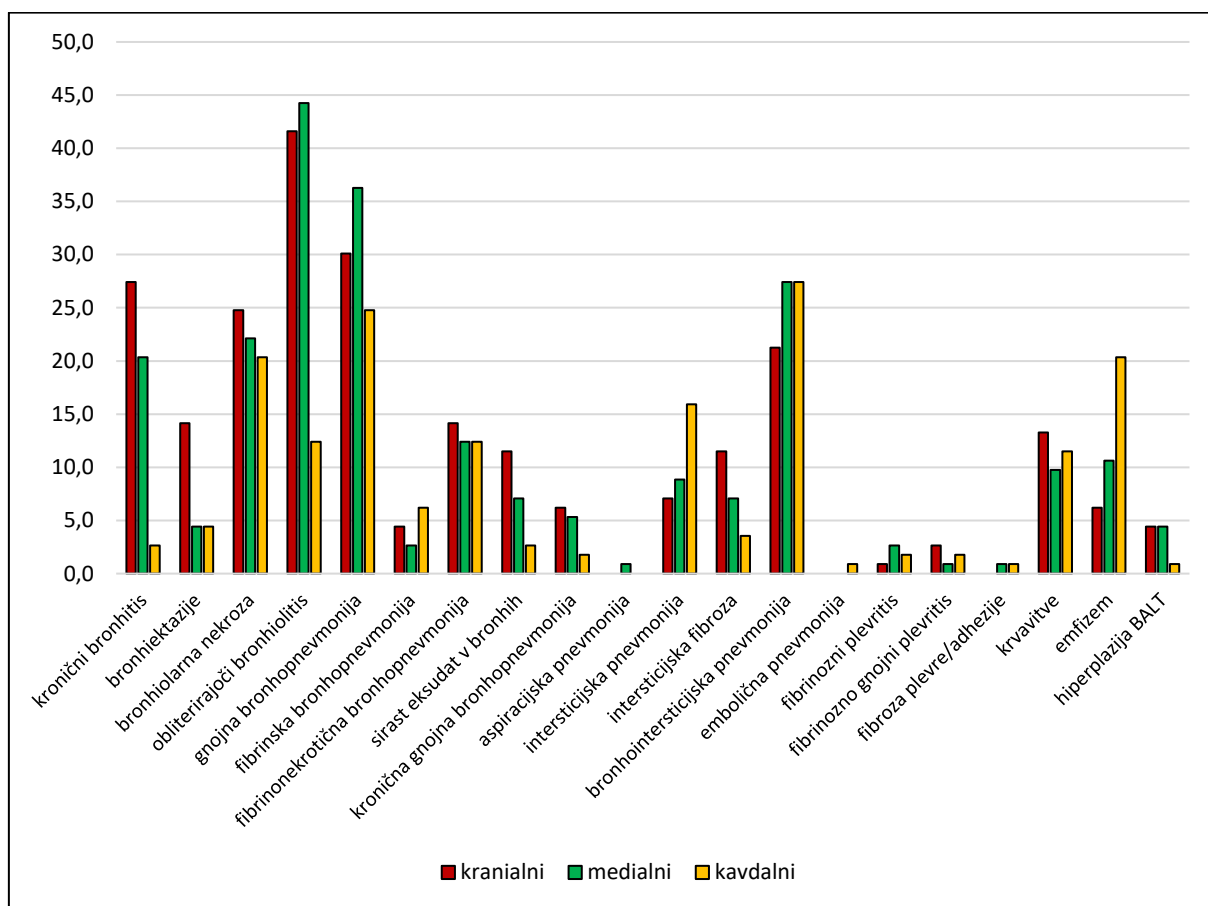
Za skupino Pk smo izbrali goveda, ki so poginila zaradi spremembe v položaju črevesja (18,8 %), zaradi timpanije in dilatacije predželodcev (18,8 %), nutritivne degeneracije miokarda (12,5 %), kaheksije (12,5 %) in klostridijske enterotoksemije (12,5 %).

4.2 REZULTATI PATOHISTOLOŠKE PREISKAVE

4.2.1 Rezultati ocene patohistoloških sprememb v pljučih govedi iz skupine P

Od 116 raztelešenih govedi smo pri 113 govedih iz skupine P opravili patohistološko preiskavo pljuč. Vzorci pljuč treh govedi iz skupine P niso bili vključeni v patohistološko preiskavo, ker so bili neustrezno fiksirani in avtolitični.

Pri vseh 113 patohistološko pregledanih pljučih goved iz skupine P smo pregledali po en vzorec kranialnega, medialnega in kavalnega pljučnega režnja (skupno 339 vzorcev). Rezultati patohistološke preiskave pljuč govedi iz skupine P so prikazani na sliki 17.



Slika 17: Relativni deleži patohistoloških sprememb, ugotovljenih v posameznih pljučnih režnjih s patohistološko preiskavo pri 113 govedih iz skupine P (v %)

Figure 17: Relative shares of pathohistologic changes detected in individual lung lobes with pathohistological examination of 113 cattle from the P-group (in %)

V vzorcih kranialnega pljučnega režnja smo najpogosteje ugotovili obliterirajoči bronhiolitis (41,6 %), gnojno bronhopnevmonijo (30,1 %), kronični bronhitis (27,4 %), bronhiolarno nekrozo (24,8 %) in bronhointersticijsko pljučnico (21,2 %).

V vzorcih medialnega pljučnega režnja smo najpogosteje ugotovili obliterirajoči bronhiolitis (44,2 %), gnojno bronhopnevmonijo (36,3 %), bronhointersticijsko pljučnico (27,4 %) in bronhiolarno nekrozo (22,1 %).

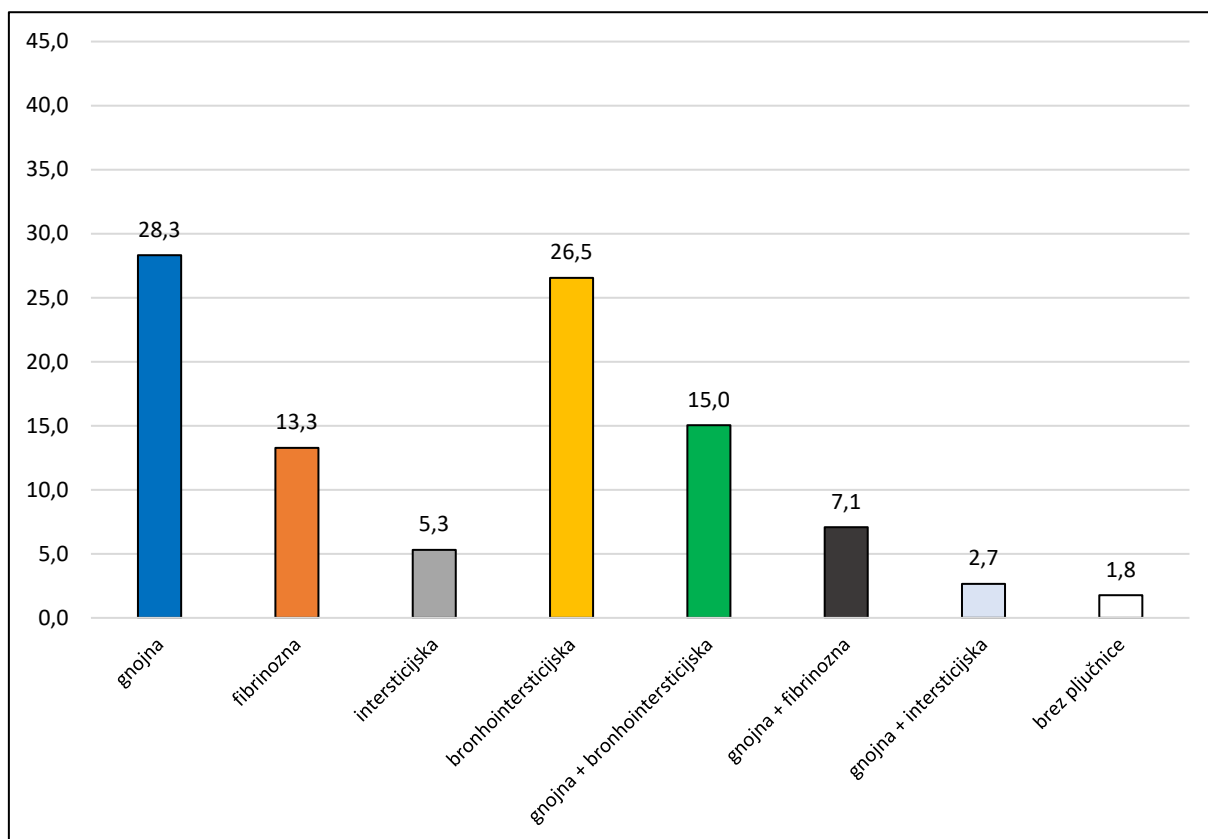
V vzorcih kaudalnih pljučnega režnja smo najpogosteje ugotovili bronhointersticijsko pljučnico (27,4 %), gnojno bronhopnevmonijo (24,8 %), emfizem (20,4 %) in bronhiolarno nekrozo (20,4 %).

Razlike v prisotnosti obliterirajočega bronhiolitisa med posameznimi pljučnimi režnji so statistično značilne ($p = 0,0109$). Razlike v prisotnosti gnojne bronhopnevmonije med posameznimi pljučnimi režnji niso statistično značilne ($p = 0,1701$). Razlike v prisotnosti kroničnega bronhitisa med posameznimi pljučnimi režnji so statistično značilne ($p = 0,0000019$). Razlike v prisotnosti bronhiolarne nekroze med posameznimi pljučnimi režnji niso statistično značilne ($p = 0,7245$). Razlike v prisotnosti bronhointersticijske pljučnice med posameznimi pljučnimi režnji niso statistično značilne ($p = 0,4660$). Razlike v prisotnosti emfizema med posameznimi pljučnimi režnji so bile statistično značilne ($p = 0,0042$).

4.2.2 Končna presoja pnevmoničnih sprememb na pljučih govedi iz skupine P

Končno presojo patomorfoloških sprememb in določitev vrste pljučnice pri posameznem govedu iz skupine P smo opravili na podlagi rezultatov patohistološke preiskave. Od 113 pregledanih govedih smo pri 32 govedih (28,3 %) kot prevladujočo patomorfološko spremembo ugotovili gnojno bronhopnevmonijo, pri 15 govedih (13,3 %) fibrinozno bronhopnevmonijo, pri 6 govedih (5,3 %) intersticijsko pljučnico, pri 30 govedih (26,5 %) bronhointersticijsko pljučnico, pri 17 govedih (15,0 %) gnojno in bronhointersticijsko pljučnico, pri 8 govedih (7,1 %) gnojno in fibrinozno bronhopnevmonijo ter pri treh govedih (2,7 %) gnojno in intersticijsko pljučnico. Pri dveh govedih (1,8 %), pri katerih smo z raztelesbo ugotovili intersticijsko in embolično pljučnico, s s patohistološko preiskavo pljučnice nismo potrdili.

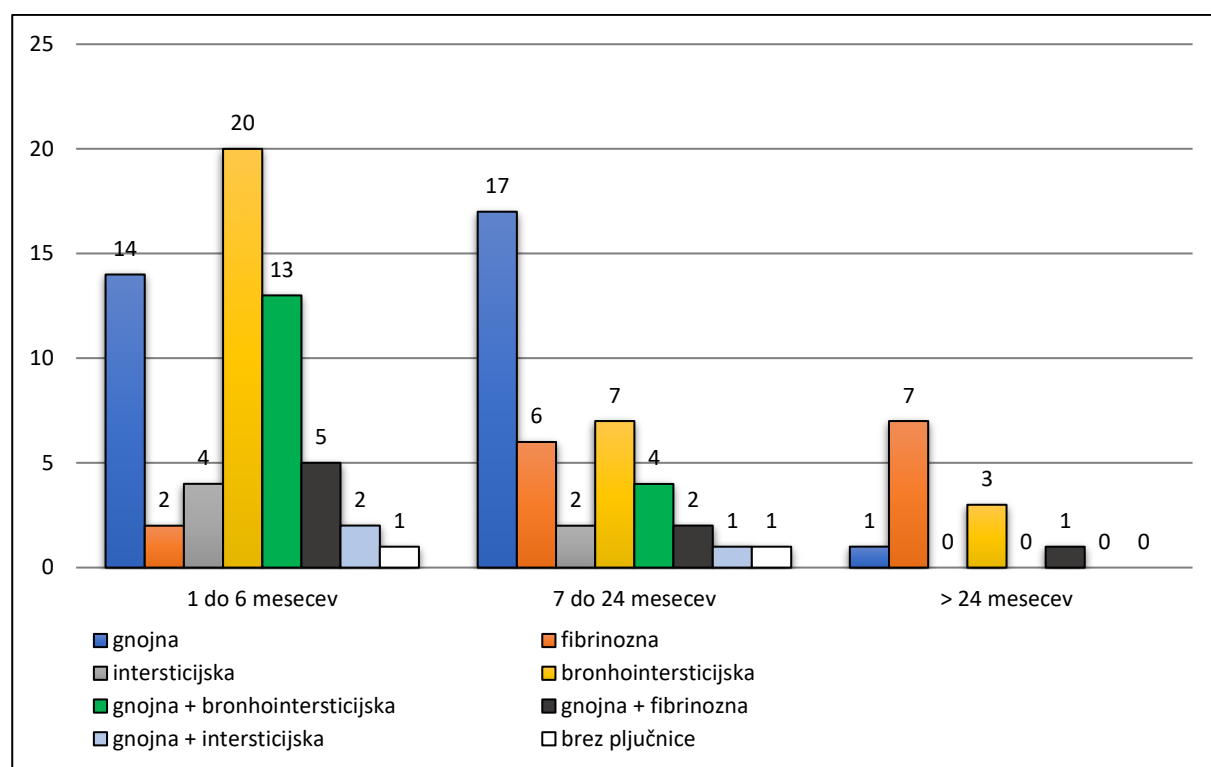
Deleže s patohistološko preiskavo ugotovljenih primerov pljučnic prikazuje slika 18.



Slika 18: Odstotek pljučnic, ugotovljenih s patohistološko preiskavo pri 113 govedih iz skupine P

Figure 18: The percentage of types of pneumonia detected with pathohistological examination of 113 cattle from the P-group

Število s patohistološko preiskavo ugotovljenih primerov pljučnic se je znotraj posameznih starostnih razredov razlikovalo, kar je prikazano na sliki 19.



Slika 19: Število primerov pljučnic, ugotovljenih z raztelesbo in s patohistološko preiskavo pri 113 govedih iz skupine P

Figure 19: The number of cases of pneumonia detected with the autopsy and pathohistological examination of 113 cattle from the P-group

V starostnem razredu I (od 1 do 6 mesecev) smo bronhointersticijsko pljučnico ugotovili pri 20 teletih (32,8 %), gnojno bronhopnevmonijo pri 14 teletih (23,0 %) in intersticijsko pljučnico pri 4 teletih (6,6 %). Kombinacijo gnojne bronhoplevmonije in bronhointersticijske pljučnice smo ugotovili pri 13 teletih (21,3 %), gnojne in fibrinozne bronhopnevmonije pri 5 teletih (8,2 %) ter gnojne in intersticijske pljučnice pri 2 teletih (3,3 %).

V starostnem razredu II (od 7 do 24 mesecev) smo gnojno bronhopnevmonijo ugotovili pri 17 mladih govedih (42,5 %), bronhointersticijsko pljučnico pri 7 mladih govedih (17,5 %), fibrinozno bronhopnevmonijo pri 6 mladih govedih (15,0 %) in intersticijsko pri 2 mladih govedih (5,0 %). Kombinacijo pljučnic smo ugotovili pri 7 mladih govedih (17,5 %).

V starostnem razredu govedi, starejših od 24 mesecev, smo pri 7 govedih ugotovili fibrinozno bronhopnevmonijo (58,3 %), bronhointersticijsko pljučnico pri treh govedih (25,0 %) in gnojno bronhopnevmonijo pri enem govedu (8,3 %). Kombinacijo gnojne in fibrinozne bronhopnevmonije smo ugotovili pri enem govedu (8,3 %).

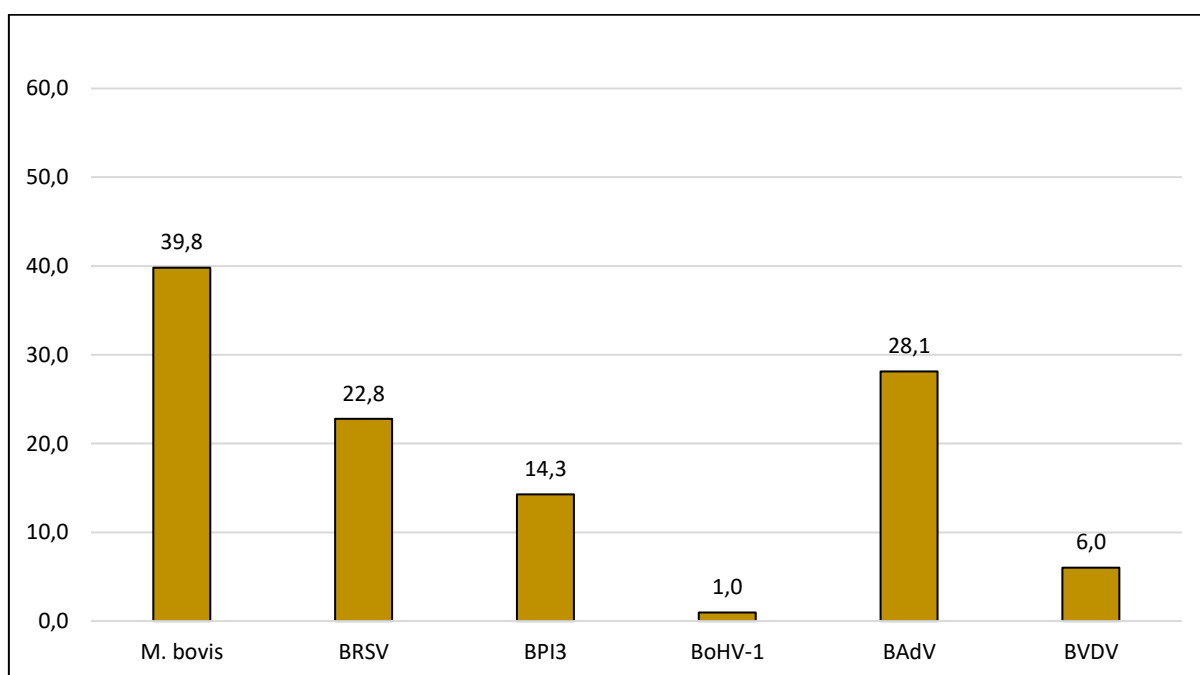
4.2.3 Rezultati ocene patohistoloških sprememb v pljučih govedi iz skupine Pk

Patohistološko preiskavo smo opravili tudi pri govedih iz skupine Pk. Pri nobenem izmed 16 govedi iz skupine Pk nismo ugotovili pljučnice.

4.3 REZULTATI IMUNOHISTOKEMIČNE PREISKAVE

4.3.1 Rezultati IHC preiskave pri govedih iz skupine P

IHC na *M. bovis* smo opravili na naključno izbranih vzorcih pljuč 108 govedi iz skupine P. Reakcija je bila pozitivna na antigen bakterije *M. bovis* pri 43 vzorcih testiranih pljuč (39,8 %). BRSV smo ugotovili v pljučih 23 od 101 testirane govedi (22,8 %). BPI 3 virus smo ugotovili pri 14 od 98 testiranih govedi (14,3 %), BoHV 1 pa pri enem od 102 testiranih govedi (1,0 %). BAdV smo ugotovili pri 27 od 96 testiranih govedi (28,1 %), BVDV pa pri 6 od 100 testiranih govedi (6,0 %). Rezultati IHC, opravljeni na vzorcih pljuč govedi iz skupine P, so prikazani na sliki 20 in v tabeli 10.



Slika 20: Delež pozitivnih rezultatov IHC preiskav na prisotnost posameznega respiratornega patogena v vzorcih pljuč govedi iz skupine P (v %)

Figure 20: The percentage of results from IHC examination, positive to the presence of individual respiratory pathogens in the lung samples from the P-group

Tabela 10: Rezultati IHC preiskave vzorcev pljuč govedi iz skupine P

Table 10: The results of the IHC examination of lung samples of cattle of the P-group

IHC P	<i>M. bovis</i>	BRSV	BPI3	BoHV-1	BAdV	BVDV
Štev. vzorcev	108	101	98	102	96	100
Štev. pozitivnih	43	23	14	1	27	6
Delež pozitivnih (v %)	39,8	22,8	14,3	1,0	28,1	6,0

4.3.2 Rezultati IHC preiskave pri govedih iz skupine Pk

IHC na *M. bovis* smo opravili na vzorcih pljuč 14 govedi iz skupine Pk in pri dveh vzorcih je bila reakcija pozitivna (14,3 %).

Vzorci 13 govedi smo testirali na BRSV, BoHV-1, BAdV in BVDV ter vzorce 14 govedi na BPI3. Vsi vzorci pljuč so bili negativni. Rezultati IHC za goveda iz skupine Pk so prikazani v tabeli 11.

Tabela 11: Rezultati IHC preiskave vzorcev pljuč govedi iz skupine Pk

Table 11: The results of IHC examination of lung samples of cattle from the P-group

IHC Pk	<i>M. bovis</i>	BRSV	BPI3	BoHV-1	BAdV	BVDV
Štev. vzorcev	14	13	14	13	13	13
Štev. pozitivnih	2	0	0	0	0	0
Delež pozitivnih (v %)	14,3	0	0	0	0	0

4.4 REZULTATI GOJIŠČNE BAKTERIOLOŠKE PREISKAVE

4.4.1 Rezultati gojiščne bakteriološke preiskave pri govedih iz skupine P

Od 113 poginulih govedi iz skupine P smo klasično gojiščno bakteriološko preiskavo pljuč opravili pri 107 govedih.

Bakterijo *P. multocida* smo izolirali iz vzorcev pljuč 27 bakteriološko pregledanih govedi iz skupine P (25,2 %).

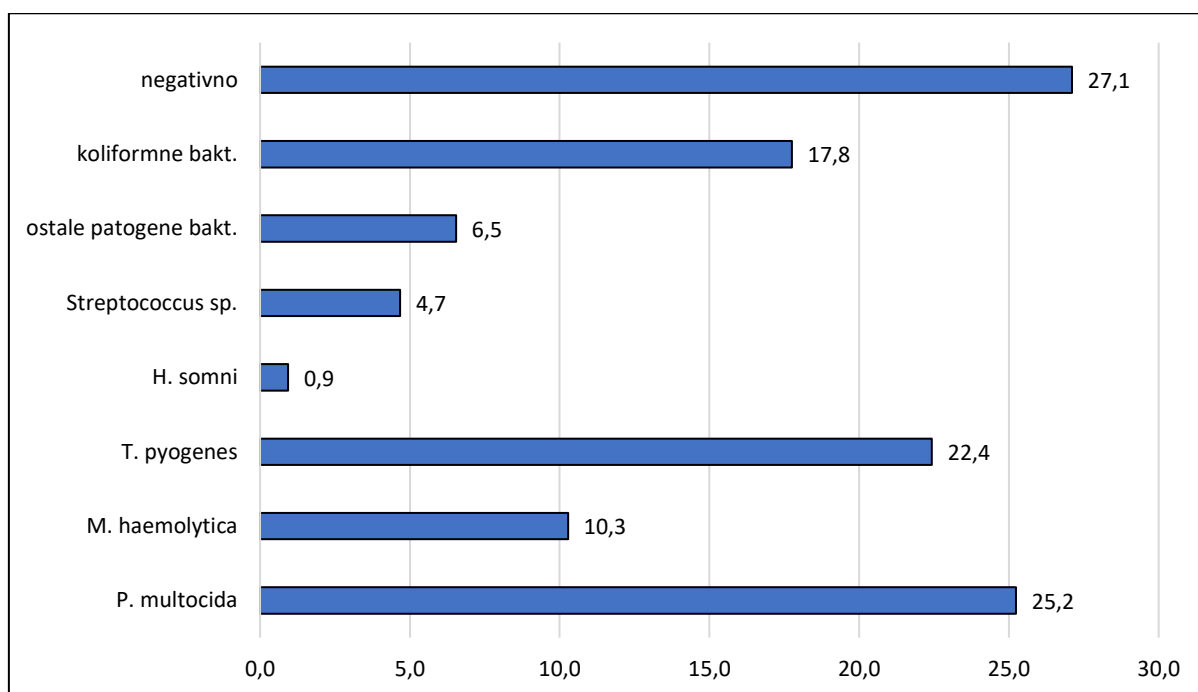
Bakterijo *M. haemolytica* smo izolirali iz vzorcev pljuč 11 bakteriološko pregledanih govedi iz skupine P (10,3 %).

Bakterijo *T. pyogenes* smo izolirali iz vzorcev pljuč 24 bakteriološko pregledanih govedi iz skupine P (22,4 %)

Bakterijo *H. somni* smo izolirali iz pljuč samo enega bakteriološko pregledanega goveda (0,9 %).

Koliformne bakterije smo izolirali iz pljuč 19 bakteriološko pregledanih govedi iz skupine P (17,8 %).

Negativen rezultat smo ugotovili pri 29 bakteriološko pregledanih govedi iz skupine P (27,1 %).



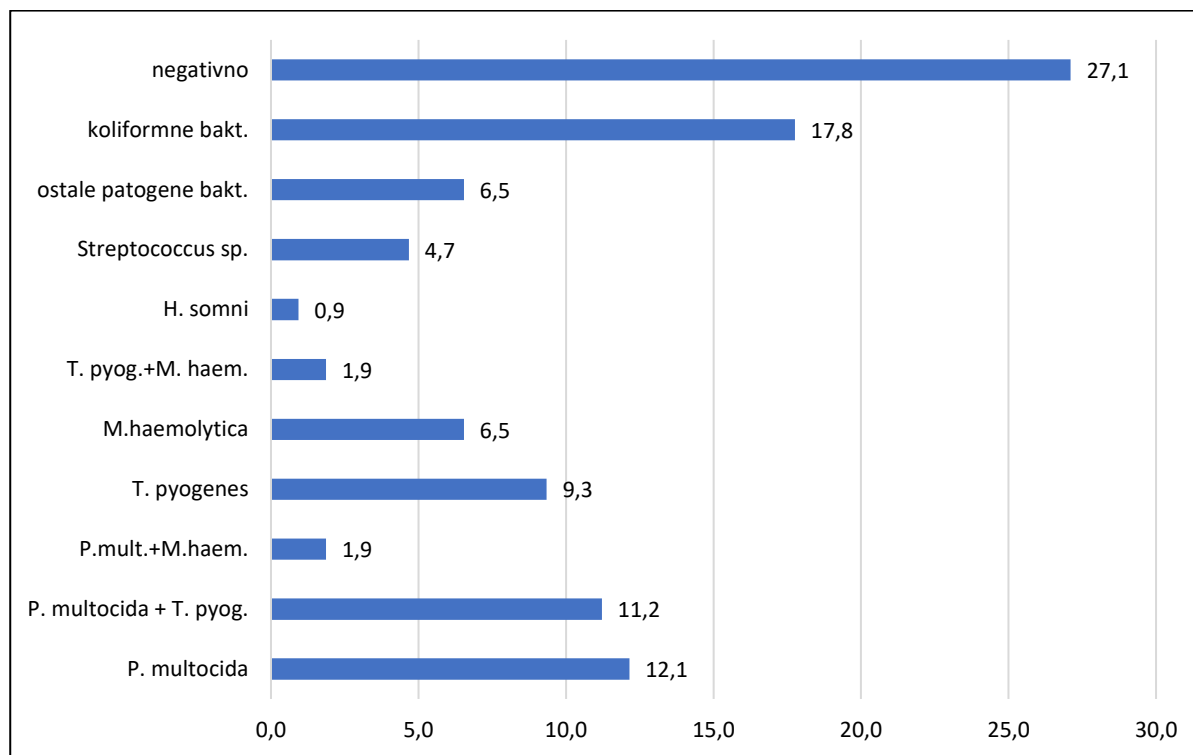
Slika 21: Delež bakterijskih izolatov posameznih vrst bakterij, ugotovljenih z gojiščno bakteriološko preiskavo v vzorcih pljuč 107 govedi iz skupine P (v %)

Figure 21: The percentage of bacterial isolates of individual bacterial species found with cultural bacteriological examination of lung samples of 107 cattle from the P-group

Bakterijo *P. multocida* smo iz pljuč 13 govedi (12,1 %) izolirali v čisti kulturi, pri 12 govedih (11,2 %) pa skupaj z bakterijo *T. pyogenes*.

Bakterijo *T. pyogenes* smo iz pljuč 10 govedi (9,3 %) izolirali v čisti kulturi, pri 12 govedih (11,2 %) pa skupaj z bakterijo *T. pyogenes*.

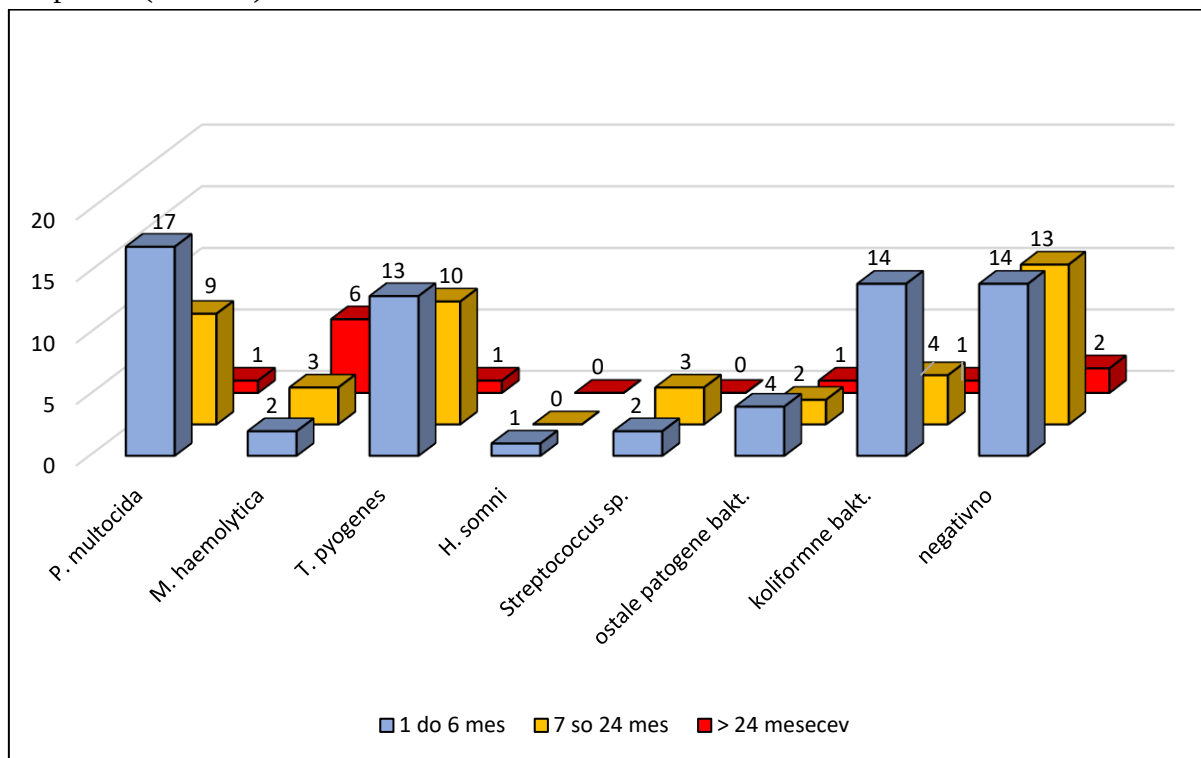
Deleži posameznih pogostejših kombinacij iz pljuč izoliranih bakterij so prikazani na sliki 22.



Slika 22: Delež bakterijskih izolatov, ugotovljenih s klasično bakteriološko preiskavo v vzorcih pljuč 107 govedi iz skupine P (v %)

Figure 22: The percentage of bacterial isolates found with classical bacteriological examination of lung samples of 107 cattle from the P-group

Rezultate bakteriološke preiskave pljuč smo prikazali tudi za starostne razrede govedi iz skupine P (slika 23).



Slika 23: Število ugotovitev posameznega respiratornega patogena, ugotovljenega s klasično bakteriološko preiskavo iz pljuč 107 govedi iz skupine P po posameznem starostnem razredu

Figure 23: The number of determinations of individual respiratory pathogens found with classical bacteriological examination of lungs of 107 cattle from the P-group by individual age groups

4.4.2 Rezultati bakteriološke preiskave pljuč pri govedih iz skupine Pk

Bakteriološko preiskavo pljuč smo opravili pri 14 govedih iz skupine Pk (tabela 12).

Tabela 12: Rezultati bakteriološke preiskave pljuč govedi iz skupine Pk

Table 12: The results of bacteriological examination of lungs of cattle from the Pk-group

Rezultat bakt. preiskave pljuč	Štev. izolatov	Delež (v %)
Negativno	4	28,6
<i>E. coli</i>	8	57,1
<i>Streptococcus bovis</i>	3	21,4
<i>P. multocida</i>	1	7,1
Skupaj	14	100

4.5 REZULTATI VIROLOŠKIH PREISKAV

4.5.1 Rezultati IVCK pri poginulih govedih

S klasično virološko metodo izolacije virusa na celični kulturi (IVCK) smo skupno testirali vzorce pljuč 115 govedi iz skupine P. Citopatski efekt (CPE) smo ugotovili pri 6 vzorcih (5,2 %). Prvi CPE smo opazili že 24 ur po inokulaciji vzorca na celično kulturo, večinoma pa med tretjim in petim dnem od začetka IVCK. CPE smo opazili pri vzorcih z oznakami P2, P3, P6, P7, P28 in P68.

Opazili smo več tipov CPE:

- celice so postajale okrogle, napihnjenega videza in so se odluščile od podlage,
- celice so se združevale, sloj celic pa se je točkasto luščil od podlage,
- celice so točkasto postajale drobne, pikčaste in se odluščile od podlage.

Če se CPE v 7-dnevni inkubaciji ni pojavil, smo mikroploščo zamrznili na -70°C , odpipetirali vsebino posameznih jamic z istim vzorcem in jih združili, centrifugirali in supernatant ponovno inokulirali na sloj sveže tripsiniziranih celic.

Z metodo direktne imunofluorescence smo v celični kulturi v dveh primerih (P2, P3) potrdili BoHV-1 in v štirih primerih virus BPI3 (P6, P7, P28, P68).

4.5.2 Rezultati IVCK pri govedih iz skupine Pk

Vsi vzorci pljuč govedi iz skupine Pk so bili v IVCK negativni.

4.5.3 Rezultati dokazovanja respiratornih patogenov z RT-qPCR in s qPCR

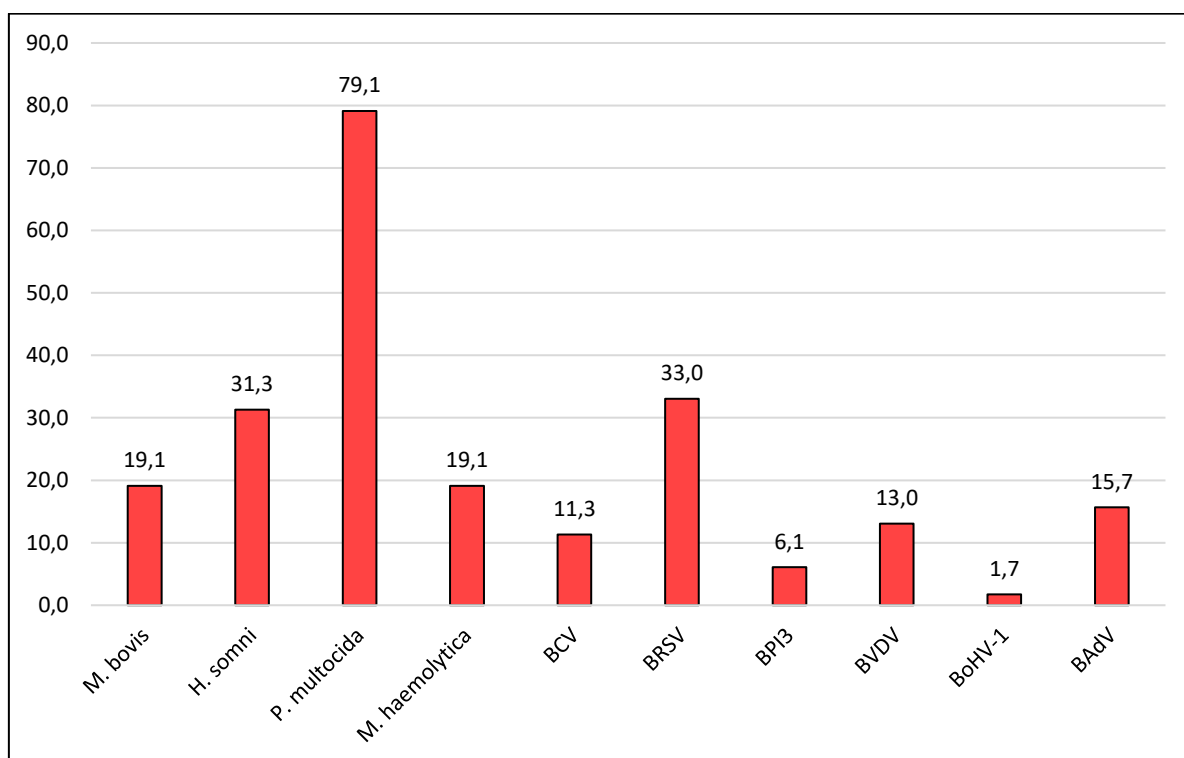
4.5.3.1 Rezultati dokazovanja respiratornih patogenov z RT-qPCR in s qPCR pri govedih iz skupine P

Z RT-qPCR in s qPCR smo dokazovali prisotnost 10 respiratornih patogenov v vzorcih pljuč 115 govedi iz skupine P. Najpogostejše ugotovljeni respiratorni patogen je bila bakterija *P. multocida*, katere nukleinsko kislino smo ugotovili v pljučih 91 govedi iz skupine P (79,1 %). Nukleinsko kislino BRSV smo ugotovili v vzorcih pljuč 38 govedi (33,0 %), nukleinsko kislino bakterije *H. somni* smo ugotovili v vzorcih pljuč 36 pregledanih govedi (31,3 %). V vzorcih pljuč 5 govedi (6,1 %) z RT-qPCR in s qPCR nismo ugotovili nobenega od desetih iskanih respiratornih patogenov. Rezultati dokazovanja respiratornih patogenov z RT-qPCR in s qPCR so prikazani v tabeli 13 in na sliki 24.

Tabela 13: Rezultati dokazovanja respiratornih patogenov v vzorcih pljuč 115 govedi iz skupine P z RT-qPCR in s qPCR

Table 13: The results of proving the respiratory pathogens in lung samples of 115 cattle from the P-group with the RT-qPCR and qPCR

Rezultati PCR	<i>M. bovis</i>	<i>H. somni</i>	<i>P. mult.</i>	<i>M. haem.</i>	BCV	BRSV	BPI3	BVDV	BoHV-1	BAdV
Štev. vzorcev	115	115	115	115	115	115	115	115	115	115
Štev. pozitivnih	22	36	91	22	13	38	7	15	2	18
Delež pozit. (v %)	19,1	31,3	79,1	19,1	11,3	33,0	6,1	13,0	1,7	15,7
Povp. vred. Ct pozit. vzorcev	24,67	29,57	29,21	28,94	33,80	29,69	34,69	30,79	27,03	36,10



Slika 24: Delež posameznega respiratornega patogena, ugotovljenega z RT-qPCR in s qPCR v vzorcih pljuč 115 govedi iz skupine P (v %)

Figure 24: The percentage of individual respiratory pathogens found with the RT-qPCR and qPCR in lung samples of 115 cattle from the P-group

Legenda: *M. bovis* = *Mycoplasma bovis*, *H. somni* = *Histophilus somni*, *P. multocida* = *Pasteurella multocida*, *M. haemolytica* = *Mannheimia haemolytica*, BCV = *Betacoronavirus 1*, BRSV = *Bovini ortopneumovirus*, BPI3 = *Bovini respirovirus 3*, BVDV = *Pestivirus A in B*, BoHV 1 = *Bovini alphaherpesvirus 1*, BAdV = *bovini adenovirusi*

4.5.3.2 Rezultati dokazovanja respiratornih patogenov z RT-qPCR in s qPCR pri govedih iz skupine Pk

Od 16 govedi iz skupine Pk smo pri dveh govedih ugotovili nukleinsko kislino bakterije *H. somni* (12,5 %), pri dveh govedih pa bakterije *P. multocida* (12,5%). Povprečna Ct-vrednost pozitivnih vzorcev za bakterijo *H. somni* je znašala 38,66, za bakterijo *P. multocida* pa 38,21. Pri vseh štirih govedih je bil prisoten samo en respiratorni patogen. Pri drugih 12 govedih (75,0 %) v pljučih nismo ugotovili nukleinskih kislin preiskovanih respiratornih patogenov.

Tabela 14: Rezultati dokazovanja respiratornih patogenov z RT-qPCR in s qPCR v vzorcih pljuč 16 govedi iz skupine Pk

Table 14: The results of proving of respiratory pathogens with the RT-qPCR and qPCR in lung samples of 16 cattle from the Pk-group

Rezultati PCR	<i>M. bovis</i>	<i>H. somni</i>	<i>P. mult.</i>	<i>M. haemol.</i>	BCV	BRSV	BPI3	BVDV	BoHV-1	BAdV
Štev. vzorcev	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16
Štev. pozitivnih	0	2	2	0	0	0	0	0	0	0
Delež pozit. (v %)	0	12,5	12,5	0	0	0	0	0	0	0
Povp. vred. Ct	0	38,66	38,21	0	0	0	0	0	0	0

4.5.4 Rezultati viroloških preiskav v skupinah živih govedi

4.5.4.1 Rezultati IVCK pri govedih iz skupine Ž

Pri skupini klinično bolnih govedi iz skupine Ž smo IVCK opravili iz nosnih brisov 137 govedi. Pri 8 vzorcih (5,8 %) smo na celični kulturi opazili CPE. Pozitivni so bili vzorci z oznakami Ž14, Ž20, Ž91, Ž105, Ž106, Ž107, Ž146 in Ž159. Z metodo direktne imunofluorescence smo v celični kulturi v enem primeru (Ž146) potrdili BoHV-1, v štirih primerih BPI3 (Ž14, Ž20, Ž91, Ž159) in v treh primerih BRSV (Ž105, Ž106, Ž107).

4.5.4.2 Rezultati IVCK pri govedih iz skupine Žk

Vsi nosni brisi klinično bolnih govedi iz skupine Žk so bili v testu IVCK negativni.

4.5.5 Rezultati dokazovanja respiratornih patogenov z RT-qPCR in s qPCR pri govedih iz skupine Ž

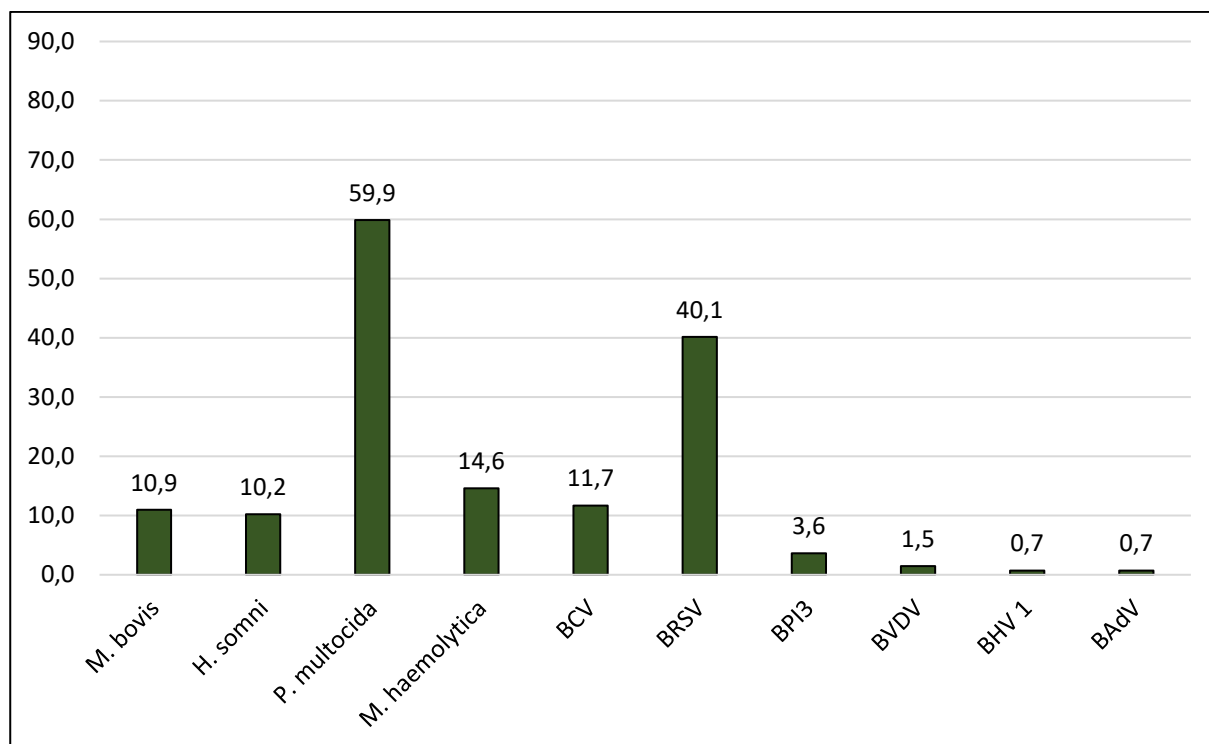
Pri 137 klinično bolnih govedih iz skupine Ž smo iz nosnih brisov z RT-qPCR in s qPCR dokazovali prisotnost desetih respiratornih patogenov. Rezultati preiskave so v tabeli 15.

Tabela 15: Povzetek rezultatov dokazovanja respiratornih patogenov z RT-qPCR in s qPCR v nosnih brisih 137 klinično bolnih govedi iz skupine Ž

Table 15: Summary of the results of proving the respiratory pathogens with the RT-qPCR and qPCR in nasal swabs of 137 clinically ill cattle from the Ž-group

Rezultati PCR Ž	<i>M.</i> <i>bovis</i>	<i>H.</i> <i>somni</i>	<i>P.</i> <i>mult.</i>	<i>M.</i> <i>haemol.</i>	<i>BCV</i>	<i>BRSV</i>	<i>BPI3</i>	<i>BVDV</i>	<i>BoHV-1</i>	<i>BAdV</i>
Štev. vzorcev	137	137	137	137	137	137	137	137	137	137
Štev. pozitivnih	15	13	82	20	16	55	5	2	1	1
Delež pozit. (v %)	10,9	9,5	59,9	14,6	11,7	40,1	3,6	1,5	0,7	0,7
Povp. vred. Ct	30,51	35,36	30,35	34,87	31,61	29,65	32,39	28,97	29,91	29,43

V nosnem brisu 137 klinično bolnih govedi iz skupine Ž je bil najpogostejše ugotovljeni respiratorni patogen bakterija *P. multocida*, katere nukleinsko kislino smo ugotovili v nosnem brisu pri 82 pregledanih govedih (59,9 %). BRSV smo dokazali v 40,1 %, nukleinsko kislino bakterije *M. haemolytica* v 14,6 % (slika 25). V nosnem brisu 16,8 % klinično bolnih govedi z molekularnimi preiskavami nismo ugotovili nobenega od preiskovanih respiratornih patogenov.



Slika 25: Delež posameznega respiratornega patogena, ugotovljenega z RT-qPCR in s qPCR v nosnem brisu 137 klinično bolnih govedi iz skupine Ž (v %)

Figure 25: The percentage of individual respiratory pathogen found with the RT-qPCR and qPCR in nasal swabs from 137 clinically ill cattle of the Ž-group

Legenda: *M. bovis* = *Mycoplasma bovis*, *H. somni* = *Histophilus somni*, *P. multocida* = *Pasteurella multocida*, *M. haemolytica* = *Mannheimia haemolytica*, BCV = *Betacoronavirus 1*, BRSV = *Bovini ortopneumovirus*, BPI3 = *Bovini respirovirus 3*, BVDV = *Pestivirus A in B*, BoHV 1 = *Bovini alfa herpesvirus 1*, BAdV = *bovini adenovirusi*

4.5.6 Rezultati dokazovanja respiratornih patogenov z RT-qPCR in s qPCR pri govedih iz skupine Žk

Od 10 govedi iz skupine Žk smo pri enem govedu ugotovili nukleinsko kislino bakterije *H. somni* in bakterije *P. multocida*. Pri preostalih 9 govedih v nosnem brisu nismo ugotovili nukleinskih kislin proučevanih respiratornih patogenov.

Rezultati dokazovanja respiratornih patogenov z RT-qPCR in s qPCR iz nosnega brisa govedi iz skupine Žk so v tabeli 16.

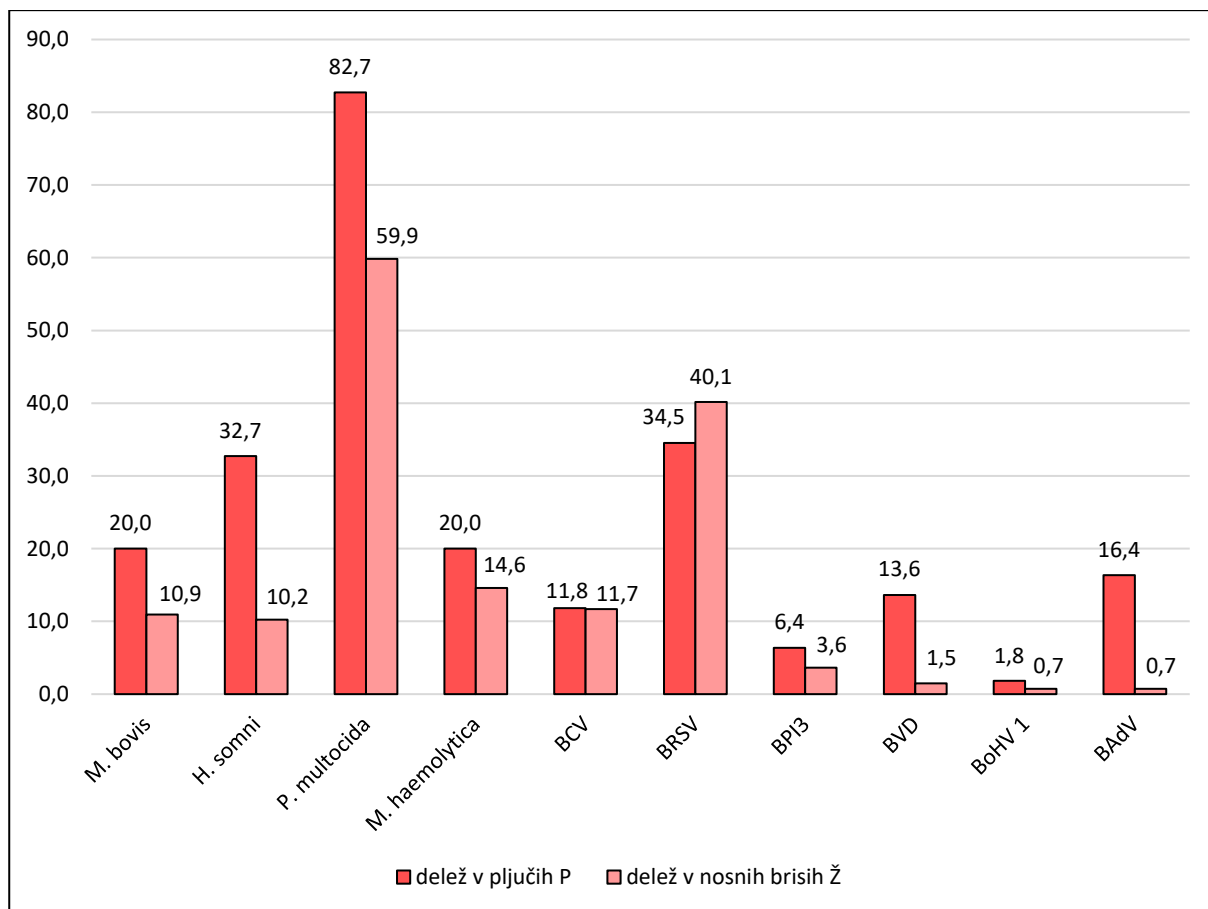
Tabela 16: Povzetek rezultatov dokazovanja respiratornih patogenov z RT-qPCR in s qPCR v vzorcih pljuč 10 govedi iz skupine Žk

Table 16: Summarised results of proving the respiratory pathogens with the RT-qPCR and qPCR in lung samples of 10 cattles from the Žk-group

Rezultati PCR Žk	<i>M. bovis</i>	<i>H. somni</i>	<i>P. mult.</i>	<i>M. haemol.</i>	BCV	BRSV	BPI3	BVDV	BoHV-	BAdV
Štev. vzorcev	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Štev. pozitivnih	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
Delež pozit. (v %)	0	10	10	0	0	0	0	0	0	0
Povp. vred. Ct	0	35,35	32,99	0	0	0	0	0	0	0

Legenda: *M. bovis* = *Mycoplasma bovis*, *H. somni* = *Histophilus somni*, *P. multocida* = *Pasteurella multocida*, *M. haemolytica* = *Mannheimia haemolytica*, BCV = *Betacoronavirus 1*, BRSV = *Bovini ortopneumovirus*, BPI3 = *Bovini respirovirus 3*, BVDV = *Pestivirus A in B*, BoHV 1 = *Bovini alfaherpesvirus 1*, BAdV = *bovini adenovirusi*

4.5.7 Primerjava rezultatov ugotavljanja respiratornih patogenov z RT-qPCR in s qPCR pri govedih iz skupine P in skupine Ž



Slika 26: Delež govedi iz skupine P in skupine Ž, pri katerih so bili z RT-qPCR in s qPCR ugotovljeni respiratorni patogeni (v %)

Figure 26: The percentage of cattle from the P-group and the Ž-group in which the respiratory pathogens were detected with the RT-qPCR and qPCR methods

Legenda: *M. bovis* = *Mycoplasma bovis*, *H. somni* = *Histophilus somni*, *P. multocida* = *Pasteurella multocida*, *M. haemolytica* = *Mannheimia haemolytica*, *BCV* = *Betacoronavirus 1*, *BRSV* = *Bovini ortopneumovirus*, *BPI3* = *Bovini respirovirus 3*, *BVDV* = *Pestivirus A in B*, *BoHV 1* = *Bovini alfaherpesvirus 1*, *BAdV* = *bovini adenovirusi*

Slika 26 prikazuje deleže posameznega respiratornega patogena, ugotovljenega z RT-qPCR in s qPCR iz vzorcev pljuč govedi iz skupine P in iz nosnih brisov govedi iz skupine Ž.

4.5.8 Rezultati seroloških preiskav pri govedih iz skupine Ž

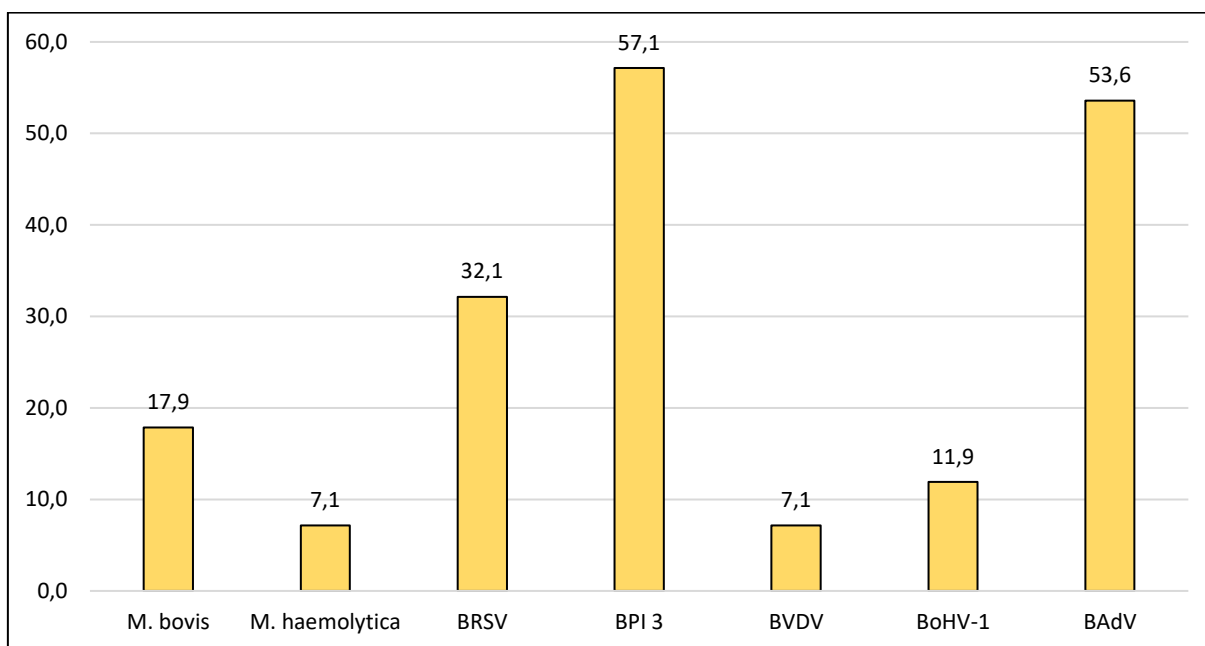
Pri 84 govedih iz skupine Ž smo opravili serološko preiskavo vzorcev krvi na 7 respiratornih patogenov, kar je prikazano v tabeli 17.

Tabela 17: Rezultati seroloških preiskav pri klinično bolnih govedih iz skupine Ž

Table 17: Results of the serological examinations of clinically ill cattle from the Ž-group

SEROLOŠKA P.	<i>M. bovis</i>	<i>M. haemo.</i>	<i>BRSV</i>	<i>BPI3</i>	<i>BVDV</i>	<i>BoHV-1</i>	<i>BAdV 3</i>
Štev. vzorcev	84	84	84	84	84	84	84
Štev. pozitivnih	15	6	27	48	6	10	45
Delež pozit. (v %)	17,9	7,1	32,1	57,1	7,1	11,9	53,6

Legenda: *M. bovis* = *Mycoplasma bovis*, *M. haemol.* = *Mannheimia haemolytica*, *BRSV* = *Bovini orthopneumovirus*, *BPI3* = *Bovini respirovirus 3*, *BVDV* = *Pestivirus A in B*, *BoHV 1* = *Bovini alfaherpesvirus 1*, *BAdV* = *bovini adenovirusi*



Slika 27: Delež serološko pozitivnih krvnih vzorcev 84 klinično bolnih govedi iz skupine Ž (v %)

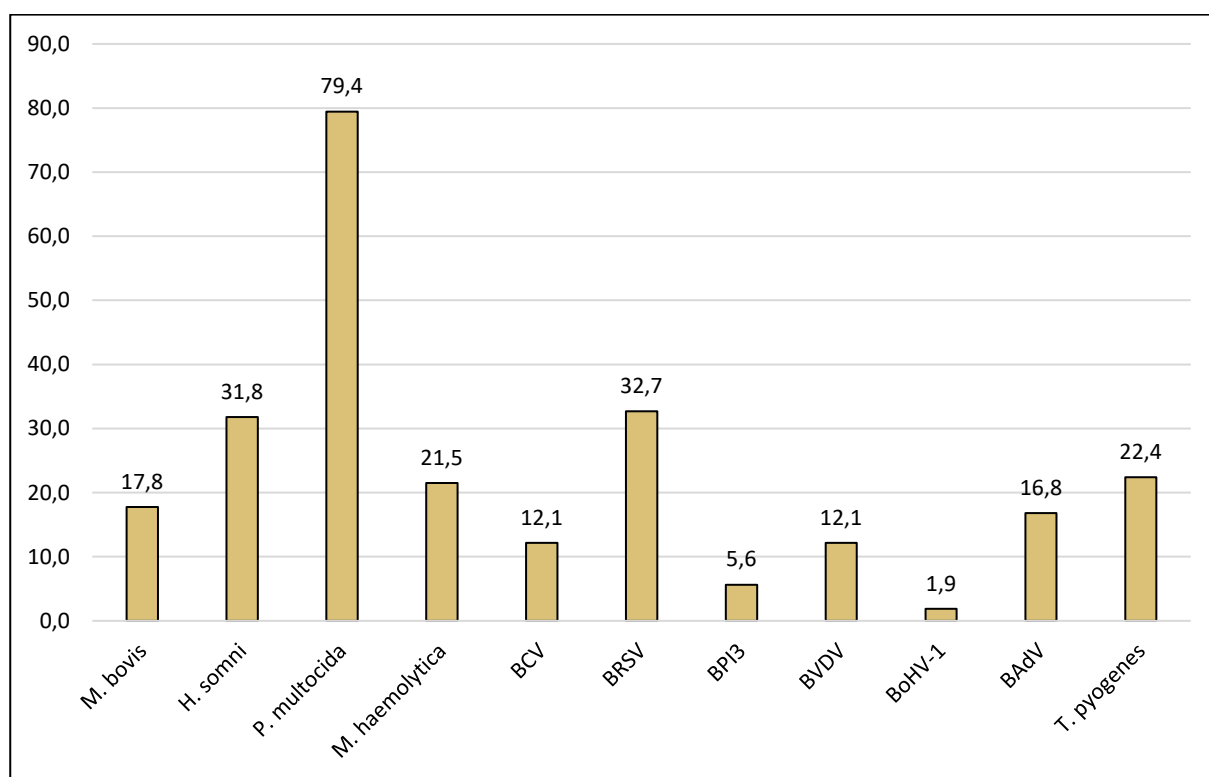
Figure 27: The percentage of serologically positive blood samples of 84 clinically ill cattle from the Ž-group

4.8 ODGOVORI NA ZNANSTVENA VPRAŠANJA

4.8.1 Respiratorni patogeni pri govedu in njihova pojavnost v slovenskih rejah govedi

V pljučih govedi iz skupine P smo z RT-qPCR in s qPCR ugotavljali prisotnost BoHV-1, BPI3, BCV, BRSV, BVDV, BAdV, *H. somni*, *M. haemolytica*, *P. multocida* in *M. bovis*. Prisotnost bakterije *T. pyogenes* v pljučih govedi iz skupine P smo ugotavljali s klasično bakteriološko preiskavo. Z navedenimi preiskavami smo ugotovili vse našete respiratorne patogene.

Pojavnost posameznega respiratornega patogena, ugotovljenega v pljučih govedi iz skupine P, je prikazana na sliki 28.



Slika 28: Pojavnost posameznega respiratornega patogena, ugotovljenega z RT-qPCR in s qPCR in z gojiščno bakteriološko preiskavo v vzorcih pljuč 107 govedi iz skupine P (v %)

Figure 28: Prevalence of the individual respiratory pathogens detected with the methods of RT-qPCR and qPCR and cultural bacterial examination in lung samples of 107 cattle from the P-group (in %)

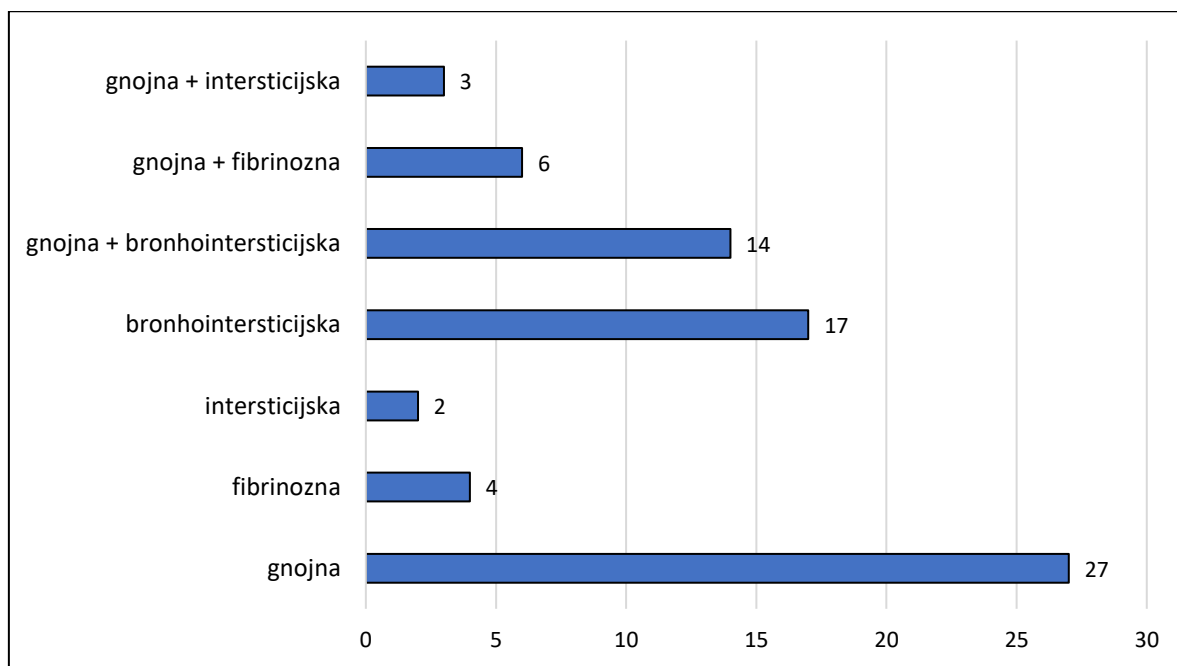
Legenda: *M. bovis* = *Mycoplasma bovis*, *H. somni* = *Histophilus somni*, *P. multocida* = *Pasteurella multocida*, *M. haemolytica* = *Mannheimia haemolytica*, BCV = Betacoronavirus 1, BRSV = Bovini ortopneumovirus, BPI3 = Bovini respirovirus 3, BVDV = Pestivirus A in B, BoHV 1 = Bovini alfaherpesvirus 1, BAdV = bovine adenovirusi

Prisotnost respiratornih patogenov pri govedu iz skupine Ž smo ugotavljali z RT-qPCR in s qPCR iz nosnih brisov, odvzetih v akutni fazi bolezni. Tudi pri govedih iz skupine Ž smo

ugotovili vse iskane respiratorne patogene: BoHV-1, BPI3, BCV, BRSV, BVDV, BAdV, *H. somni*, *M. haemolytica*, *P. multocida* in *M. bovis*. Prisotnosti bakterije *T. pyogenes* v nosnem brisu nismo ugotavljali. Rezultati ugotavljanja respiratornih patogenov v nosnem brisu govedi iz skupine Ž so prikazani na sliki 25.

4.8.2 Respiratorni patogeni pri govedu in patomorfološke spremembe, ki jih povzročajo

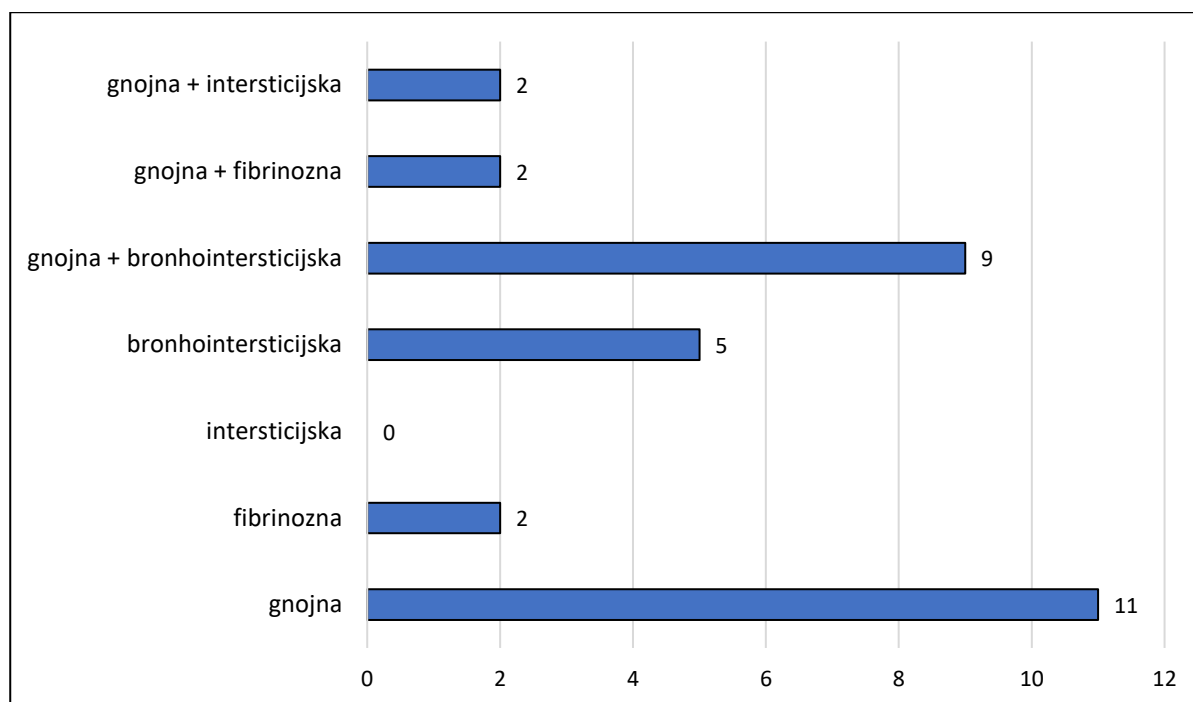
Pri iskanju povezave med patomorfološkimi spremembami in prisotnostjo posameznega respiratornega patogena v pljučih govedi iz skupine P smo ugotovili: *P. multocida* se najpogosteje pojavlja pri gnojni bronhopnevmoniji in bronhointersticijski pljučnici, *H. somni* pri gnojni bronhopnevmoniji in kombinaciji gnojne in bronhointersticijske pljučnice, *T. pyogenes* pri gnojni bronhopnevmoniji, *M. haemolytica* pri gnojni in fibrinozni bronhopnevmoniji ter *M. bovis* pri gnojni bronhopnevmoniji.



Slika 29: Število laboratorijskih dokazov bakterije *P. multocida* pri posameznih vrstah pljučnic, ugotovljenih z RT-qPCR in s qPCR in/ali z gojiščno bakteriološko preiskavo pri govedih iz skupine P (N = 89)

Figure 29: The number of laboratory detections of *P. multocida* in individual group of pneumonias, found with the RT-qPCR and qPCR and/or cultural bacteriological examination of the cattle from the P-group (N = 89)

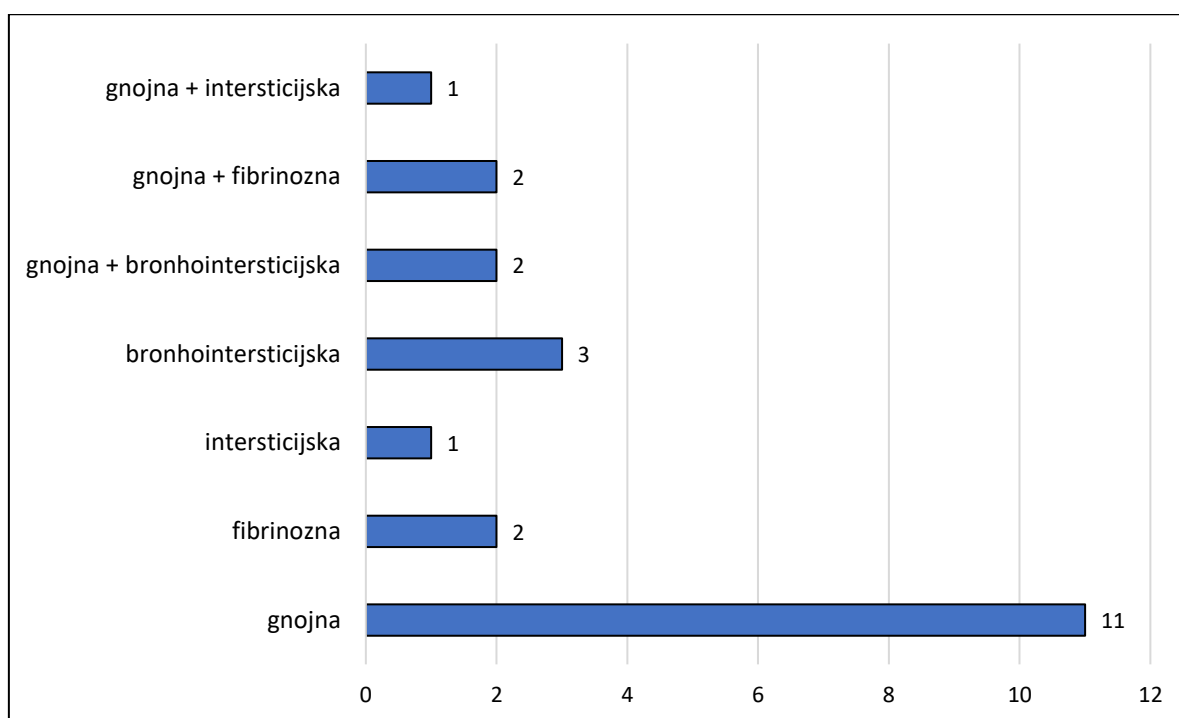
Povezava med prisotnostjo bakterije *P. multocida* in patološkimi spremembami, značilnimi za gnojno bronhopnevmonijo, je statistično značilna ($p = 0,0013$).



Slika 30: Število laboratorijskih dokazov bakterije *H. somni* pri posameznih vrstah pljučnic, ugotovljenih z RT-qPCR in s qPCR in/ali z gojiščno bakteriološko preiskavo pri govedih iz skupine P (N = 89)

Figure 30: The number of laboratory detections of bacteria *H. somni* in individual group of pneumonias, found with the RT-qPCR and qPCR and/or cultural bacteriological examination of the cattle from the P-group (N = 89)

Povezava med prisotnostjo bakterije *H. somni* in patološkimi spremembami, značilnimi za gnojno bronhopnevmonijo, je statistično značilna ($p = 0,01806$).

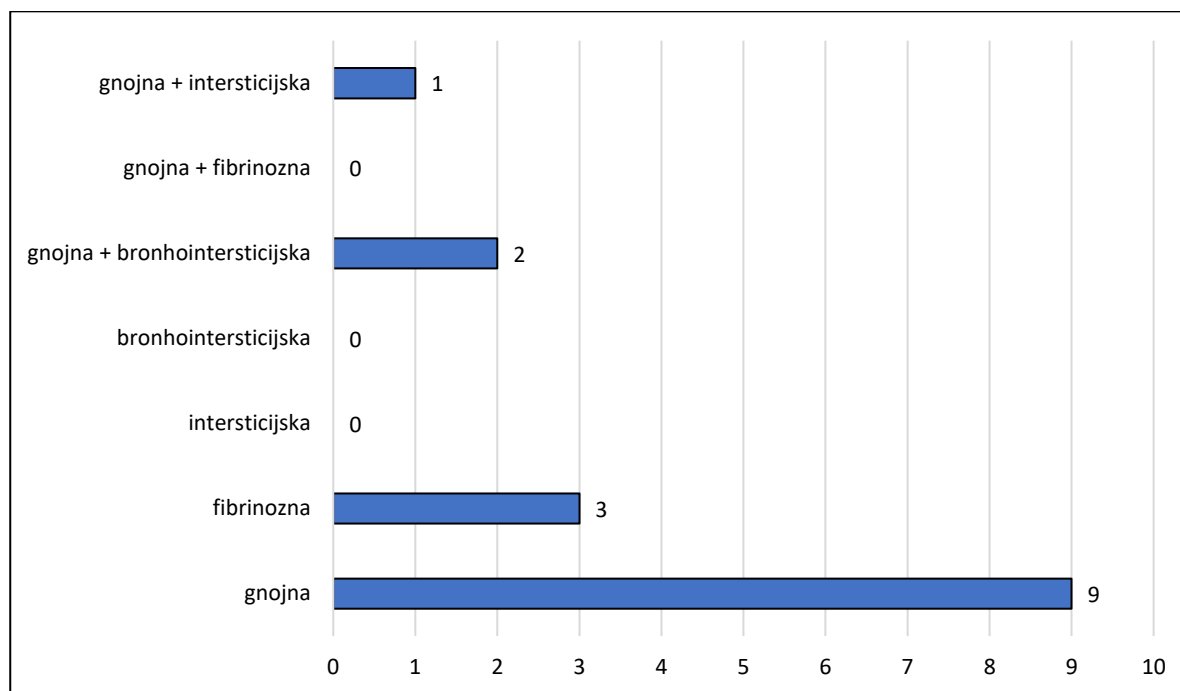


Slika 31: Število laboratorijskih dokazov bakterije *T. pyogenes* pri posameznih vrstah pljučnic, ugotovljenih z RT-qPCR in s qPCR in/ali z gojiščno bakteriološko preiskavo pri govedih iz skupine P (N = 89)

Figure 31: The number of laboratory detections of bacteria *T. pyogenes* in individual group of pneumonias, found with the RT-qPCR and qPCR and/or cultural bacteriological examination of the cattle from the P-group (N = 89)

Povezava med prisotnostjo bakterije *T. pyogenes* in patološkimi spremembami, značilnimi za gnojno bronhopnevmonijo, ni statistično značilna ($p = 0,18223$).

Med bakterijo *T. pyogenes* in bronhointersticijsko pljučnico smo ugotovili negativno povezavo, ki je statistično značilna ($p = 0,01576$).

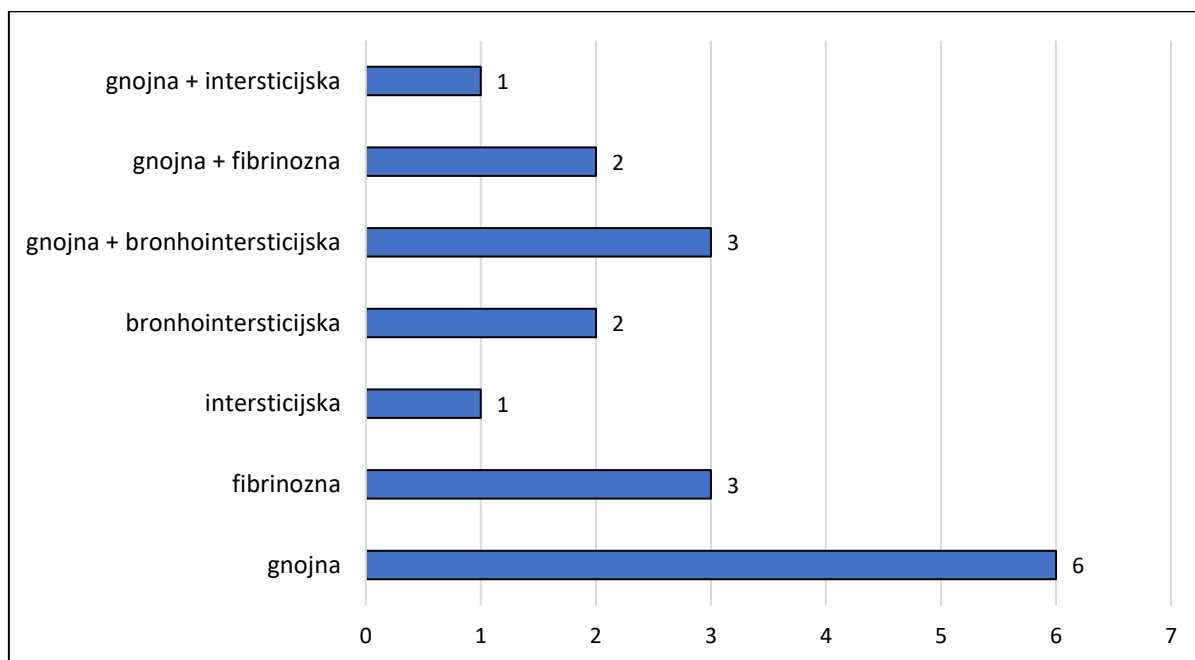


Slika 32: Število laboratorijskih dokazov bakterije *M. haemolytica* pri posameznih vrstah pljučnic, ugotovljenih z RT-qPCR in s qPCR in/ali z gojiščno bakteriološko preiskavo pri govedih iz skupine P (N = 89)

Figure 32: The number of laboratory detections of bacteria *M. haemolytica* in individual group of pneumonias, found with the RT-qPCR and qPCR and/or cultural bacteriological examination of the cattle from the P-group (N = 89)

Povezava med prisotnostjo bakterije *M. haemolytica* in patološkimi spremembami, značilnimi za gnojno bronhopnevmonijo, ni statistično značilna ($p = 0,09287$).

Med bakterijo *M. haemolytica* in bronhointersticijsko pljučnico smo ugotovili negativno povezavo, ki je statistično značilna ($p = 0,0092$).

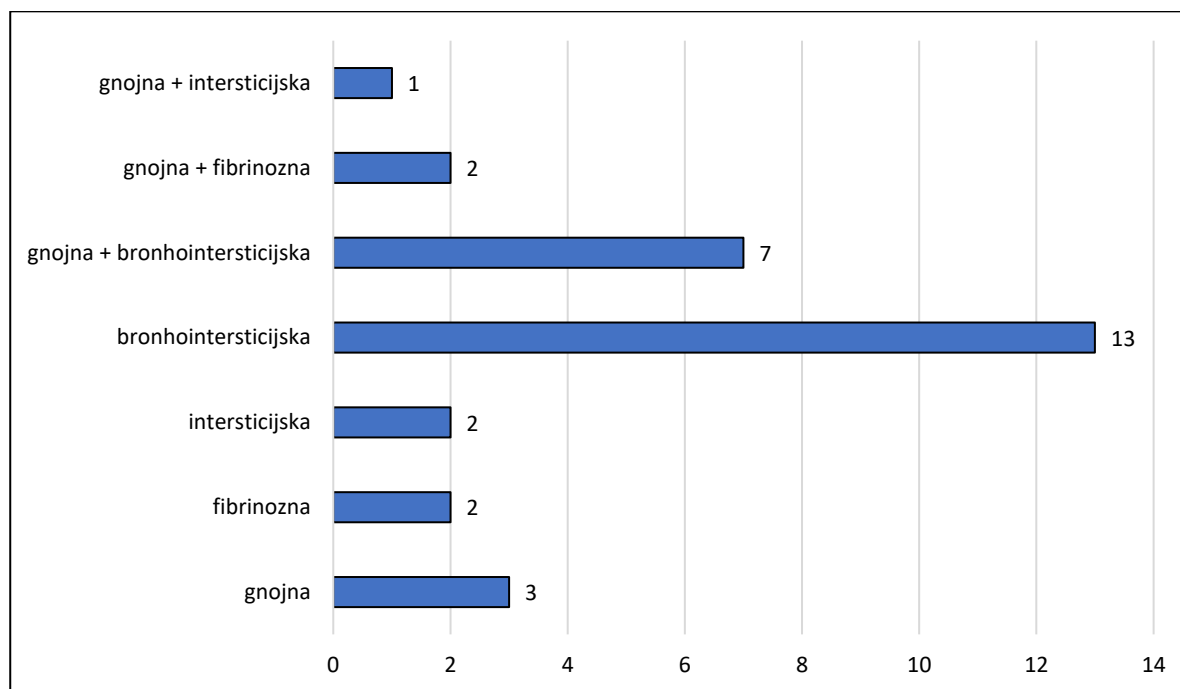


Slika 33: Število laboratorijskih dokazov bakterije *M. bovis* pri posameznih vrstah pljučnic, ugotovljenih z RT-qPCR in s qPCR in/ali z gojiščno bakteriološko preiskavo pri govedih iz skupine P (N = 89)

Figure 33: The number of laboratory detections of bacteria *M. bovis* in individual group of pneumonias, found with the RT-qPCR and qPCR and/or cultural bacteriological examination of the cattle from the P-group (N = 89)

Povezava med prisotnostjo bakterije *M. bovis* in patološkimi spremembami, značilnimi za gnojno bronhopnevmonijo, ni statistično značilna ($p = 0,11690$).

Pri virusnih povzročiteljih smo ugotovili, da se BRSV najpogosteje pojavlja pri bronhointersticijski pljučnici in njeni kombinaciji z gnojno bronhopnevmonijo. BAdV se najpogosteje pojavlja pri bronhointersticijski in gnojni bronhopnevmoniji, BCV približno enako pogosto pri bronhointersticijski in fibrinozni pljučnici. BVDV smo najpogosteje ugotovili pri gnojni, BPI3 pa najpogosteje pri bronhointersticijski pljučnici. Zaradi nizkega števila dokazanih BoHV-1 sklepanje o povezavah med patološkimi spremembami in BoHV-1 ni smiselno.

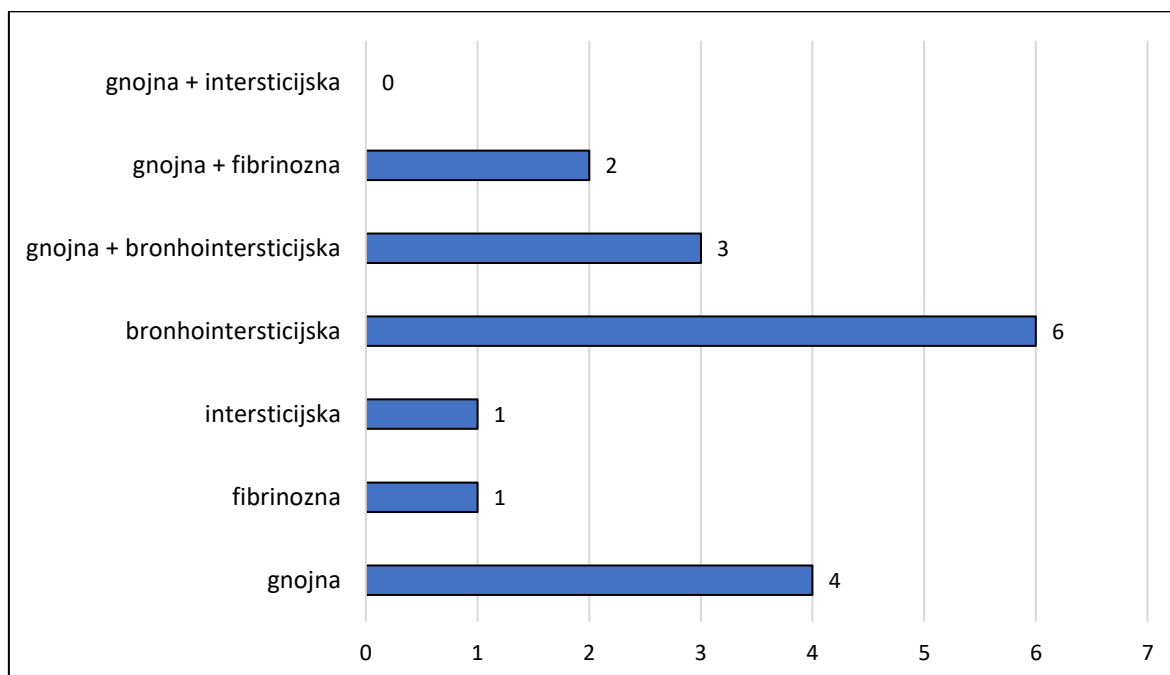


Slika 34: Število laboratorijskih dokazov BRSV pri posameznih vrstah pljučnic, ugotovljenih z RT-qPCR in s qPCR in/ali z gojiščno bakteriološko preiskavo pri govedih iz skupine P (N = 89)

Figure 34: The number of laboratory detections of BRSV in individual group of pneumonias, found with the RT-qPCR and qPCR and/or cultural bacteriological examination of the cattle from the P-group (N = 89)

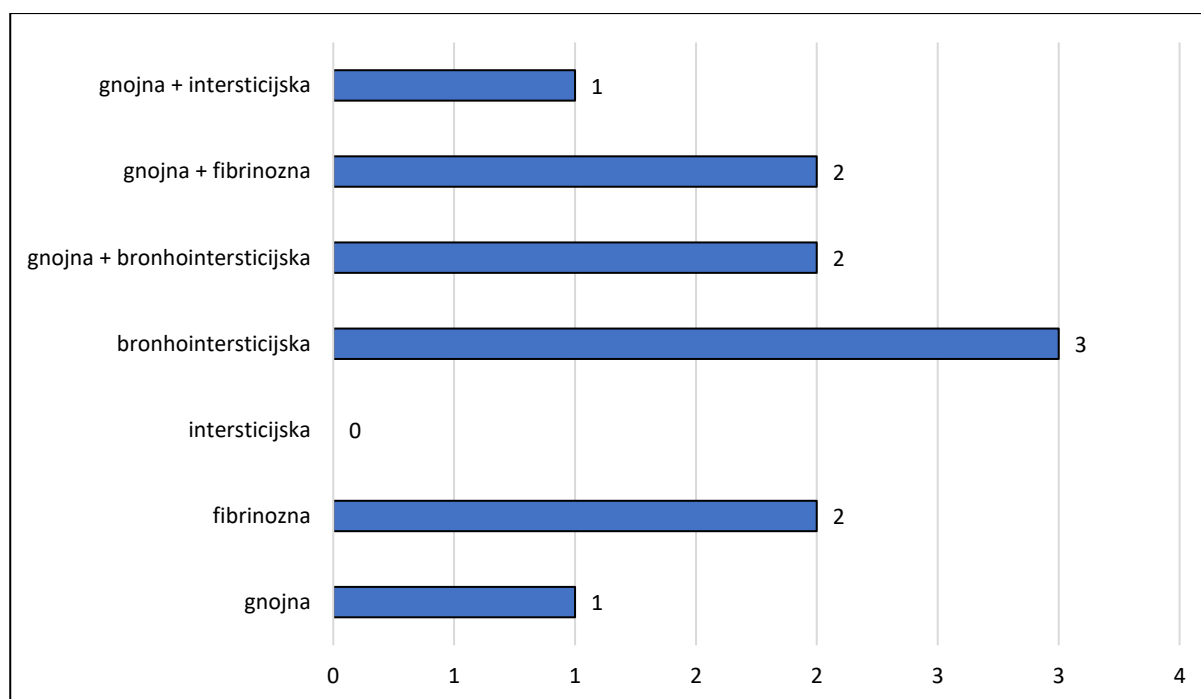
Povezava med prisotnostjo BRSV in patološkimi spremembami, značilnimi za bronhointersticijsko pljučnico, je bila statistično značilna ($p = 0,00004$).

Ugotovili smo negativno povezavo med prisotnostjo BRSV in patološkimi spremembami, značilnimi za gnojno bronhopnevmonijo, ki je bila statistično značilna ($p = 0,01693$).



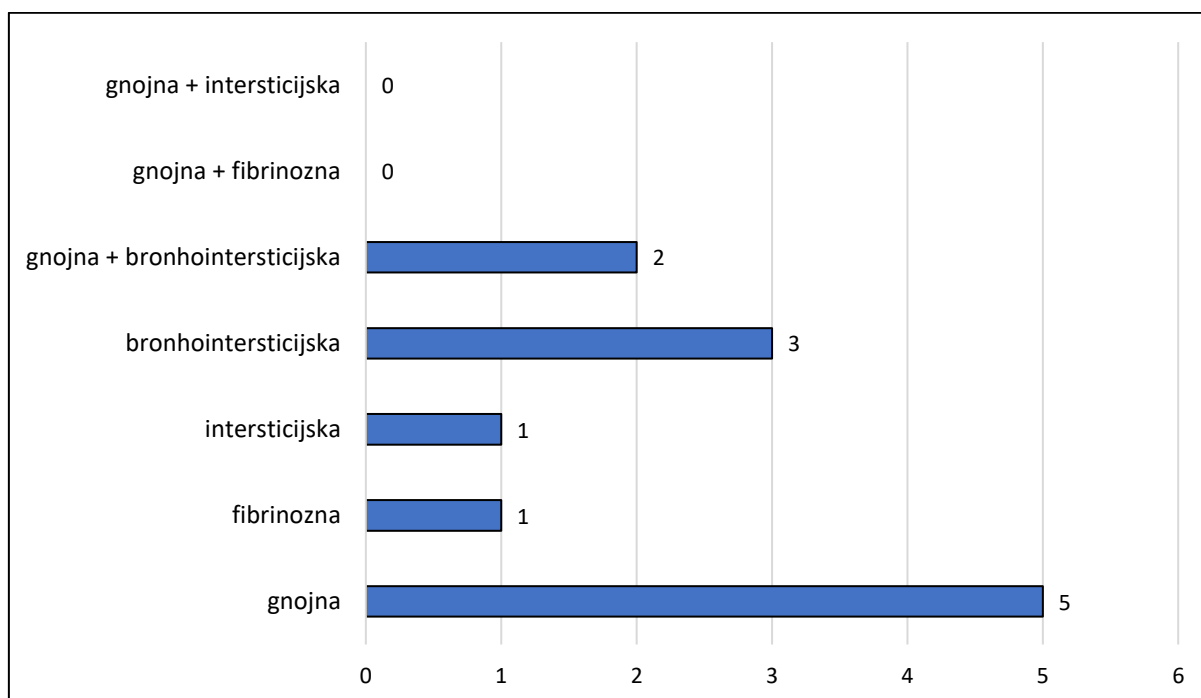
Slika 35: Število laboratorijskih dokazov BAdV pri posamezni skupini pljučnic, ugotovljenih z RT-qPCR in s qPCR in/ali z gojiščno bakteriološko preiskavo pri govedih iz skupine P (N = 89)

Figure 35: The number of laboratory detections of BAdV in individual group of pneumonias, found with the RT-qPCR and qPCR and/or cultural bacteriological examination of the cattle from the P-group (N = 89)



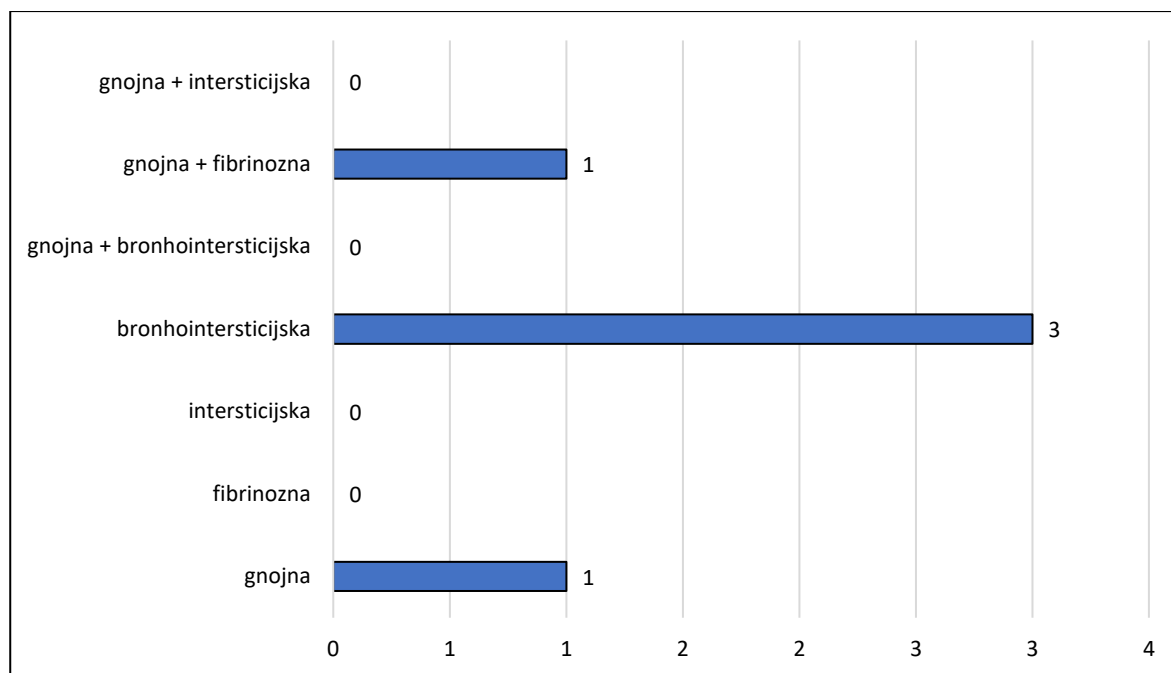
Slika 36: Število laboratorijskih dokazov BCV pri posameznih vrstah pljučnic, ugotovljenih z RT-qPCR in s qPCR in/ali z gojiščno bakteriološko preiskavo pri govedih iz skupine P (N = 89)

Figure 36: The number of laboratory detections of BCV in individual group of pneumonias, found with the RT-qPCR and qPCR and/or cultural bacteriological examination of the cattle from the P-group (N = 89)



Slika 37: Število laboratorijskih dokazov BVDV pri posameznih vrstah pljučnic, ugotovljenih z RT-qPCR in s qPCR in/ali z gojiščno bakteriološko preiskavo pri govedih iz skupine P (N = 89)

Figure 37: The number of laboratory detections of BVDV in individual group of pneumonias, found with the RT-qPCR and qPCR and/or cultural bacteriological examination of the cattle from the P-group (N = 89)



Slika 38: Število laboratorijskih dokazov BPI3V pri posameznih vrstah pljučnic, dokazanih z RT-qPCR in s qPCR in/ali z gojiščno bakteriološko preiskavo pri govedih iz skupine P (N = 89)

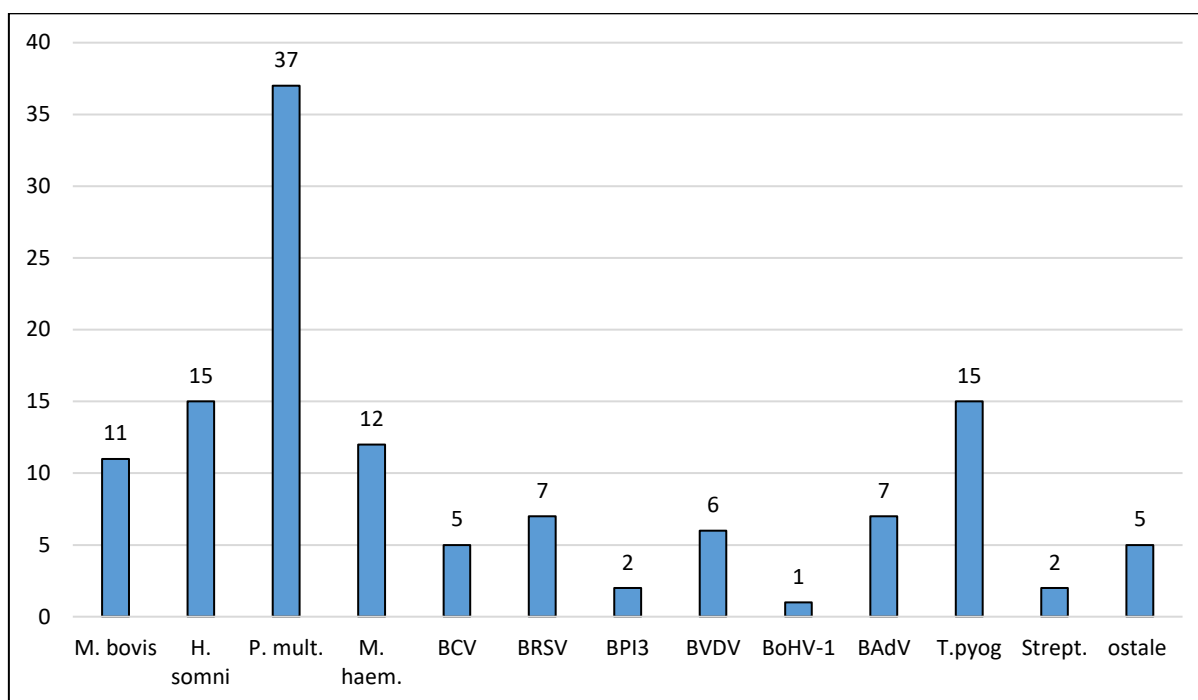
Figure 38: The number of laboratory detections of BPI3 in individual group of pneumonias, found with the RT-qPCR and qPCR and/or cultural bacteriological examination of the cattle from the P-group (N = 89)

Pri testiranju povezave med vrsto pljučnice in povzročiteljem je zaradi velikega števila različnih vrst pljučnic postalo število vzorcev v skupini posamezne vrste pljučnice premajhno. Zato smo vse našteje vrste pljučnic na podlagi morfoloških značilnosti združili v tri večje skupine. V tabeli 18 so prikazani podatki o številu pljučnic, združenih v tri osnovne skupine.

Tabela 18: Zastopanost posameznih vrst pljučnic po združitvi v tri osnovne skupine

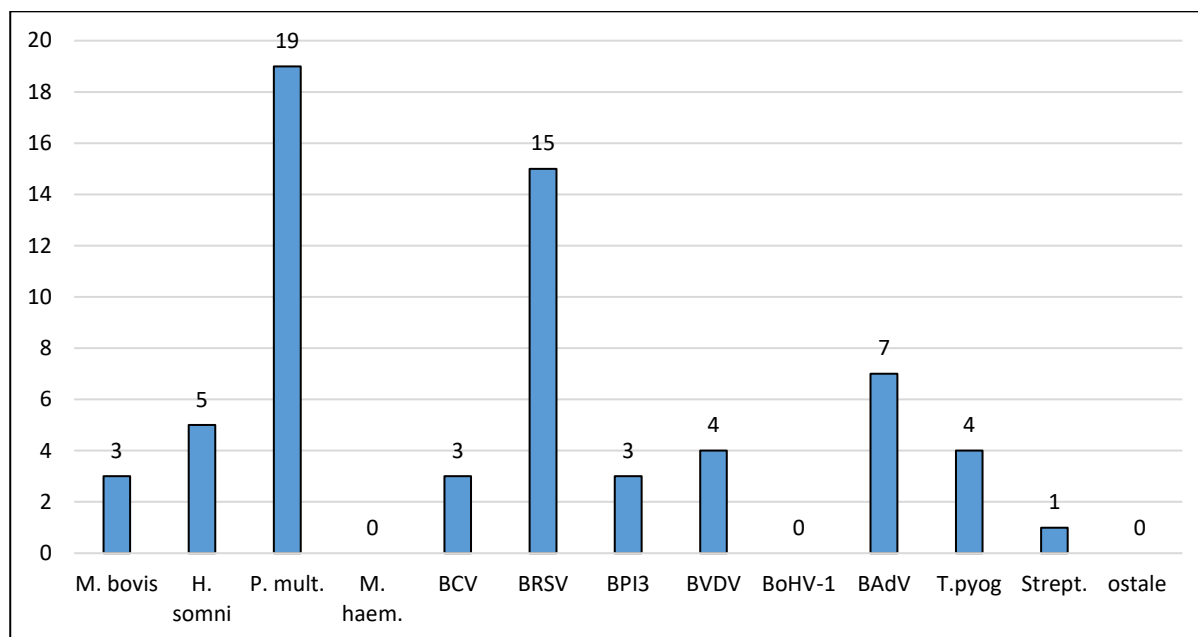
Table 18: The percentage of individual types of pneumonia after categorising them in three major groups

Skupina pljučnic	Posamezne vrste pljučnic	Število	Delež (v %)
bronhopnevmonije	gnojna, fibrinozna, gnojna + fibrinozna	41	46,1
intersticijske	intersticijske, bronhointersticijske	29	32,6
kombinirane	gnojne + intersticijske, gnojne + bronhointersticijske	19	21,3
	skupaj	89	100



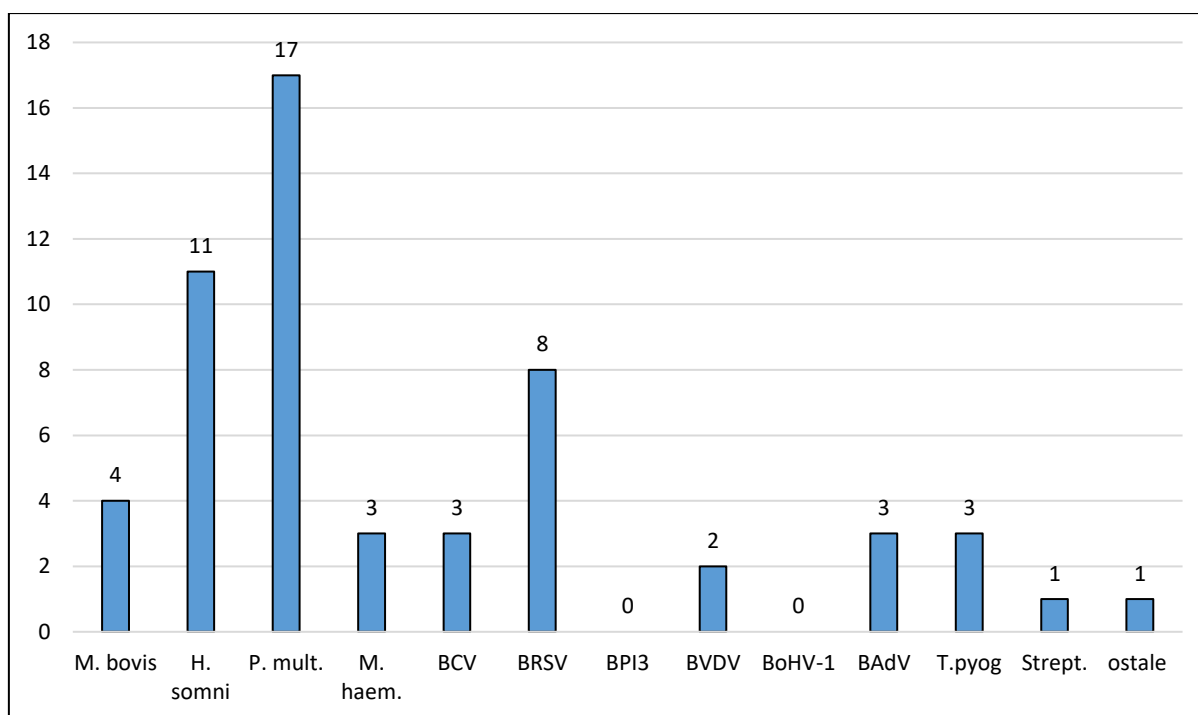
Slika 39: Število laboratorijskih dokazov posameznega respiratornega patogena pri bronhopnevmoniji, ugotovljenih z RT-qPCR in s qPCR in/ali z gojiščno bakteriološko preiskavo pri govedih iz skupine P (N = 89)

Figure 39: The number of laboratory detections of single respiratory pathogen of bronchopneumonia, using the RT-qPCR and qPCR methods and/or cultural bacteriological examination of the cattle from the P-group (N = 89)



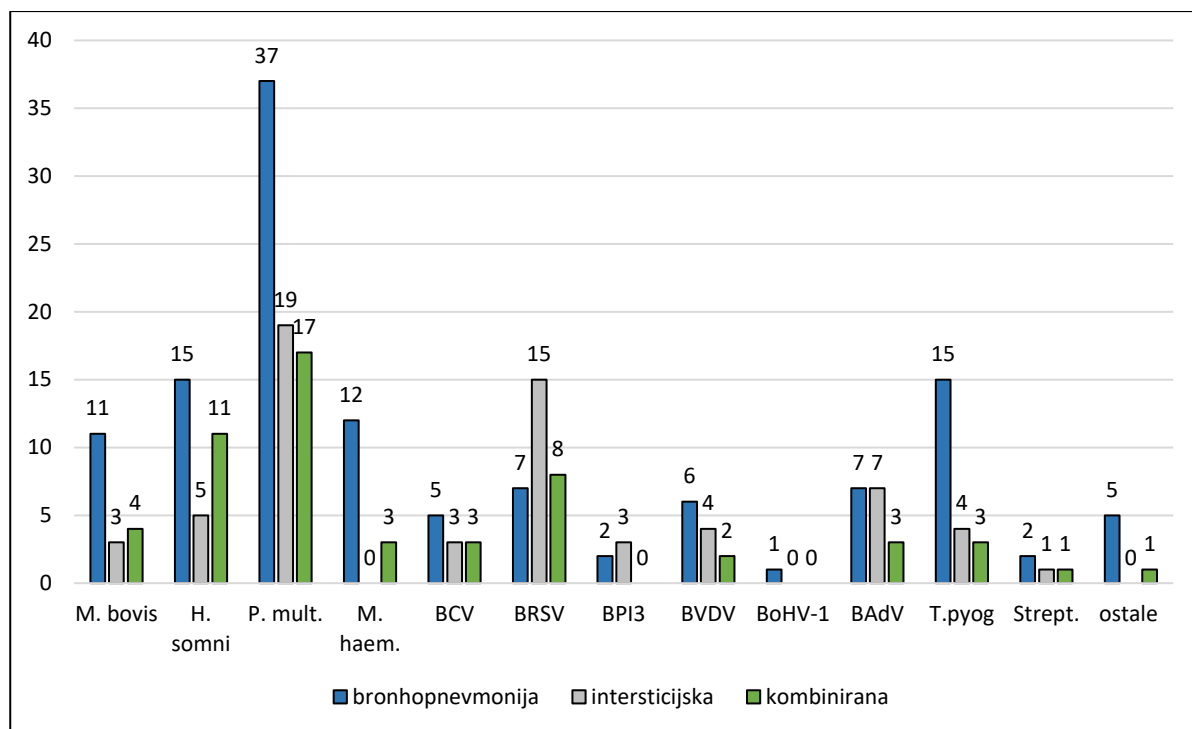
Slika 40: Število laboratorijskih dokazov posameznega respiratornega patogena pri intersticijski pljučnici, ugotovljenih z RT-qPCR in s qPCR in/ali z gojiščno bakteriološko preiskavo pri govedih iz skupine P (N = 89)

Figure 40: The number of laboratory detections of single respiratory pathogen of interstitial pneumonia, using the RT-qPCR and qPCR methods and/or cultural bacteriological examination of the cattle from the P-group (N = 89)



Slika 41: Število laboratorijskih dokazov posameznega respiratornega patogena pri kombiniranih pljučnicah, ugotovljenih z RT-qPCR in s qPCR in/ali z gojiščno bakteriološko preiskavo pri govedih iz skupine P (N = 89)

Figure 41: The number of laboratory detections of single respiratory pathogen of combined pneumonias, using the RT-qPCR and qPCR methods and/or cultural bacteriological examination of the cattle from the P-group (N = 89)



Slika 42: Število laboratorijskih dokazov posameznega respiratornega patogena, ugotovljenih z RT-qPCR in s qPCR in/ali z gojiščno bakteriološko preiskavo pri govedih iz skupine P (N = 89) pri posamezni skupini pljučnic
 Figure 42: The number of laboratory detections of individual respiratory pathogen of combined pneumonias, using the RT-qPCR and qPCR methods and/or cultural bacteriological examination of the cattle from the P-group (N = 89)

V tabeli 19 so prikazani rezultati statističnega testiranja povezav med tremi skupinami pljučnic in med ugotovljenimi respiratornimi patogeni.

Tabela 19: Statistična povezava med skupinami pljučnic in respiratornimi patogeni

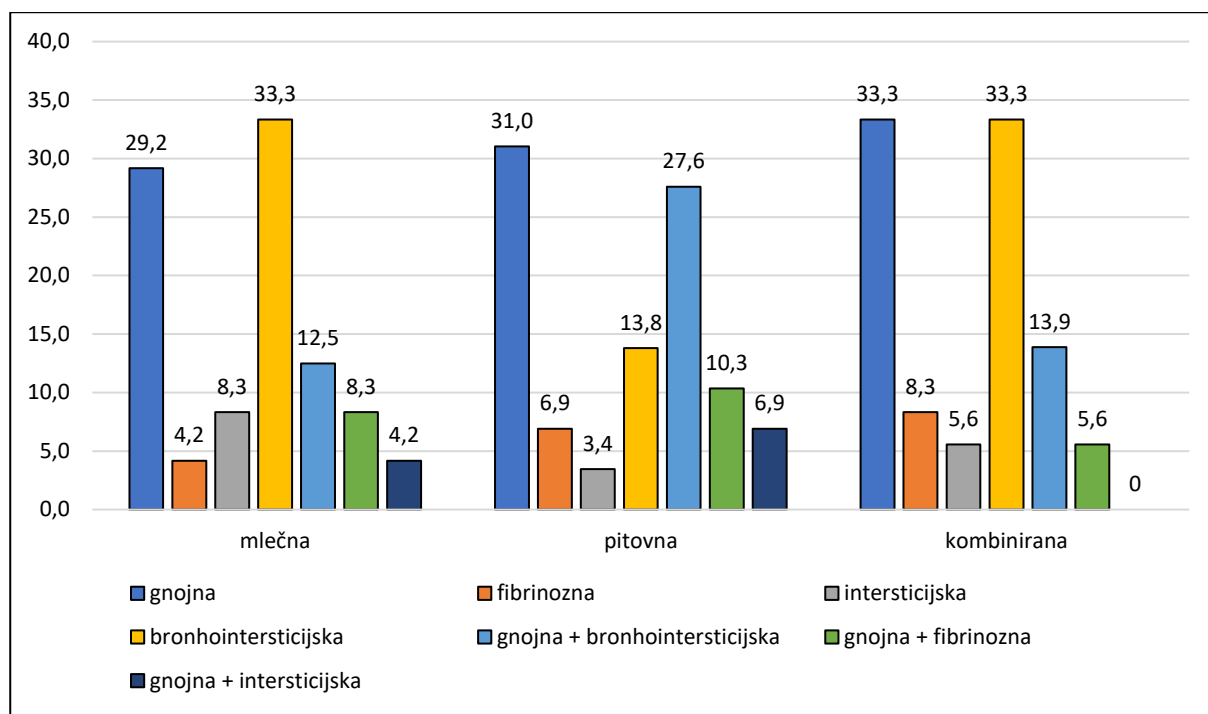
Table 19: Statistical link between the groups of pneumonias and respiratory pathogens

Povzročitelj	Vrsta testa	Bronhopnevmonije	Intersticijske	Kombinirane
<i>M. bovis</i>	hi-kvadrat	0,1517	0,1067	0,9193
	Fisher	0,1896	0,1593	1
<i>H. somni</i>	hi-kvadrat	0,7482	0,01546**	0,01735**
	Fisher	0,8249	0,01819**	0,02835**
<i>P. multocida</i>	hi-kvadrat	0,06194*	0,004816**	0,3402
	Fisher	0,09546*	0,007757**	0,5058
<i>M. haemolytica</i>	hi-kvadrat	0,003834**	0,003148**	0,8889
	Fisher	0,004693**	0,001886**	1
BCV	hi-kvadrat	0,9653	0,6881	0,6085
	Fisher	1	1	0,6955
BRSV	hi-kvadrat	0,3826	0,01243**	0,3826
	Fisher	0,4194	0,01706**	0,4194
BPI3	hi-kvadrat	0,7793	0,1782	0,2305
	Fisher	1	0,3246	0,5803
BVDV	hi-kvadrat	0,7689	0,9525	0,6705
	Fisher	1	1	1
BoHV-1	hi-kvadrat	0,2765	0,4845	0,6003
	Fisher	0,4607	1	1
BAdV	hi-kvadrat	0,6529	0,4007	0,6788
	Fisher	0,7886	0,404	1
<i>T. pyogenes</i>	hi-kvadrat	0,01647**	0,09667*	0,309
	Fisher	0,02557**	0,1202	0,3822
<i>Streptococcus spp.</i>	hi-kvadrat	0,8717	0,7405	0,8553
	Fisher	1	1	1
Preostale bakterije	hi-kvadrat	0,05791*	0,07783*	0,772
	Fisher	0,09076*	0,1716	1
Bakterijski patogeni	hi-kvadrat	0,004812**	0,000055**	0,2368
	Fisher	0,004868**	0,0001583**	0,4488
Virusni patogeni	hi-kvadrat	0,001146**	0,0005214**	0,99
	Fisher	0,001421**	0,0004851**	1

P-vrednost	Interpretacija
< 0,05**	Povezava med spremenljivkama je statistično značilna.
0,05–0,1*	Povezava med spremenljivkama je mejno statistično značilna.
> 0,1	Povezava med spremenljivkama ni statistično značilna.
	Rezultati hi-kvadrat testa niso relevantni (premajhne pričakovane vrednosti).

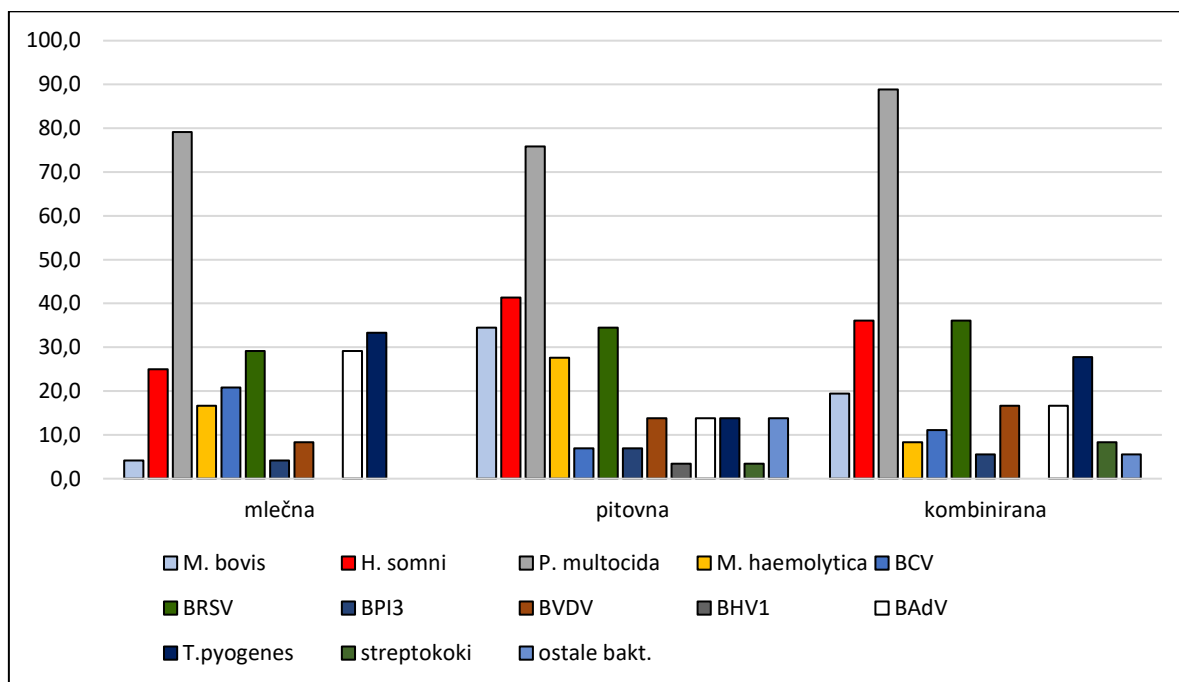
4.8.3 Pojavnost bolezni dihal in respiratornih patogenov v slovenskih pitovnih in mlečnih rejah govedi

Razlike v prevalenci bolezni dihal in respiratornih patogenov med posameznimi vrstami reje smo ugotavljali na vzorcih pljuč 89 govedi iz skupine P, pri katerih smo opravili patohistološko preiskavo, RT-qPCR in qPCR ter klasično gojiščno bakteriološko preiskavo.



Slika 43: Pojavnost posamezne vrste pljučnice, ugotovljene v vzorcih pljuč govedi iz skupine P (N = 89) glede na tip reje (v %)

Figure 43: The prevalence of individual pneumonia types found in lung samples of cattle from the P-group (N=89) according to the type of breeding (in %)



Slika 44: Pojavnost posameznega respiratornega patogena v vzorcih pljuč govedi iz skupine P (N = 89) glede na tip reje (v %)

Figure 44: Prevalence of individual respiratory pathogens in lung samples of cattle from the P-group (N=89) according to the type of breeding (in %)

Pri 98 govedih iz skupine P, pri katerih smo opravili RT-qPCR in qPCR in gojiščno bakteriološko preiskavo, smo najpogosteje ugotovili 3 respiratorne patogene na žival, v povprečju 2,7 respiratornega patogena na žival.

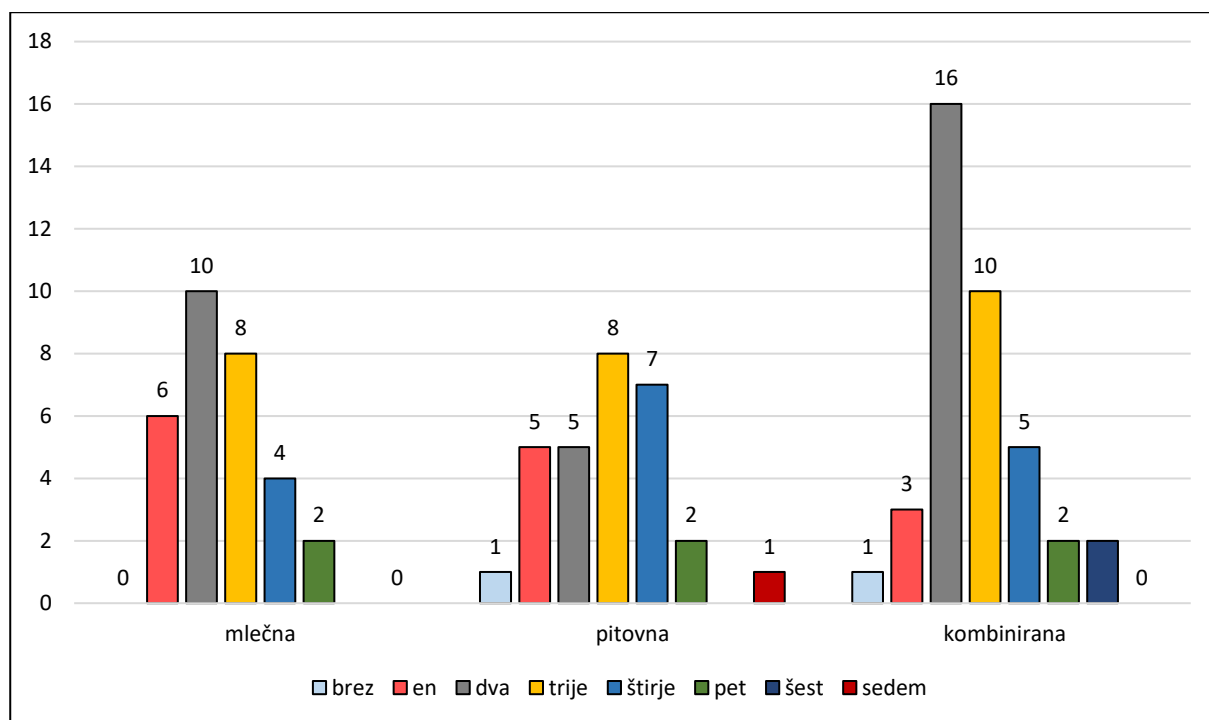
V vzorcih pljuč govedi iz skupine P in mlečnih rej smo najpogosteje ugotovili po dva respiratorna patogene na žival, v povprečju 2,5 respiratornega patogena na žival.

V vzorcih pljuč govedi iz skupine P in pitovnih rej smo najpogosteje ugotovili po tri patogene na žival, v povprečju 2,9 respiratornega patogena.

V vzorcih pljuč govedi iz skupine P in kombiniranih rej smo najpogosteje ugotovili po dva patogene na žival, v povprečju 2,7 na žival.

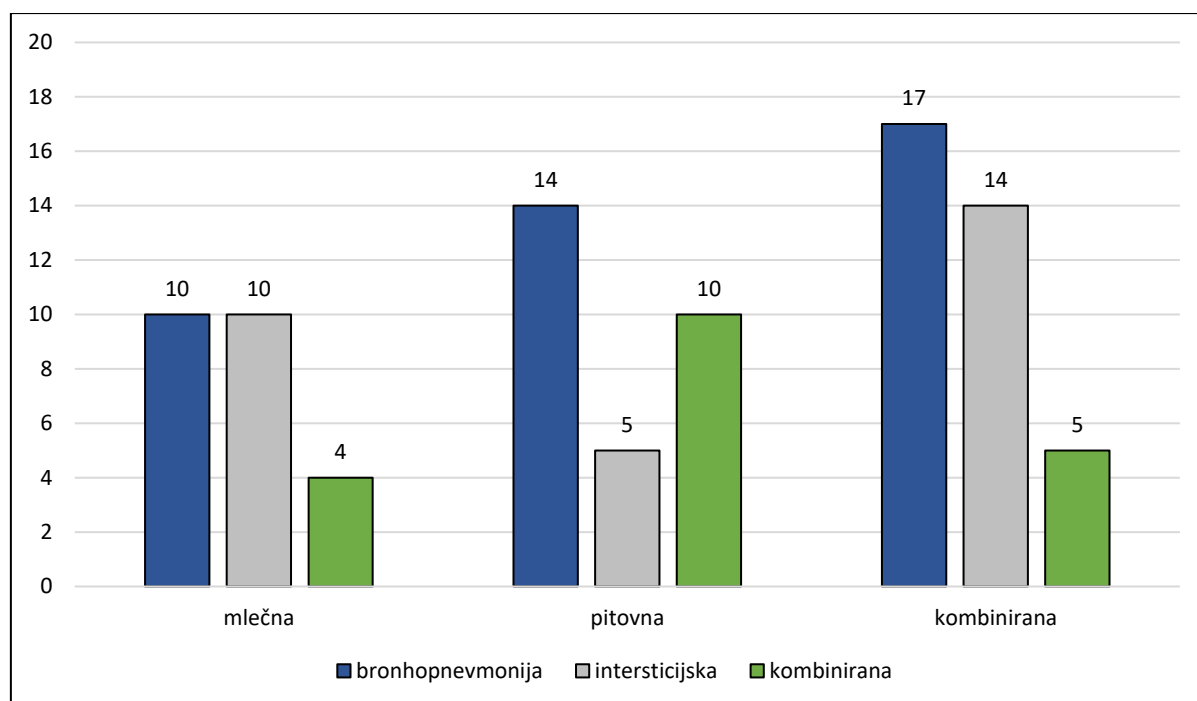
Največje število različnih patogenov, ki smo ga ugotovili pri eni živali, je bilo 7; žival je bila iz pitovne reje.

Razlike v številu ugotovljenih respiratornih patogenov v vzorcih pljuč govedi iz skupine P in mlečnih ter pitovnih rej niso statistično značilne ($p = 0,6601$).



Slika 45: Število govedi iz skupine P z istim številom patogenov v posamezni vrsti reje, ugotovljenih z RT-qPCR in s qPCR in/ali z gojiščno bakteriološko preiskavo pri govedih iz skupine P (N = 98)

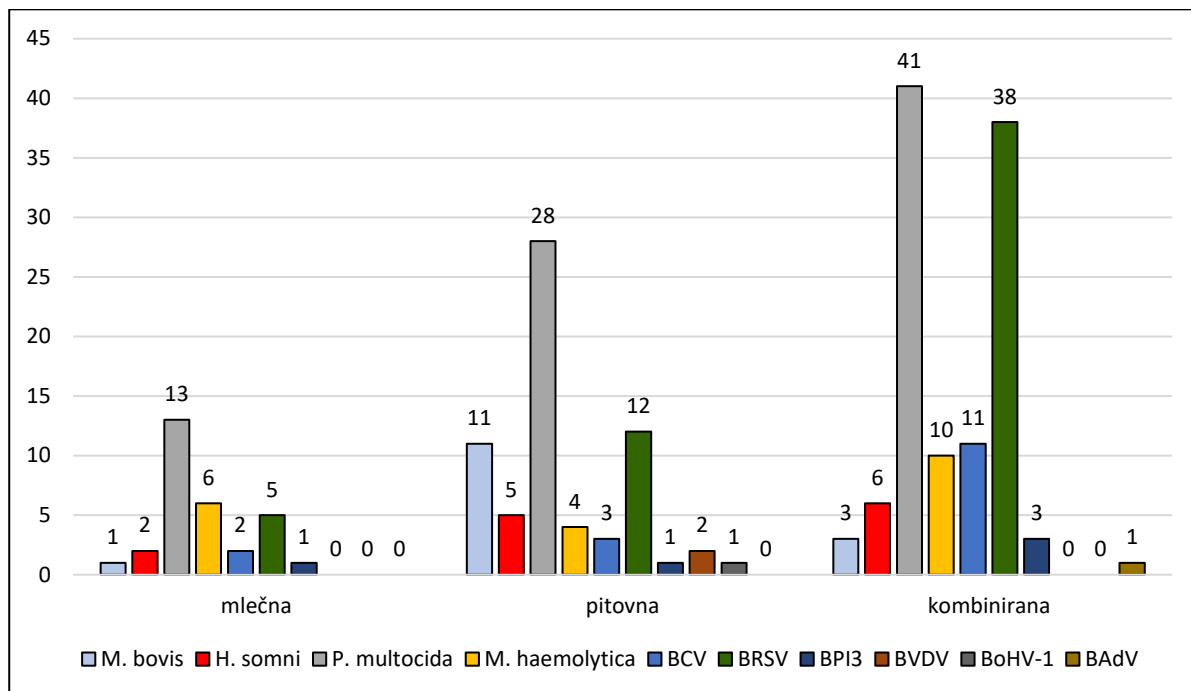
Figure 45: The number of cattle from the P-group with the same number of pathogens in the individual form of breeding, examined with the RT-qPCR and qPCR methods and/or cultural bacteriological examination of the cattle from the P-group (N = 89)



Slika 46: Frekvenca pojavljanja posamezne skupine pljučnic pri govedih iz skupine P glede na tip reje

Figure 46: The frequency of occurrence of individual type of pneumonia in cattle of the P-group according to the form of breeding

Pri testiranju povezav med tremi skupinami pljučnic in posamezno vrsto reje smo v mlečnih rejah manj pogosto ugotovili bronhopnevmonijo kot v pitovnih rejah. Razlika v pogostosti pojavljanja ni bila statistično značilna. V mlečnih rejah govedi smo pogosteje ugotovili intersticijsko pljučnico kot v pitovnih rejah, razlika v pogostosti pojavljanja pa je bila statistično značilna ($p = 0,04942$).



Slika 47: Pojavnost posameznega respiratornega patogena, ugotovljenega z RT-qPCR in s qPCR v nosnem brisu govedi iz skupine Ž (N = 137) glede na tip reje

Figure 47: Prevalence of individual respiratory pathogen found with the RT-qPCR and qPCR methods in nasal swabs of the cattle from the Ž-group (N = 137) according to the type of breeding

Pri 137 govedih iz skupine Ž, pri katerih smo opravili RT-qPCR in qPCR, smo najpogosteje ugotovili dva respiratorna patogena na žival, v povprečju 1,5 respiratornega patogena na žival.

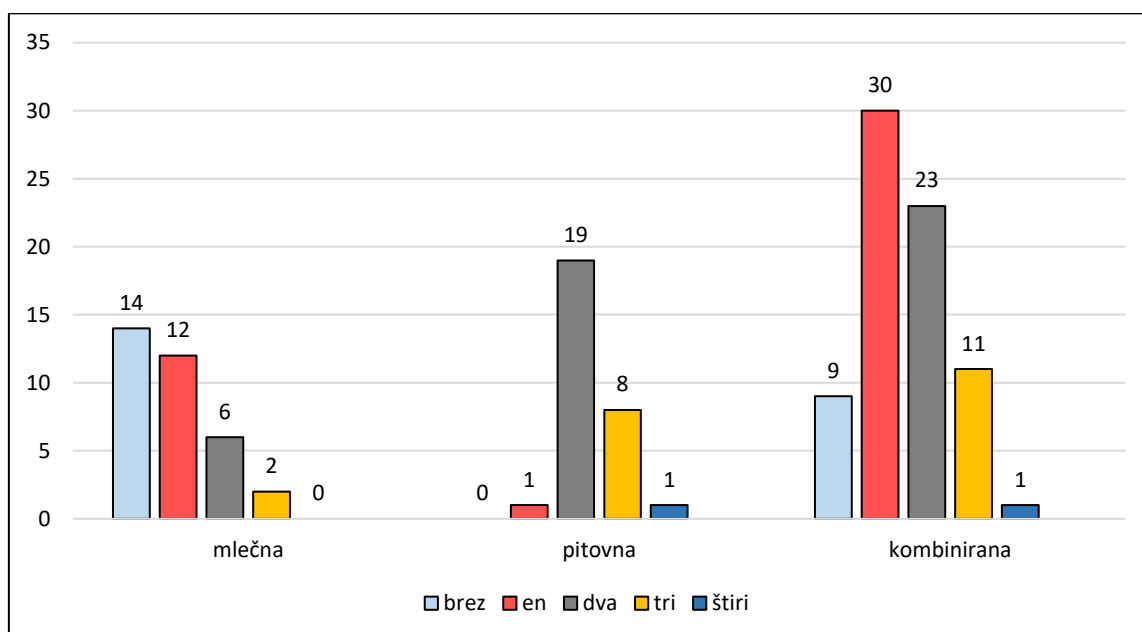
V nosnih brisih govedi iz skupine Ž in mlečnih rej smo najpogosteje ugotovili po en respiratorni patogen na žival, v povprečju 0,9 respiratornega patogena na žival.

V nosnih brisih govedi iz skupine P in pitovnih rej smo najpogosteje ugotovili po dva respiratorna patogena na žival, v povprečju 2,3 respiratornega patogena na žival.

V nosnih brisih govedi iz skupine P in kombiniranih rej smo najpogosteje ugotovili po en patogen na žival, v povprečju 1,5 respiratornega patogena na žival.

Največje število različnih patogenov, ki smo jih ugotovili pri istem govedu iz skupine Ž, je bilo štiri.

Razlike v številu ugotovljenih respiratornih patogenov v nosnih brisih govedi iz skupine Ž in mlečnih ter pitovnih rej so bile statistično značilne ($p = 0,00365$).



Slika 48: Število govedi z istim številom patogenov v posamezni vrsti reje, ugotovljenih z RT-qPCR in s qPCR pri govedih iz skupine Ž (N = 137)

Figure 48: The number of cattle with the same number of pathogens at individual type of breeding, detected with the RT-qPCR and qPCR methods in cattle from the Ž-group (N = 137)

Statistično testiranje razlik med obema vrstama reje smo izvedli s testom deležev za dva vzorca med pitovnimi in mlečnimi rejami, pri čemer nismo ugotovili statistično značilnih razlik.

Rezultati statističnega testiranja so v tabeli 20.

Tabela 20: Rezultati statističnega testiranja povezav med posameznimi spremenljivkami

Table 20: The results of statistical testing of links between the individual variables

Spremenljivka	Vrsta statističnega testa		
	Hi-kvadrat	Fisherjev test	Test deležev za dva vzorca (mlečne : pitovne)
Bronhopnevmonija	0,8766		0,6304
Intersticijska	0,09728	0,09946	0,04942**
Kombinirana	0,1061		0,1431
<i>M. bovis</i>	0,02348	0,02043	0,00675
<i>H. somni</i>	0,4503		0,2101
<i>P. multocida</i>	0,3624	0,3704	0,7748
<i>M. haemolytica</i>	0,1195	0,1242	0,3444
BCV	0,2950	0,3343	0,1358
BRSV	0,8512		0,6798
BPI3	0,9116	1,0	0,6686
BVDV	0,6503	0,679	0,5323
BoHV-1	0,3513	0,5955	0,3584
BAdV	0,3262	0,3831	0,1695
<i>T. pyogenes</i>	0,2233		0,09065*
<i>Streptococcus spp.</i>	0,2953	0,454	0,3584
Preostale bakterije	0,1282	0,1685	0,05846
Skupaj	0,4176		0,8145
Bakterijski patogeni	0,3448	0,3629	0,4293
Virusni patogeni	0,6610		0,6274

Pri statističnem testiranju povezav med respiratornimi patogeni in posameznimi vrstami reje je le mejno statistično značilna povezava med bakterijo *T. pyogenes* in vrsto reje.

4.8.4 Primerjava IHC in RT-qPCR in qPCR ugotavljanja respiratornih patogenov

Primerjavo med rezultati IHC in RT-qPCR ter qPCR za diagnostiko respiratornih patogenov smo opravili na podlagi primerjave rezultatov obeh metod (tabela 21). Pri tem smo upoštevali, da RT-qPCR in qPCR predstavljata zlati standard.

Tabela 21: Primerjava rezultatov med IHC in RT-qPCR ter qPCR pri ugotavljanju respiratornih patogenov iz vzorcev pljuč govedi iz skupine P

Table 21: Comparison of the results between the RT-qPCR, qPCR and IHC at detection of the respiratory pathogens from lung samples of cattle from the P-group

	IHC+ PCR+	IHC+ PCR–	IHC– PCR+	IHC– PCR–
BRSV	8	15	24	54
PI3	5	9	2	82
BoHV-1	1	0	0	101
BAdV	8	19	9	60
BVDV	6	0	7	87

Legenda: + = pozitiven rezultat, – = negativen rezultat

Pri tem smo uporabili izračun koeficienta kappa po Cohenu. Izračunane vrednosti za posamezni respiratorni patogen so v tabeli 22.

Tabela 22: Statistična primerjava rezultatov IHC in RT-qPCR ter qPCR pri ugotavljanju respiratornih patogenov
Table 22: Statistical comparison of the results from the IHC, RT-qPCR and qPCR of detection of the respiratory pathogens

Primerjava IHC : RT-qPCR in qPCR			
Respiratorni patogen	Koeficient Kappa	IHC občutljivost	IHC specifičnost
BRSV	0,29	0,25	0,78
BPI3	0,10	0,14	0,86
BAdV	0,36	0,47	0,76
BVDV	0,63	0,46	1,00

Legenda: * samo en pozitiven rezultat;

Pri tem je bila interpretacija vrednosti koeficienta kappa naslednja: $\leq 0,00$ – slabo ujemanje; 0,01–0,20 – rahlo ujemanje; 0,21–0,40 – zmerno ujemanje; 0,41–0,60 – dobro ujemanje; 0,61–0,80 – odlično ujemanje; 0,81–1 – skoraj popolno ujemanje.

Iz tabele je razvidno, da smo odlično ujemanje rezultatov ugotavljanja respiratornih patogenov z IHC in RT-qPCR ter s qPCR ugotovili samo pri BVDV. Pri BAdV in BRSV smo ugotovili zmerno ujemanje ter pri BPI3 rahlo ujemanje rezultatov. Pri BoHV-1 interpretacija ni bila možna, saj smo imeli samo en pozitiven vzorec.

5 RAZPRAVA

BRDC povzroča govedorejski proizvodnji po vsem svetu visoke ekonomske izgube. Njegova etiologija je kompleksna, saj pri izbruhu bolezni ali obolenja pogosto sodeluje več etioloških dejavnikov hkrati ali v sosledju. Diagnostika BRDC je zaradi tega zahtevna in terja veliko izkušenj ter širok nabor diagnostičnih orodij.

V raziskovanje problema nas je napeljala predvsem potreba po boljši diagnostiki BRDC. Zaradi pomanjkanja področnih izkušenj, nezadostne laboratorijske diagnostike in ponavljajočih se poginov govedi zaradi pljučnic je veliko primerov ostalo etiološko nerazjasnenih. Pomanjkanje izkušenj izhaja iz dejstva, da v Sloveniji že vsaj 30 let ni bilo opravljene celovitejše raziskave glede etiologije BRDC. V preteklosti, ko molekularnih metod še ni bilo na voljo, so raziskave potekale povečini samo na posameznem respiratornem patogenu pri govedu, diagnostika pa je temeljila na njihovi izolaciji na gojiščih in na serološki diagnostiki. Zaradi slabe rasti večine virusov na celičnih kulturah je bila težavna zlasti virološka diagnostika.

Začetki virološke diagnostike respiratornih patogenov pri govedu v Sloveniji segajo še v čas šestdesetih in sedemdesetih let prejšnjega stoletja. Usmerjene so bile v ugotavljanje prisotnosti posameznega virusnega povzročitelja. Pionir raziskovanja virusnih respiratornih patogenov pri govedu v Sloveniji je prof. dr. Zoran Železnik, ki se je že v šestdesetih letih prejšnjega stoletja ukvarjal z diagnostiko BPI3 in BoHV-1. V poznejših letih je opisal problematiko virusnih pljučnic v takratnih velikih govejih pitališčih (Železnik, 1965; Železnik, 1968; Železnik, 1972; Železnik, 1973).

Na začetku devetdesetih let prejšnjega stoletja so opravili več študij o prisotnosti BoHV-1 v naših rejah govedi (Hostnik in Železnik, 1992a; Hostnik in Železnik, 1992b, Hostnik in sod., 1995).

Prav tako je bila na začetku devetdesetih let pri slovenskih govedih prvič dokazana prisotnost protiteles proti BRSV (Hostnik in sod., 1990). Kmalu je sledila prva izolacija BRSV pri nas, kar je uspelo prof. dr. Petru Hostniku leta 1992 (Hostnik, 1992).

Istočasno so bile obdelane virusne pljučnice pri mladem pitovnem govedu na Dravsko-Ptujskem polju, njihova diagnostika je temeljila na serologiji (Pevec, 1993).

V prvi dekadi 21. stoletja so opravili številne študije prisotnosti virusa BVD v slovenskih rejah govedi (Toplak in sod., 2001; Toplak in sod., 2002; Toplak in sod., 2004; Toplak, 2004).

Kljub intenzivnemu delu slovenskih virologov in dejstvu, da je bila adenovirusna bronhopnevmonija pri teletih opisana že v šestdesetih letih prejšnjega stoletja in da so tudi v nam bližnjih vzhodnih državah, zlasti na Madžarskem, opravili številne študije o teh virusih (Rusvai in sod., 1993; Rusvai in Fodor, 1998; Graham in sod., 2005), smo našli le en zapis o serološkem ugotavljanju protiteles proti BAdV v Sloveniji (Železnik, 1979).

Zaradi navedenega smo se odločili, da se bomo diagnostike BRDC lotili tako s klasičnimi kot tudi z molekularnimi metodami ugotavljanja povzročiteljev BRDC. Zanimalo nas je, kateri respiratorni patogeni so prisotni pri boleznih dihal v slovenskih rejah govedi, kakšna je njihova pojavnost in kakšne patomorfološke spremembe povzročajo na pljučih govedi.

Našo raziskavo smo načrtovali v dveh delih. V prvi del raziskave smo vključili poginula goveda ne glede na spol in provenienco, pri katerih smo z raztelesbo ugotovili pljučnico. Vstopna točka raziskave je bila raztelesba, kriterij za vključitev vanjo pa makroskopsko diagnosticirana pljučnica. Za raztelesbo smo odbirali goveda, stara od 1 meseca do dveh let, za katera smo iz anamneze izvedeli, da naj bi imela pljučnico. Če smo pri raztelesbi ugotovili pljučnico, smo žival vključili v raziskavo, če pa pljučnice nismo ugotovili, smo kadaver v celoti patoanatomsko pregledali, nato pa dali v neškodljivo uničenje. Anamneze pogosto nismo poznali, zato smo raztelesali tudi naključno izbrana poginula goveda, stara od 1 meseca do dveh let, in s trupli ravnali enako kot s tistimi, ki smo jih prejeli z anamnezo.

Na podlagi navedenih kriterijev smo v prvi del raziskave vključili 116 poginulih govedi (skupina P). Goveda iz skupine P so izvirala iz 79 kmetijskih gospodarstev osrednje Slovenije, Gorenjske, Dolenjske, Štajerske in Primorske, zato menimo, da je bila zastopanost različnih slovenskih regij dovolj dobra.

Pri govedih iz skupine P smo najprej opisali patološke spremembe na pljučih. Nato smo njihovo etiologijo raziskali z imunohistokemično preiskavo, s klasično gojiščno bakteriološko preiskavo in z molekularnimi diagnostičnimi metodami ugotavljanja respiratornih patogenov. Za primerjavo smo oblikovali primerjalno skupino Pk, v katero smo vključili 16 poginulih govedi iz 16 kmetijskih gospodarstev, pri katerih z raztelesbo nismo ugotovili pljučnice.

V drugem delu raziskave smo zaradi dejstva, da BRDC pri večini obolelih živali ne povzroči pogina, njegovo etiologijo morali raziskati še pri živih, klinično bolnih govedih (skupina Ž). V ta del raziskave je bilo vključenih 137 govedi iz 31 kmetijskih gospodarstev osrednje Slovenije, Gorenjske, Dolenjske, Štajerske, Primorske in Prekmurja.

Iz nosnih brisov vseh 137 govedi iz skupine Ž smo z molekularnimi metodami ugotavljali prisotnost 10 različnih respiratornih patogenov in opravili še IVCK. Na krvnih vzorcih 84 govedi iz skupine Ž smo opravili še serološko diagnostiko ugotavljanja protiteles proti 7 različnim respiratornim patogenom. Od rezultatov testiranja nosnih brisov govedi iz skupine Ž smo si obetali tudi nove izkušnje na področju klinične diagnostike respiratornih obolenj pri govedu. Želeli smo ugotoviti, ali je nosni bris, odvzet v akutni fazi bolezni, primeren vzorec za ugotavljanje respiratornih patogenov pri govedu z BRDC. Za primerjavo smo oblikovali primerjalno skupino Žk, v katero smo vključili 10 klinično zdravih govedi iz 3 različnih kmetijskih gospodarstev, ki v zadnjem letu niso kazala znakov respiratornega obolenja.

Starost govedi, vključenih v raziskavo, smo sprva omejili. Pri določitvi starostnega intervala smo se oprli na izkušnje iz preteklosti. Telet, ki so bila mlajša od 1 meseca, nismo vključevali v raziskavo, ker so v prvem mesecu njihovega življenja poglavitna obolenja prebavil, katerim se večkrat hitro pridruži patologija dihalnega sistema, a tega po našem mnenju ni mogoče pripisati BRDC. Zgornjo starostno mejo smo sprva določili pri dveh letih, saj smo menili, da goveda, starejša od dveh let, zelo redko zbolevajo za pljučnicami, ki bi bile posledica BRDC. Ker pa smo med samo raziskavo prejeli več kadavrov govedi, starejših od dveh let, ki so po besedah kliničnih veterinarjev poginila v izbruhih BRDC, se nam je zdelo nujno izpeljati

diagnostiko tudi pri teh govedih in jih vključiti v raziskavo, ugotovitve pri tej starostni skupini pa prikazati ločeno.

V literaturi smo našli zapise o podobnih, večinoma manj obsežnih študijah. V Kanadi je Booker s sodelavci (2008) patohistološko, mikrobiološko in imunohistokemično pregledal pljuča 90 pitovnih telet, ki so poginila za posledicami BRDC. Na Madžarskem je Szeredi s sodelavci (2010) patoanatomsko, patohistološko, imunohistokemično, bakteriološko in virološko (IVCK) opisal patološke spremembe na pljučih 48 telet in raziskal njihovo etiologijo. V Turčiji je Ceribasi s sodelavci (2014) opisal patomorfološke spremembe v pljučih 263 zaklanih govedi. Pri tem je poleg makroskopskih sprememb v pljučih opisal še patohistologijo, z IHC pa ugotavljal prisotnost štirih respiratornih patogenov v pljučnem tkivu. Na Irskem je Murray s sodelavci (2017) pri 136 teletih opisal patomorfološke spremembe v pljučih. Etiologijo teh je ugotavljal z gojiščno bakteriološko preiskavo, s parazitološko preiskavo, z IHC (3 respiratorne patogene) in z molekularno diagnostiko (9 respiratornih patogenov).

Številne so tudi študije o raziskovanju etiologije BRDC pri klinično bolnih govedih. Na Finskem je Härtel s sodelavci (2004) bakteriološko pregledal traheobronhialni izpirek 85 klinično bolnih telet. Pri 259 teletih je opravil serološko preiskavo na prisotnost protiteles proti petim respiratornim patogenom. V Belgiji je Pardon s sodelavci (2011) raziskal etiologijo 24 izbruhov BRDC v 15 govejih čredah. Pri 21 poginulih raztelešenih teletih je opisal patologijo na pljučih, iz vzorcev pljuč je z IVCK (BAdV, BPI3) in z molekularnimi metodami (BRSV, BVDV, BoHV-1) ugotavljal virusne respiratorne patogene. Pri 219 klinično bolnih govedih je v krvnem serumu ugotavljal protitelesa proti 9 respiratornim patogenom, iz nosno-žrelnih brisov pa je s klasično bakteriološko preiskavo ugotavljal bakterijske respiratorne patogene.

Od diagnostičnih metod za ugotavljanje respiratornih patogenov smo pred začetkom raziskave imeli vpeljana: klasično bakteriološko diagnostiko izolacije bakterij na gojiščih, klasično virološko diagnostiko IVCK ter serološke metode ugotavljanja protiteles proti posameznim povzročiteljem. Skromna je bila diagnostika mikoplazem, ki je temeljila le na gojiščni preiskavi. Bakterijo *H. somni* kot povzročitelja gnojnih procesov na pljučih in drugih organskih sistemih smo med rutinsko diagnostiko zelo redko izolirali, najverjetneje zato, ker je njena izolacija na gojiščih za bakterije dokaj težavna. Zelo malo smo vedeli tudi o pojavnosti BRSV, ki je v preteklosti bil sicer izoliran na celični kulturi v okviru ene doktorske naloge (Hostnik, 1992), še prej pa posredno dokazan z dokazom protiteles v serumu govedi (Hostnik in sod., 1990). Prav tako nismo imeli vpeljane molekularne diagnostike ugotavljanja genoma BoHV-1; njegova rutinska diagnostika je temeljila na IVCK in seroloških metodah. Pred začetkom raziskave nismo imeli nobenih podatkov o prisotnosti BAdV v Sloveniji, čeprav smo med raziskavo našli zapis o začetkih njihove serološke diagnostike pri teletih iz velikih pitališč govedi (Železnik, 1979).

V primerjavi s prej naštetimi pomanjkljivostmi pa je bila že v devetdesetih letih prejšnjega stoletja v rutinsko diagnostiko vpeljana molekularna diagnostika BVDV, ki je pogost spremljevalec, zaradi njegovega imunosupresivnega delovanja pa včasih celo vzrok za pojav BRDC.

Na podlagi podatkov iz literature in na podlagi navedenih dejstev smo se odločili, da bomo z molekularnimi metodami pri vsakem govedu, vključenem v raziskavo, ugotavljali 10 respiratornih patogenov: *M. bovis*, *H. somni*, *P. multocida*, *M. haemolytico*, BCoV, BRSV, BPI3, BoHV-1 in BAdV. Na vzorcih pljuč, odvzetih ob raztelesbi, smo opravili še klasično gojiščno bakteriološko preiskavo, s katero smo ugotavljali še druge bakterijske povzročitelje pljučnic pri govedu, ki niso bili zajeti v diagnostičnem setu za molekularno diagnostiko, npr. *T. pyogenes*.

Po našem vedenju je sicer to največje število hkrati ugotavljanih respiratornih patogenov v istem vzorcupri govedu.

Za primerjavo s sodobnimi molekularnimi metodami smo virusne povzročitelje ugotavljali tudi s klasičnim testom IVCK. Prisotnost BRSV, BPI3, BoHV-1, BAdV in BVDV ter bakterije *M. bovis* pa smo dokazovali tudi z IHC.

Pri govedih iz skupine Ž smo opravili še serološko diagnostiko ugotavljanja protiteles proti *M. bovis*, *M. haemolytici*, BRSV, BPI3, BVDV, BoHV-1 in BAdV.

S tem smo želeli ugotoviti uporabnost posamezne diagnostične metode pri ugotavljanju respiratornih patogenov za rutinsko diagnostiko BRDC.

Prost pretok ljudi in blaga znotraj Evropske unije (EU) je olajšal širjenje kužnih bolezni znotraj EU. Zaradi nezadostne domače vzreje slovenska pitališča govedi velik del telet nabavljajo v drugih državah EU, zlasti v Romuniji, Češki, Slovaški, na Madžarskem in v drugih državah. V pretežno pitovnih rejah govedi je izvor živali zelo heterogen, fluktuacija živali v čredi pa velika, zato se zdi možnost vnosa povzročiteljev BRDC večja kot pri mlečnih čredah govedi. S tega vidika nas je zanimalo, ali obstajajo razlike v prevalenci povzročiteljev BRDC pri govedih v pitovnih in v mlečnih rejah. Med samo raziskavo se je izkazalo, da precejšnji del slovenske govedoreje bazira na tradicionalnem kombiniranem načinu reje. Na teh kmetijskih gospodarstvih v osnovi redijo krave molznice, njihove potomce pa pitajo doma. Zato smo poleg skupin mesnega in mlečnega tipa reje oblikovali še skupino kombiniranega tipa reje.

V prvem delu raziskave smo pri govedih iz skupine P najprej opisali patomorfološke spremembe na pljučih. Na podlagi makroskopskega pregleda smo pri 52,6 % govedi ugotovili bronhopnevmonijo, pri 37,9 % intersticijsko in pri 1,7 % embolično pljučnico. Pri 7,8 % govedi smo ugotovili tako bronhopnevmonijo kot tudi intersticijsko pljučnico in spremembo označili kot kombinirano pljučnico.

Nadalje smo bronhopnevmonije razdelili na gnojne bronhopnevmonije in na fibrinozne bronhopnevmonije, intersticijske pljučnice pa na bronhointersticijske in intersticijske v ožjem pomenu besede. Skupino emboličnih in kombiniranih pljučnic smo pustili nespremenjeno.

Z raztelesbo smo pri govedu iz skupine P najpogosteje ugotovili gnojno bronhopnevmonijo (44,0 %). Druga najpogosteje ugotovljena pljučnica je bila bronhointersticijska pljučnica, ki smo jo ugotovili pri eni tretjini raztelesenih govedi (32,8 %). Fibrinozno bronhopnevmonijo smo ugotovili pri 7,8 % raztelesenih govedi iz skupine P. Pri raztelesbi smo ocenili, da je intersticijsko pljučnico imelo 5,2 % govedi, embolično pljučnico pa le 1,7 % govedi iz skupine

P. Pri 8,6 % govedi iz skupine P smo ocenili, da je ugotovljena pljučnica kombinacija gnojne bronhopnevmonije in drugih vrst pljučnic.

Makroskopska diagnostika gnojne bronhopnevmonije je načeloma preprosta, saj ima ta pljučnica dokaj značilno distribucijo patoloških sprememb, njena glavna značilnost pa je prisotnost gnojnega eksudata v bronhih in alveolah, ki ga je pri raztelesbi težko prezreti.

Še lažja je makroskopska prepoznavna fibrinozne bronhopnevmonije. Ta lahko zajame večje predele pljuč, lahko pa so spremenjeni le manjši deli pljučnih režnjev. Pogosto je nad pnevmonično spremenjenimi deli pljuč na popljučnici prisotna akutna vnetna reakcija, spremenjeni deli pljuč pa so pokriti s krpami fibrina. V alveolah prevladuje fibrin, zaradi česar so pljuča zelo težka in povečana. Zaradi tromboziranih mezigovnic in krvnih žil so posamezni deli nekrotični, interlobularni intersticij pa je zaradi tega razširjen, kar mu daje marmoriran videz. V prsni votlini je pogosto nekaj litrov tekočega eksudata.

Eksudat je tisti vnetni element, ki nam je pri makroskopski diagnostiki pljučnic zelo pomagal. Težave pri njegovem prepoznavanju imamo lahko v začetnih fazah nastajanja bronhopnevmonije, ko tekočina v bronhih še nima vseh značilnosti eksudata, pač pa makroskopsko spominja na transudat.

Drugače je pri intersticijskih pljučnicah, kjer se patološki procesi dogajajo na mikroskopski ravni v steni alveol. Morda je diagnostika lažja pri kroničnih intersticijskih pljučnicah, pri katerih je v alveolarnih stenah pljuč že prisotno vezivo. Taka pljuča so mesnate konsistence in sivkaste barve. Pri makroskopskem prepoznavanju intersticijske pljučnice nam pomaga odsotnost eksudata v bronhih in bronhiolah ter difuzna razporeditev patoloških sprememb.

Nekoliko več izkušenj zahteva makroskopsko prepoznavanje bronhointersticijske pljučnice. V začetni fazi ima kranioventralno distribucijo, spremenjeni deli pljuč pa so nekoliko bolj polnokrvni od preostalih delov in mesnate konsistence. Če gre za povsem akutno obliko, v bronhih najdemo zgolj majhne količine eksudata. Se pa bronhointersticijska pljučnica pogosto komplicira z gnojno bronhopnevmonijo, kar nam oteži njeno prepoznavanje. V teh primerih lahko najdemo značilnosti bronhointersticijske pljučnice na kavalnejših delih pljuč, ki še niso zajeti z gnojnimi procesi.

Prepoznavanje embolične pljučnice je dokaj enostavno, saj ima ponavadi multifokalno razporeditev dobro omejenih pnevmoničnih sprememb velikosti od nekaj mm do nekaj cm, pri čemer je barva pnevmoničnih sprememb odvisna od starosti pnevmoničnega procesa in bakterij, ki so spremembe povzročile. Akutni procesi so temno rdeče barve, čez nekaj dni imajo lahko že gnojen značaj. Če so prisotne gnilobne bakterije, so pnevmonična žarišča zelene do rjave barve, pogosto je v obliki mehurčkov prisoten plin.

Pri razporeditvi pnevmoničnih sprememb smo skladno s podatki iz literature (Panciera in Confer, 2010) ugotovili, da je gnojna bronhopnevmonija najpogosteje locirana v kranialnih pljučnih režnjih, pa tudi v medialnem pljučnem režnju. Podobno distribucijo sprememb sta imeli tudi fibrinozna bronhopnevmonija in bronhointersticijska pljučnica. Patološke

spremembe dveh primerov embolične pljučnice so bile približno enakomerno razporejene po vseh pljučnih režnjih, kar je opisano tudi v literaturi (Panciera in Confer, 2010).

Čeprav smo v literaturi zasledili, da ni povsem jasno, kaj vse vpliva na distribucijo pnevmoničnih sprememb v pljučih, sta po našem mnenju za njihovo razporeditev ključna vrsta povzročitelja patoloških sprememb in njegov način širjenja po pljučih. Pri bakterijskih gnojnih bronhopnevmonijah, pri katerih se povzročitelj in s tem tudi patološki proces po pljučih širita endobronhialno, povzročitelj najprej naseli sluznice zgornjih dihal, nato se proces širi ascendentno po bronhialnem drevesu v pljuča. Pri bakterijskih bronhopnevmonijah, ki veljajo za hude oblike pljučnic, ni nikoli zajeto celotno pljučno tkivo, saj že pred tem pride do pogina živali.

Hematogeno širjenje bakterijskih povzročiteljev pljučnic je pri živalih redko, srečamo ga pri emboličnih pljučnicah. Pri teh je distribucija pnevmoničnih sprememb značilno enakomerno multifokalna, saj gre za metastatsko širjenje povzročitelja vnetnega procesa s krvjo, ki naenkrat doseže vse pljučne režnje, se v arterijskem krvotoku ustavi v obliki embolusov in tu povzroči enake fokalne patološke spremembe kot na mestu izvora.

M. haemolytica se kot respiratorni patogen najprej širi aerogeno po sapniku in bronhih. Ko se v pljučnem tkivu namnoži, se po njem širi tudi limfogeno in hematogeno. V teh primerih lahko nekroza naenkrat zajame večje dele posameznega pljučnega režnja ali celotni pljučni reženj, kar je značilno za fibrinozno bronhopnevmonijo (Jensen in sod., 1976; Schiefer in sod., 1978; Panciera in Confer, 2010).

Povzročitelji intersticijskih pljučnic pri govedu so večinoma virusi, ki se lahko širijo aerogeno ali hematogeno. V prvem primeru zaradi svoje majhnosti večinoma uidejo mukociliarnemu aparatu bronhijev in bronholov ali pa ga sami oslabijo. Pri tem lahko poškodujejo alveolarne celice. Pri hematogenem širjenju pa povzročijo poškodbe endotelija kapilar in/ali bazalne membrane alveol, pri čemer so patološke spremembe zaradi načina širjenja približno enakomerno razporejene po celotnih pljučih (Lopez, 2011).

Bronhointersticijska pljučnica ima v svoji prvi fazi vse značilnosti bronhopnevmonije, saj se prve spremembe pojavijo na bronhialnem in bronhiolarnem epiteliju kranialnih delov pljuč. Pozneje se proces širi tudi na kavalnejše dele pljuč in ima v subakutni fazi vse značilnosti intersticijske pljučnice.

Poznavanje distribucije pnevmoničnih sprememb pri posamezni vrsti pljučnice nam pri patoanatomski diagnostiki pljučnic zelo pomaga, saj lahko na njihovi podlagi celo sklepamo o etiologiji pnevmoničnega procesa.

Patohistološka preiskava je pri diagnostiki pljučnic obvezna. Pred začetkom raziskave smo se morali odločiti, na kakšen način in s katerih delov pljuč bomo jemali vzorce zanjo. Na podlagi predhodnih izkušenj in na podlagi podatkov iz literature smo vedeli, da je patološka slika pljučnic pri govedu zelo raznolika, zato smo za patohistološko preiskavo pri vsaki živali odvzeli tri vzorce pljučnega tkiva: po en vzorec kranialnega, medialnega in kavalnega pljučnega režnja. Pri odvzemu vzorcev smo stremeli za tem, da je vsak vzorec čim bolj reprezentativen

za svoj pljučni reženj. Včasih je bilo zaradi heterogenosti patoloških sprememb z odvzemom zgolj enega vzorca pljučnega režnja to težko doseči. Pri vzorčenju so patološko spremenjeni deli pljučnega tkiva imeli prednost pred nespremenjenimi. Akcesornega pljučnega režnja nismo vzorčili, saj smo menili, da se večina patoloških sprememb prej izrazi na preostalih pljučnih režnjih.

Patohistološko preiskavo pljuč smo opravili pri 113 govedih iz skupine P. V vzorcih kranialnega pljučnega režnja smo najpogosteje ugotovili obliterirajoči bronhiolitis (41,6 %), gnojno bronhopnevmonijo (30,1 %), kronični bronhitis (27,4 %), bronhiolarno nekrozo (24,8 %) in bronhointersticijsko pljučnico (21,2 %). Tudi v vzorcih medialnega pljučnega režnja smo najpogosteje ugotovili obliterirajoči bronhiolitis (44,2 %) in gnojno bronhopnevmonijo (36,3 %). Bronhointersticijsko pljučnico (27,4 %) pa smo ugotovili pogosteje kot v vzorcih kranialnega režnja (21,2 %), saj je zelo verjetno, da so jo tam prekrili napredujoči gnojni procesi, ki so jih povzročile sekundarne bakterije. V vzorcih kavdalnega pljučnega režnja smo najpogosteje ugotovili bronhointersticijsko pljučnico (27,4 %) in gnojno bronhopnevmonijo (24,8 %). Kronični bronhitis smo v vzorcih kranialnega pljučnega režnja ugotovili pri 27,7 % govedi, v vzorcih kavdalnega pljučnega režnja pa le pri 2,7 %.

Bronhiolarno nekrozo, kot posledico škodljivega delovanja etioloških dejavnikov na epitelij bronhiolov, smo pogosteje ugotovili v vzorcih kranialnih pljučnih režnjev (24,8 %) kot v vzorcih medialnega pljučnega režnja (22,1 %) in kavdalnih pljučnih režnjev (20,4 %). Bronhiolarni epitelij je zelo občutljiv na škodljivo delovanje nekaterih noks, še posebej virusov (npr. BRSV, BPI3, BAdV), pa tudi oksidativnih plinov (npr. NO₂, SO₂) in toksičnih substanc (npr. 3-metilindol, paraquat). V vzorcih kavdalnih pljučnih režnjev smo pogosteje kot v kranialnem in medialnem pljučnem režnju ugotovili intersticijsko pljučnico (15,9 %) in emfizem (20,4 %). Slednji ni vnetna sprememba, je pa pogost spremljevalec bronhointersticijske pljučnice in kroničnih vnetnih procesov v bronhih in/ali bronhiolih. Pri obeh patoloških stanjih namreč pride do njihovega zoženja (krčenje, obturacija, obliteracija) in posledično do motenj pri ekspiraciji zraka iz pljuč.

Razlike v pogostnosti posameznih patoloških procesov na različnih pljučnih režnjih so bile statistično značilne pri obliterirajočem bronhiolitisu ($p = 0,0109$), kroničnem bronhitisu ($p = 0,0000019$) in pljučnem emfizemu ($p = 0,0042$).

Razlike v pogostnosti posameznih patoloških procesov na različnih pljučnih režnjih niso bile statistično značilne pri gnojni bronhopnevmoniji ($p = 0,1701$), bronhiolarni nekrozi ($p = 0,7245$) in bronhointersticijski pljučnici ($p = 0,4660$).

Po opravljeni patohistološki preiskavi smo postavili končno diagnozo pnevmoničnih procesov v pljučih govedi iz skupine P. Najpogosteje diagnosticirana vrsta pljučnice pri govedu iz skupine P je bila gnojna bronhopnevmonija (28,3 %). Po opravljeni patohistološki preiskavi se je v primerjavi z raztelesbo njen delež sicer zelo znižal (iz 44,0 % na 28,3 %), največ na račun kombiniranih pljučnic. Druga najpogosteje ugotovljena vrsta pljučnice je bila bronhointersticijska pljučnica (26,5 %), katere delež se je od raztelesbenih 32,8 % znižal na 26,5 %. Fibrinozno bronhopnevmonijo smo s patohistološko preiskavo ugotovili pri 13,3 %

govedi, kar je precejšnje povečanje deleža (iz 7,8 % na 13,3 %). Intersticijsko pljučnico smo ugotovili pri 5,3 % govedi, tako z raztelesbo kot tudi s patohistološko preiskavo. Zaradi večje natančnosti patohistološke preiskave pri diferenciranju vnetnih sprememb v primerjavi z raztelesbo se je delež kombiniranih pljučnic zvišal z 8,6 % na 24,8 %.

Kljub natančnosti patohistološke preiskave končna presoja vrste pljučnic brez upoštevanja rezultatov raztelesbe ni nujno zanesljiva. Brez raztelesbene slike nam manjkata predstavi o morebitni heterogenosti pnevmoničnih sprememb in njihovem obsegu. Težava so lahko tudi fokalne pnevmonične spremembe, ki se lahko bistveno razlikujejo od drugih difuznih in jih je včasih težko vzorčiti, saj lahko nekatere (npr. abscesi in bronhiektazije) po obsegu presegajo velikost samega vzorca, zaradi česar jih s patohistološko preiskavo ni mogoče relevantno oceniti. Pri patohistološki preiskavi namreč pregledujemo le nekaj posameznih kvadratnih centimetrov tkiva, na podlagi katerih ni mogoče sklepati o obsežnosti patoloških sprememb, kar je pogosto ključno pri presoji vrste pljučnic.

O deležu posameznega tipa pljučnice drugi avtorji poročajo zelo različno. Tegtmeier je s sodelavci (1999) opisal patomorfološke spremembe na pljučih 72 telet iz 68 različnih danskih čred. Klasifikacijo ugotovljenih sprememb je opravil na podlagi patoanatomske in patohistološke preiskave. Podobno kot mi je pri 50 % telet ugotovil gnojno bronhopnevmonijo, v zelo visokem odstotku poginulih telet (43 %) fibrinozno-nekrotično pljučnico in pri 5,6 % telet embolično pljučnico. V enem primeru (1,4 %) je ugotovil mikotično pljučnico.

Fulton s sodelavci (2009) je v vzorcih pljuč 214 govedi, ki so poginile za posledicami BRDC, opisal patologijo in raziskal etiologijo pljučnic. Raziskava je temeljila na patohistološki preiskavi prejetih vzorcev, pri čemer je ocenil, da je približno 27 % govedi poginilo za posledicami lobarne bronhopnevmonije brez plevritisa, približno 49 % govedi za posledicami lobarne bronhopnevmonije s plevritisom, približno 5 % govedi naj bi poginilo za posledicami intersticijske pljučnice, 1,4 % pa za posledicami bronhointersticijske pljučnice. Pnevmonične spremembe, ki so bile posledica septičnih in emboličnih procesov, je ugotovil pri 1,4 % poginulih govedi. Klasifikacija pljučnic, ki so jo uporabili pri raziskavi, je danes zastarela. Termin lobarne pnevmonije je prevzet iz humane medicine, kjer se pri tej vrsti pljučnice okužba širi hematogeno. Pri tem je zajet del pljučnega režnja ali celoten pljučni režanj, patološka slika pa je zaradi hematogenega širjenja okužbe uniformna v vseh prizadetih delih pljuč. Preseneča nizek odstotek ugotovljene bronhointersticijske pljučnice. Delež intersticijske pljučnice pa je zelo podoben našemu.

Szeredi s sodelavci (2010) je patomorfološko in mikrobiološko pregledal pljuča 48 poginulih telet in mladih govedi iz 27 različnih madžarskih čred, ki so pred poginom kazala znake pljučnic. Pljučnico je ugotovil pri 87,5 % govedi. Pri tem je opisal obsežnost patoanatomskih sprememb, klasifikacijo pa izdelal po opravljeni patohistološki preiskavi. Tako je pri 17 % govedi opisal gnojno bronhopnevmonijo, pri 21 % bronhointersticijsko pljučnico, pri 36 % fibrinonekrotično pljučnico in pri 11 % intersticijsko pljučnico. Pri 15 % govedi je ugotovil kombinacijo fibrinozne in gnojne pljučnice (Szeredi in sod., 2010).

Murray je s sodelavci (2017) s patomorfološkimi, z bakteriološkimi, molekularnimi in imunohistokemičnimi metodami preiskal vzorce pljuč 136 poginulih govedi, starih od 6 do 12 mesecev, na Irskem. Najpogosteje so ugotovili fibrinozno-gnojno bronhopnevmonijo (49 %) in intersticijsko pljučnico (48 %).

Ugotovitve tujih avtorjev glede pogostnosti pojava gnojne bronhopnevmonije pri BRDC so primerljive z našimi, ni pa tega mogoče trditi za pogostnost fibrinozne bronhopnevmonije.

V ugotovitvah Tegtmeierja s sodelavci (1999) manjka delež poginov zaradi bronhointersticijske pljučnice, ki jo je najverjetneje štel med intersticijske. Delež poginov zaradi bronhointersticijske pljučnice, ki jih je ugotovil Fulton s sodelavci (2009), je izrazito nizek (1,4 %). Zanimivo je, da so med seboj zelo primerljivi deleži intersticijskega tipa pljučnice, ki se gibljejo okrog 5 %. Morda je vzrok v relativni uniformnosti patohistoloških sprememb in posledično bolj enotni klasifikaciji te vrste pljučnice.

Na splošno lahko rečemo, da so rezultati različnih avtorjev glede vrste ugotovljenih pljučnic zelo težko primerljivi med seboj, saj so uporabljene klasifikacije pljučnic zelo različne.

Deleži fibrinozne bronhopnevmonije, ki so jih ugotovili drugi avtorji, so mnogo višji od našega. Razlika med ugotovljenimi deleži je najverjetneje posledica dejstva, da se ta vrsta pljučnice najpogosteje razvije po transportu in združevanju živali v velikih pitališčih govedi, ki pa jih je v Sloveniji malo.

Po zgledu tujih avtorjev (Szeredi in sod., 2010; Fulton in sod., 2009; Booker in sod., 2009; Radaelli in sod., 2008) smo na vzorcih pljuč govedi iz skupine P opravili IHC. To smo opravili na prisotnost šestih respiratornih patogenov. Med bakterijskimi povzročitelji smo se odločili samo za *M. bovis*. V primerjavi s preostalimi bakterijskimi povzročitelji pljučnic pri govedu, za katere imamo dobro vpeljano klasično gojiščno bakteriološko diagnostiko, je izolacija mikoplazem načeloma težavnejša, posledica tega pa je pomanjkanje diagnostičnih izkušenj. Poleg tega gre za enega najpomembnejših bakterijskih respiratornih patogenov.

Od virusnih respiratornih patogenov smo izbrali BRSV, BPI3, BoHV-1, BAdV in BVDV. Najbolj nas je zanimal BRSV, njegove prisotnosti pri našem govedu pred raziskavo nismo dokazovali, patomorfološke spremembe, ki smo jih ugotavljali, pa so kazale na to, da redno povzroča pogine v naših čredah govedi. Med virusi velja za najpomembnejši respiratorni patogen pri govedu.

BoHV-1 je kot povzročitelj IBR/IPV zelo pomemben, pri nas je redko prisoten, v posameznih državah EU je celo izkoreninjen. Na podlagi rezultatov molekularnih metod smo v raziskavi ugotovili en izbruh IBR/IPV v večjem pitališču govedi.

Kriteriji za preostale štiri virusne povzročitelje so bili drugačni. Po našem mnenju kot povzročitelji BRDC nimajo zelo velikega pomena, se pa v strokovni literaturi redno pojavljajo kot vzročni dejavniki BRDC.

Pri vsakem IHC testiranem govedu iz skupine P smo testirali samo vzorec kranialnega pljučnega režnja. Bronhopnevmonije pri govedu začnejo na kranialnih delih pljuč, s čimer je možnost dokaza iskanih povzročiteljev večja, kot če bi testirali vzorce npr. iz kavdalnih pljučnih

režnjev. Z izbiro kranialnega pljučnega režnja so bile hkrati zajete tudi spremembe, ki jih povzročajo virusni povzročitelji npr. pri intersticijskih pljučnicah, saj je pri teh razporeditev pnevmoničnih sprememb difuzna.

IHC reakcija na *M. bovis* je bila pozitivna pri 39,8 % vzorcev pljuč. Pozitivno reakcijo smo ugotovili predvsem v perifernem delu bronhiektatičnih sprememb, napolnjenih z gnojno nekrotičnim eksudatom, v epitelijskih celicah bronhov in bronhiolov, pa tudi v makrofagih in nevtrofilcih. Pri IHC na *M. bovis* je bilo obarvanje pozitivnega imunohistokemičnega kompleksa pogosto zelo izrazito, vendar je bila reakcija večkrat tudi nespecifična, saj smo zaznali obarvanje ozadja, npr. epitelnih celic žlezic v bronhialni sluznici in obarvanje hrustanca bronhov. Delež IHC pozitivnih je celo enkrat višji kot pri PCR (19,6 %), kar je po našem mnenju mogoče pripisati prav pojavljanju nespecifičnih reakcij in subjektivni oceni rezultatov. Podobne ugotovitve navaja Radaelli s sodelavci (2008), ki je opisal ugotavljanje bakterije *M. bovis* z različnimi diagnostičnimi metodami.

Antigen BRSV smo ugotovili pri slabi četrtini IHC pregledanih govedi iz skupine P (22,8 %). Na splošno so bile reakcije pri IHC preiskavi BRSV zelo šibke, zaradi česar je bilo tudi vrednotenje težavnejše. Po neuspešnih začetkih smo morali metodo optimizirati, povečati koncentracijo protiteles, ob tem pa še podaljšati čas inkubacije. Kljub temu so bila obarvanja imunskega kompleksa dokaj diskretna. Šibke pozitivne reakcije smo ugotovili v epitelijskih celicah bronhiolov, alveol in v posameznih alveolarnih makrofagih.

Podobne težave opisuje Sorden s sodelavci (2000), ki je BRSV dokazoval z IHC na vzorcih pljuč 28 poginulih govedi iz 5 različnih pitališč v zvezni državi Saskatchewan (ZDA). Opisal je makroskopske in mikroskopske spremembe na pljučih govedi, starih od 8 do 14 mesecev. Od 28 IHC pregledanih vzorcev pljuč govedi sta bila samo dva pozitivna na BRSV, čeprav so bile v vzorcih pljuč prisotne patohistološke spremembe, značilne za okužbo z BRSV. Dokazovanje nukleinskih kislin BRSV pa ni bilo opravljeno.

Ceribasi s sodelavci (2014) je opisal patologijo pljučnic pri 247 poginulih govedih v Turčiji. IHC pozitivnih na BRSV je bilo 9 vzorcev pljuč (3,64 %), kar se nam zdi zelo nizek delež pozitivnih vzorcev. Z direktnim IF testom vzorcev pljuč istih govedi je ugotovil višji delež pozitivnih vzorcev na BRSV (6,07 %), kar je še vedno zelo nizek delež. IHC pozitivno reakcijo je ugotovil v epitelijskih celicah bronhov, bronhiolov in alveol. Pozitivno reakcijo je podobno kot v naši raziskavi ugotovil tudi v posameznih alveolarnih makrofagih.

Yaman s sodelavci (2018) je proučil pnevmonične spremembe 100 govedi, ki so bile zaklane v klavnici. Vzorce je IHC pregledal na prisotnost BRSV in bakterije *P. multocida* ter bakterije *M. haemolytica*. Pozitivno reakcijo na BRSV je ugotovil v epitelijskih celicah bronhijev, bronhiolov in alveol. Poleg tega je pozitivno IHC reakcijo ugotovil v sincicijskih celicah, epiteliju bronhialnih žlezic in v alveolarnih makrofagih.

Ocenjujemo, da je vzrok za razliko med deležem pozitivnih rezultatov med IHC (22,8 %) in PCR (31,7 %) posledica šibkosti IHC reakcij na antigen BRSV in v subjektivnosti ocene IHC reakcij.

Med iskanimi virusnimi povzročitelji smo najpogosteje ugotovili antigen BAdV (28,1 %). Pozitivna IHC reakcija je bila vidna na epitelijskih celicah sluznice posameznih bronhov in bronhiolov, tudi če so te bile deskvamirane.

Pogosto smo zaznali pozitivno IHC reakcijo bronhialne in bronhiolarne sluzi, bronhialnega hrustanca in epitelijskih celic žlezic v steni samih bronhov, kar smo ovrednotili kot nespecifično IHC reakcijo. Delež pozitivnih rezultatov pri IHC (28,1 %) je bil višji od deleža pozitivnih rezultatov pri PCR (17,7 %), razliko pa ponovno pripisujemo nespecifičnim reakcijam in subjektivnosti ocene IHC reakcij.

IHC pozitivno reakcijo na antigen BPI3 smo ugotovili pri 14,3 % pregledanih vzorcev. Pozitivne IHC reakcije smo ugotovili na epitelijskih celicah bronhov in bronhiolov, ne pa tudi v alveolah. Podobno kot pri BAdV smo večkrat ugotovili obarvanja površine sluznice bronhov in bronhiolov in obarvanja epitelijskih celic žlezic, kar smo ocenili za nespecifično reakcijo.

Pri IHC za dokazovanje BVDV smo ugotovili pozitivno reakcijo v posameznih epitelijskih celicah bronhov in bronhiolov ter tudi v samih alveolarnih stenah. Distribucija pozitivnih IHC sprememb je bila v tem primeru multifokalna. Nespecifičnih reakcij obarvanja ozadja nismo zaznali. Delež IHC pozitivnih vzorcev na BVDV (6,0 %) je bil nižji kot pri PCR (13,0 %).

Kot zelo specifične smo ocenili IHC reakcije za dokazovanje BoHV-1, pri katerih je bilo obarvanje omejeno samo na lokacijo in strukture patoloških sprememb, v ozadju pa pozitivnega signala ni bilo zaznati. V obeh IHC pozitivnih vzorcih smo ugotovili jasno in močno obarvanje epitelijskih celic bronhov in bronhiolov ter v nekrotičnih celicah nekrotičnih žariščih pljučnega tkiva. Visoko specifičnost izkazuje tudi sam rezultat, saj sta bila od 103 testiranih vzorcev pljuč pozitivna samo vzorca dveh govedi iz skupine P, za katera smo tudi s PCR dokazali, da vsebujeta BoHV-1. Preostali vzorci so bili IHC negativni in v njih ni bilo zaznati nobenih značilnih reakcij. Visoko specifičnost IHC na BoHV-1 sta ugotovila tudi Szeredi s sodelavci (2010) in Ceribasi s sodelavci (2014).

Že pred začetkom raziskave smo se odločili, da bomo bakterijske povzročitelje BRDC ugotavljali s klasično gojiščno bakteriološko preiskavo. To smo opravili pri 107 raztelesenih govedih iz skupine P. Za bakteriološko preiskavo smo odvzeli vzorec patološko spremenjenega pljučnega tkiva; če so bile patomorfološke spremembe v posameznih delih pljuč bistveno različne, smo v bakteriološko preiskavo poslali dva vzorca pljuč (npr. akutno spremenjeno pljučno tkivo in kronični absces). Materiala smo nasadili na gojišča z dodatkom krvi (krvni agar) in na gojišče po Drigalskem. Plošče smo inkubirali pri aerobnih pogojih.

Od respiratornih patogenov smo najpogosteje ugotovili bakterijo *P. multocida* v četrtni vzorcev pljuč (25,2 %). V čisti kulturi smo jo izolirali pri 12,1 % govedi, v kombinaciji z bakterijo *T. pyogenes* pri 11,2 % ter v kombinaciji z bakterijo *M. haemolytica* še v dodatnih 1,9 % vzorcev pljuč.

Bakterijo *T. pyogenes* smo izolirali iz vzorcev pljuč 22,4 % bakteriološko pregledanih govedi. V čisti kulturi smo jo izolirali iz 9,3 % vzorcev pljuč govedi, v družbi z bakterijo *M. haemolytica* pa iz 1,9 % vzorcev pljuč.

Bakterijo *M. haemolytica* smo izolirali iz vzorcev pljuč 10,3 % govedi, v čisti kulturi pa iz 6,5 % vzorcev pljuč.

Na podlagi navedenega lahko rečemo, da je bila kar v 42,9 % bakteriološko pregledanih vzorcev izolirana vsaj ena od treh vrst bakterij, ki pri govedu povzročajo pljučnice.

Poleg prej navedenih treh vrst bakterij smo v 4,7 % vzorcev izolirali še različne vrste streptokokov. Preostali respiratorni patogeni (*Pseudomonas* sp., *Helicobacter* sp., *Actinobacillus* sp., *Klebsiella* sp.) so skupaj predstavljali 6,5 % izolatov.

Vzorčenje pljuč 115 govedi iz skupine P za molekularno diagnostiko povzročiteljev BRDC smo opravili ob raztelesbi. Odvzeli smo po en vzorec kranialnega, srednjega in kaudalnega pljučnega režnja in jih shranili v skupnem lončku kot enoten vzorec. Ob pripravi vzorca za izolacijo nukleinske kisline pa smo iz vsakega od treh koščkov pljuč odvzeli po en košček tkiva, s čimer smo dobili reprezentativni vzorec pljuč. Glede na to, da le pri štirih govedih iz skupine P v vzorcih pljuč nismo ugotovili nobenega od iskanih patogenov, ocenjujemo, da je bil izbrani način vzorčenja dober in da nam je omogočil realen vpogled v prisotnost respiratornih patogenov v pljučih.

Pred začetkom raziskave smo se s posameznimi povzročitelji srečevali vsakodnevno (npr. *P. multocida*, *M. haemolytica*, *T. pyogenes*, BVDV), o pojavnosti drugih povzročiteljev pri govedu pa nismo vedeli skoraj ničesar (npr. BRSV, BCV, BPI3, BAdV, *M. bovis*). Kljub temu smo predvidevali, da bomo vse izbrane povzročitelje dokazali, o njihovi prevalenci pa nismo poskusili niti ugibati. Z RT-qPCR in s qPCR smo dokazali vseh 10 proučevanih respiratornih patogenov, pri čemer smo ugotovili, da je pojavnost *P. multocida* 79,1 %, BRSV 33,0 %, *H. somni* 31,3 %, *M. haemolytica* 19,1 %, *M. bovis* 19,1 %, BAdV 15,7 %, BVDV 13,0 %, BCV 11,3 %, BPI3 6,1 % in BoHV1 1,7 %. Prisotnost bakterije *T. pyogenes* z molekularnimi metodami nismo ugotavljali, smo jo pa dokazali z gojiščno bakteriološko preiskavo. Bakterija je zrasla iz pljuč 22,4 % poginulih govedi.

Kanadski avtorji so z molekularnimi metodami pregledali vzorce pljuč 68 poginulih govedi. Najpogosteje ugotovljena bakterija v vzorcih pljuč je bila *M. haemolytica* (91 %). Delež bakterije *P. multocida* je bil izrazito nizek, saj so jo ugotovili v pljučih samo 13 % govedi. So pa ugotovili izrazito visok odstotek bakterij *H. somni* (57 %) in *M. bovis* (63 %). Pri virusnih respiratornih patogenih so najpogosteje ugotovili BVDV (69 %), BRSV pri 19 % govedi in BPI3 pri 13 % poginulih govedi. BoHV-1 niso ugotovili niti v enem primeru (Klima in sod., 2014).

Fulton s sodelavci (2009) je proučil vzorce pljuč 194 govedi, ki so poginile zaradi pljučnice. Z molekularno diagnostiko je BRSV ugotovil le pri 4,6 % govedi, kar je bistveno manj kot v našem primeru. BCV je ugotovil v vzorcih pljuč 10,8 % govedi, kar je praktično enak delež kot smo ga ugotovili v našem primeru (Fulton in sod., 2009).

Kljub intenzivnemu delu slovenskih virologov v preteklosti in dejstvu, da je bila adenovirusna bronhopnevmonija pri teletih opisana že v šestdesetih letih prejšnjega stoletja ter da so bile v nam bližnji Madžarski opravljene številne študije o teh virusih (Rusvai in sod., 1993; Rusvai in

Fodor, 1998), pred raziskavo o dokazu BAdV v Sloveniji nismo našli zapisov. Med samo raziskavo smo našli en zapis o začetkih serološke diagnostike BAdV pri slovenskem govedu iz velikih pitališč (Železnik, 1979). Po našem vedenju je dokaz nukleinske kisline BAdV, ki smo ga ugotovili v vzorcih pljuč govedu iz skupine P, prvi dokaz genoma tega virusa v Sloveniji.

H. somni je v literaturi opisan kot eden najpomembnejših patogenov pri govedu in drugih prežvekovalcih. Poleg fibrinoznih in nekrotičnih procesov v dihalih lahko povzroča gnojna vnetja srčne mišice, sklepov, notranjega ušesa, krvnih žil, možganov, rodil ipd. S klasično bakteriološko preiskavo smo ga ugotovili le v enem primeru (0,9 %) bakteriološko pregledanih vzorcev pljuč, kar je daleč pod tem, kar navajajo drugi avtorji (Booker in sod., 2008; Tegtmeyer in sod., 1999; Szeredi in sod., 2010). Tudi pri vsakodnevnem delu ga s klasičnimi bakteriološkimi metodami le redko zaznamo. V primerjavi z gojiščno preiskavo pa smo *H. somni* z RT-qPCR in s qPCR ugotovili v vzorcih 31,3 % govedu, kar je bilo veliko presenečenje. Razlog za nizek odstotek izolacij bakterije *H. somni* je najverjetneje v njegovi zahtevnosti pri rasti na bakterijskih gojiščih. Kot fakultativni anaerob potrebuje za dobro rast atmosfero z dodanimi 5 do 10 % CO₂. V našem primeru smo za klasično bakteriološko preiskavo uporabili krvni agar z dodatkom 5 % krvi in agar po Drigalskem. Gojišča smo inkubirali pri običajni aerobnih pogojih, zaradi česar rast *H. somni* iz materiala ni bila optimalna. Njegova rast na gojiščih je namreč boljša pri mikroaerofilnih pogojih.

Bakterijo *P. multocida* smo z RT-PCR dokazali v 79,1 % vzorcev pljuč govedu, z gojiščno preiskavo pa smo jo ugotovili v vzorcih 25,2 % govedu. Bakterijo *M. haemolytica* smo z RT-PCR ugotovili pri 19,1 % govedu, z gojiščno preiskavo pa le pri 10,3 % govedu.

Eden od razlogov za izrazito večje deleže pozitivnih rezultatov je občutljivost same metode, saj je mogoče z njo ugotoviti nukleinsko kislino bakterij, tudi če so te mrtve. Za uspešno gojiščno preiskavo pa so za pozitiven rezultat pogoj žive, za rast na gojiščih sposobne bakterije, kar pa v praksi ni vedno mogoče. Živali z BRDC so namreč pogosto zdravljene z antibiotiki, kar je tudi lahko razlog za slabo rast bakterij na gojiščih. Določene bakterijske vrste so za rast na bakterijskih gojiščih manj zahtevne, zato lahko prerastejo druge vrste bakterij, zaradi česar lahko dobimo izkrivljeno bakteriološko slik, npr. *P. multocida* lahko preraste *H. somni*.

Primerjave obeh diagnostičnih metod za dokaz *M. bovis* ni mogoče opraviti, saj niso bili vsi vzorci pljuč nasajeni na gojišča za mikoplazme. Opravili smo le posamezna testiranja iz patoloških sprememb, značilnih za mikoplazme. Pri dveh vzorcih je bila rast mikoplazem na gojiščih zelo bujna in značilna, saj so imele kolonije obliko na oko pečenega jajca. V posameznih primerih kljub za mikoplazme značilnim patološkim spremembam v pljučih je bila sicer zanesljiva molekularna diagnostika na *M. bovis* negativna, kar vzbuja sum, da so patološke spremembe povzročile druge vrste ali rodovi mikoplazem, ki pa jih z uporabljenim testom PCR nismo dokazovali.

Fulton s sodelavci (2009) je s klasično bakteriološko preiskavo iz pljuč 237 govedu izoliral bakterijo *M. haemolytica* pri četrtini bakteriološko pregledanih govedu, kar je občutno več kot v našem primeru (10,3 %). Pogostnost izolacije bakterije *P. multocida* je zelo podobna našim ugotovitvam (24,5 %), občutno višja pa je pri bakteriji *H. somni*, ki jo je uspel izolirati kar pri

10 % govedi. Višja je bila tudi pojavnost bakterije *T. pyogenes*, saj jo je izoliral pri 35 % govedi, mi pa pri 22,4 % govedi. Izredno visoko pojavnost je ugotovil pri mikoplazmah, ki jih sicer vrstno ni diferenciral. Bakterije iz rodu *Mycoplasma* sp. je namreč ugotovil kar pri 71,4 % pregledanih govedi. Podobno visok delež (70,8 %) je ugotovil tudi Tegtmeier s sodelavci (1999).

Bell s sodelavci (2014) je opisal razlike med rezultati klasične gojiščne bakteriološke preiskave in molekularnimi diagnostičnimi metodami na vzorcih pljuč poginulih govedi na Severnem Irskem. Z obema navedenima metodama je pregledal vzorce pljuč 150 poginulih govedi in v njih dokazoval 5 najpogostejših bakterijskih respiratornih patogenov. Bakterijo *M. haemolytica* je z molekularnimi metodami ugotovil pri 34 % govedi, z gojiščno preiskavo pa pri 22 % govedi. Bakterijo *H. somni* je z molekularnimi metodami ugotovil pri 23,3 % govedi, s klasično gojiščno preiskavo pa samo pri 4 % govedi. *M. bovis* je s PCR ugotovil pri 35,3 % govedi, s klasično gojiščno preiskavo pa pri 19,3 % govedi. Bakterijo *P. multocida* je z molekularnimi metodami ugotovil pri 33,3 % govedi, na bakterijskih gojiščih pa pri 20,7 % govedi. Bakterijo *T. pyogenes* je z molekularnimi metodami ugotovil pri 28 % govedi, s klasično gojiščno preiskavo pa pri 20,7 % govedi. Med rezultati obeh metod so ugotovili statistično značilne razlike, kar pomeni, da je molekularna diagnostika bakterijskih respiratornih patogenov občutljivejša in zanesljivejša od klasične gojiščne preiskave (Bell in sod., 2014).

Povsem razumljivo je, da je delež izolatov posameznih bakterij med raziskavami različen, saj na to neposredno vplivajo izbira preiskovane populacije, starost živali, število vzorcev iz posameznega izbruha, število čred idr. Tako bi v primerih nove nastanitve živali v velikem pitališču govedi pričakovali izbruhe fibrinoznih bronhopnevmonij in večji delež izolatov bakterije *M. haemolytica*. Pri izbruhu t. i. enzooske pljučnice telet, najpogosteje povzročene z mikoplazmami, bi lahko pričakovali višji delež izolacij mikoplazem, čeprav je smrtnost v akutni fazi bolezni pri njej le nekaj odstotna. Morda je še najbolj stalen, visok odstotek izolacij pričakovati pri bakteriji *P. multocida*, saj sama redko povzroči pogin. To bakterijo pogosto ugotovimo skupaj z BRSV ali z bakterijo *M. haemolytica*.

Slabih 45 % vzorcev pljuč govedi iz skupine P je bilo bakteriološko negativnih ali pa so na gojiščih zrastle koliformne bakterije, kar smo prav tako upoštevali kot negativen rezultat na prisotnost respiratornih patogenih bakterij. Koliformne bakterije sicer prav tako lahko povzročijo vnetne spremembe v pljučih, vendar le v primerih septičnih oblik bolezni in pa v primerih, ko se s krvjo metastatsko prenesejo v pljuča iz drugih vnetnih žarišč, kjer so (so)povzročitelj bolezni, na primer pri vnetju srčnih zaklopk. Na podlagi sekcijske slike in rezultatov bakteriološke preiskave menimo, da je prisotnost koliformnih bakterij v pljučih govedi iz skupine P posledica posmrtnega preplavljanja organov s koliformnimi bakterijami.

Podobna neznanka kot pri poginulih govedih je bila tudi prevalenca posameznih respiratornih patogenov v nosnih brisih klinično bolnih govedi, saj pri nas po našem vedenju do sedaj ni bilo opravljene študije, ki bi ugotavljala več respiratornih patogenov hkrati.

Z RT-qPCR in s qPCR smo iz nosnega brisa 137 klinično bolnih govedi (skupina Ž) ugotovili vseh 10 proučevanih respiratornih patogenov, s prevalenco *P. multocida* 59,9 %, BRSV 40,1 %, *M. haemolytica* 14,6 %, BCV 11,7 %, *M. bovis* 10,9 %, *H. somni* 9,5 %, BPI3 3,6 %, BVDV 1,5 %, BAdV 0,7 % in BoHV-1 0,7 %. Bakterije *T. pyogenes* pri govedu iz skupine Ž nismo ugotavljali.

Neposredne primerjave med rezultati PCR vzorcev pljuč govedi iz skupine P in nosnih brisov govedi iz skupine Ž ni mogoče opraviti, ker je šlo za različne živali, različne reje in različne vzorce. Vseeno pa lahko potegnemo določene zaključke, ki bi lahko bili koristni za prakso. Kljub temu je iz rezultatov molekularnih metod razvidno, da je dokazljivost BRSV v nosnem brisu klinično bolnih govedi zelo dobra, saj je bil odstotek pozitivnih rezultatov več kot 40 %. Na splošno menimo, da je molekularna diagnostika respiratornih patogenov iz nosnih brisov govedi nujna pri večjih izbruhih BRDC. Ti so najpogostejše mikoplazemske ali virusne etiologije. Druge bakterijske pljučnice so, z izjemo tistih, ki jih povzroča bakterija *M. haemolytica*, ponavadi sporadične in manj pogosto potekajo akutno.

Iz tabele 29 je razvidno, da smo s preiskavo z RT-qPCR in s qPCR iz nosnih brisov govedi iz skupine Ž v devetih hlevih pri večini govedi zabeležili okužbo z BRSV in bakterijo *P. multocida*. Poleg teh smo v enem hlevu ugotovili okužbo z bakterijama *M. bovis* in *P. multocida*, v enem hlevu pa okužbo z BCV in bakterijo *M. haemolytica*. V ostalih hlevih smo iste povzročitelje ugotovili le pri posameznih živalih.

Pred začetkom raziskave smo načrtovali odvzem nosnega brisa desetim govedim pri posameznem izbruhu, med raziskavo pa se je pokazalo, da je za ugotavljanje stanja v hlevu dovolj že manjše število nosnih brisov (npr. pet brisov) pri posameznem izbruhu, pri čemer je treba upoštevati velikost črede, uniformnost klinične slike idr.

Ugotavljanje respiratornih povzročiteljev pri živih živalih je sicer možno še na več načinov, ena od teh je diagnostika respiratornih povzročiteljev iz bronhialno-pljučnih izpirkov (bronchoalveolar lavage – BAL). Pri tej metodi se v pljuča prek traheje aplicira 50 do 100 ml sterilne fiziološke raztopine in se jo prek cevke, vstavljene v trahejo, aspirira nazaj v brizgo. Aspirat predstavlja vzorec. Metoda je bolj invazivna od jemanja nosnih brisov, terja sedacijo preiskovane živali, veterinarske pomočnike, v posameznih primerih pa lahko nastopijo komplikacije.

Doyle s sodelavci (2017) je primerjal štiri različne metode odvzema vzorcev za ugotavljanje respiratornih patogenov (nosni bris, faringealni bris, bronhoalveolarni izpirek in transtrahealni izpirek). V nasprotju z nami je virusne povzročitelje ugotavljal s PCR, bakterijske povzročitelje pa s klasično bakteriološko preiskavo. Zelo dobro ujemanje med rezultati je dobil pri ugotavljanju bakterijskih povzročiteljev (*P. multocida*, *M. haemolytica*, *Mycoplasma spp.*) Rezultati ugotavljanja BRSV s PCR so se zelo dobro ujemali med vzorci, odvzetimi s transtrahealnim izpirkom in bronhoalveolarnim izpirkom, dobro ujemanje med rezultati za BRSV je ugotovil med vzorci, pridobljenimi s transtrahealnim izpirkom in nosno-žrelnim brisom, zmerno ujemanje rezultatov pa med vzorci, odvzetimi s transtrahealnim izpirkom in nosnim brisom. Za BCV je ugotovil dobro ujemanje rezultatov med vzorci, odvzetimi s

transtrahealnim izpirkom in z bronhoalveolarnim izpirkom, zmerno ujemanje med rezultati vzorcev, odvzetih z nosnim brisom, ter rezultati vzorcev, odvzetimi s transtrahealnim izpirkom in nosno-žrelnim brisom.

Kljub zgoraj navedenemu menimo, da rezultati ugotavljanja respiratornih povzročiteljev iz nosnih brisov klinično bolnih govedi kažejo, da je metoda dovolj dobra za pridobitev informacije o povzročiteljih v posameznem izbruhu BRDC. Metoda je zlasti dobra za hitro razjasnitev etiologije posameznega izbruha BRDC, pri katerem nimamo poginov (Paller s sodelavci, 2017). Sicer pa je najboljši diagnostični vzorec poginjena žival.

IVCK smo opravili tako pri govedu iz skupine P kot tudi pri govedu iz skupine Ž. IVCK pri govedu iz skupine P smo opravili iz vzorcev pljuč, ki smo jih odvzeli z RT-qPCR in s qPCR. Od vzorcev 115 govedi iz skupine P smo CPE ugotovili le pri 6 vzorcih (5,2 %). V vzorcih dveh govedi (P2, P3), ki sta poginili v izbruhu IBR/IPV v večjem pitališču, smo v celični kulturi z metodo direktne IF dokazali BoHV-1. Pri preostalih štirih govedih iz P skupine smo na enak način dokazali prisotnost BPI3.

Za uspešno IVCK je zelo pomemben postopek hranjenja in odvzema vzorcev, saj zamrzovanje in odmrzovanje slabo vplivata na rast virusa na celični kulturi. Pri dlje časa trajajočih (subkroničnih, kroničnih) oblikah pljučnic v krvi obolelih živali že najdemo specifična protitelesa proti posameznim respiratornim patogenom, ta pa so potem prisotna tudi v samem vzorcu in negativno vplivajo na razmnoževanje virusa na celični kulturi. V nasprotju z navedenim procesi zamrzovanja in odmrzovanja vzorcev bistveno ne vplivajo na obstojnost nukleinske kisline, ki jo ugotavljamo v postopkih molekularnih diagnostičnih metod.

Pri 84 govedih iz skupine Ž smo iz krvnega seruma ugotavljali prisotnost protiteles proti bakterijama *M. bovis* in *M. haemolytica* ter petim virusnim povzročiteljem (BRSV, BPI3, BVDV, BoHV-1, BAdV 3).

V testiranih krvnih serumih smo najpogosteje dokazali protitelesa proti BPI3 (57,1 %). Zanimivo je, da smo z RT-qPCR BPI3 v nosnem brisu istih živali dokazali le pri 2,4 %. Še izrazitejša je razlika pri BAdV, kjer smo protitelesa dokazali pri 53,6 %, samega virusa v nosnem brisu istih govedi pa sploh nismo ugotovili. Nosne brise smo jemali v akutni fazi bolezni, zato protiteles v serumu še ni bilo mogoče pričakovati. Iz tega lahko sklepamo, da je visok delež serološko pozitivnih živali pri BPI3 in BAdV 3 posledica prisotnosti virusa v preteklih okužbah. Podobna je bila slika pri BoHV-1, kjer smo ugotovili 11,9 % seroloških reaktorjev, sam virus pa le pri 1,2 % govedi iz skupine Ž.

Pri testiranju serumov na protitelesa proti BRSV je bila slika rahlo drugačna. Pri testiranju na protitelesa proti BRSV smo ugotovili relativno visok delež pozitivnih vzorcev (32,1 %), sam virus pa smo dokazali v nosnem brisu 40,5 % teh živali. Visok delež PCR pozitivnih in serološko pozitivnih vzorcev na BRSV je morda posledica dvofaznega pojava kliničnih znamenj. Pri okužbi z BRSV je prva faza bolezni klinično neizrazita in traja 2 do 3 dni po okužbi. Druga, klinično izrazitejša faza traja od 7 do 9 dni po okužbi, kar pa časovno že zadostuje za tvorbo nevtralizacijskih protiteles.

V 7,1 % pregledanih krvnih serumov smo ugotovili protitelesa proti bakteriji *M. haemolytica*, samo bakterijo pa v 13,1 % nosnih brisov istih govedi. Bakterija *M. haemolytica* je kot komenzal normalno prisotna v tonzilarnih kriptah zdravih govedi. Ob delovanju stresorjev se začne naglo razmnoževati in lahko povzroči hude oblike fibrinoznih ali fibrinozno gnojnih pljučnic.

Pri serološki preiskavi serumov na protitelesa proti bakteriji *M. bovis* smo ugotovili 17,9 % pozitivnih vzorcev, samo bakterijo pa smo ugotovili v 10,7 % nosnih brisov pregledanih govedi. V primerjavi z bakterijo *M. haemolytica* je pri mikoplazmah tok bolezni povečini kroničen, zato je časa za nastanek protiteles dovolj.

Na splošno lahko rečemo, da je serološka preiskava bolj kot za raziskovanje etiologije BRDC primerna samo za hitro in/ali masovno dokazovanje prisotnosti posameznega respiratornega patogena v neki čredi. Informacijo o dinamiki okužb s posameznim respiratornim patogenom bi izboljšal pregled parnih serumov, iz katerih bi bilo razvidno, ali nivo protiteles proti posameznemu povzročitelju narašča ali pada.

Ob koncu opravljene raziskave smo lahko povezali ugotovitve in na podlagi opravljenih preiskav odgovorili na zastavljena vprašanja. V raziskavi smo ugotovili, da je bila čista gnojna bronhopnevmonija najpogostejše diagnosticirana pljučnica pri govedu iz skupine P (28,3 %). Pri bronhopnevmonijah pride škodljivi dejavnik v dihalo ponavadi aerogeno. Preden povzroči pljučnico, mora premagati obrambne mehanizme dihal. Za bronhopnevmonijo je na splošno značilno, da se eksudat nabira v bronhijih, bronhiolih in v lumnu alveolov. Inter-alveolarni intersticij ostane ob tem nespremenjen, v njem se pojavi le aktivna polnokrvnost. V zgodnji fazi bronhopnevmonije so krvne žile močno napolnjene s krvjo, v bronhijih, bronhiolih in alveolih pa je nekaj vnetne tekočine, ki je posledica povečane prepustnosti stene krvnih žil. Če je škodljiv dejavnik blažji do zmeren, citokini povzročijo rekrutiranje nevtrofilcev in alveolarnih makrofagov v svetlino bronhijolov in alveolov. Če je noksa hujša, citokini povzročijo odpiranje endotelni por, eksudacijo fibrinogena, včasih tudi krvi v svetlino alveolov. Zaradi povečane permeabilnosti kapilar se eksudat izceja v alveole, bronhiole in manjše bronhe, kar privede do obliteracije zračnih poti in konsolidacije prizadetih delov pljuč. Če vnetni proces ne more nadzirati vzročnega dejavnika, se poškodbe tkiva hitro širijo iz režnjiča na režnjič prek por v alveolarni steni in prek uničenih alveolarnih sten. Patomorfološke spremembe se širijo centrifugalno, starejše poškodbe so v sredi takšnega žarišča. Ob tem lahko prihaja do aspiracije eksudata v bolj oddaljene pljučne režnjiče. Za gnojno bronhopnevmonijo je značilna prisotnost gnojnega ali gnojno sluzastega eksudata v bronhijih, bronhiolih in alveolih. Makroskopsko je zanj značilna kranioventralna razporeditev pnevmoničnih sprememb, ki se kaže v konsolidaciji pljučnega tkiva. Vnetni proces je pri gnojni bronhopnevmoniji vezan na posamezen pljučni režnjič, kar je pri govedu, ki ima močno razvito pljučno intelobularno vezivo, še posebej izrazito. Proces se širi endobronhialno, omejenost med posameznimi režnjiči pa pri tem pripomore k počasnejšemu širjenju patološkega procesa po samih pljučih. Posledično lahko med prizadetimi pljučnimi režnjiči vidimo tudi takšne, ki jih vnetni proces ni zajel, zaradi česar je morfološka slika gnojne bronhopnevmonije pri govedu raznolika (Lopez, 2011).

Patomorfološka slika gnojne bronhopnevmonije je odvisna tudi od starosti patoloških procesov, saj je slika akutne gnojne bronhopnevmonije bistveno drugačna od kronične. Pri akutnih oblikah so patološke spremembe običajno bolj difuzne, pri kroničnih se poleg difuznih pojavljajo tudi gnojna žarišča, ki so bolj omejena z veznim tkivom, npr. v obliki multifokalnih abscesov ali bronhiektazij. Bronhiektazije so ena od najhujših posledic kroničnega vnetja bronhijev. Nastanejo zaradi sproščanja proteolitičnih encimov in kisikovih radikalov iz fagocitov pri kroničnih vnetjih, kar privede do razgradnje gladkih mišičnih celic in hrustanca, ki dajeta bronhijem normalno obliko in omogočata normalno funkcijo. Gre za ireverzibilne spremembe v zgradbi bronhov. Če je skelet bronhijev poškodovan na enem mestu, dobimo vrečaste razširitve, če je hrustanec uničen v večjem segmentu bronha, so razširitve bolj valjaste. Najpogostejše so napolnjene z gnojnim eksudatom, zaradi česar jih makroskopsko pogosto zamenjujejo z abscesi. Razlika med njimi je pod mikroskopom očitna, saj bomo namesto piogene membrane abscesa na površini lumna ektatičnih bronhov videli metaplastičen nizkoprizmatični epitelij bronhialne sluznice, v sami steni pa ostanke bronhialnega hrustanca. V naši raziskavi smo bronhiektazije s patohistološko preiskavo ugotovili v vzorcih kranialnih pljučnih režnjev pri 14,2 % patohistološko pregledanih govedih iz skupine P, v kavalnih in medialnih pljučnih režnjih pa pri 4,4 % govedih. Bronhiektazije pri govedu pogosto povezujemo s prisotnostjo mikoplazem v pljučnem tkivu (Lopez, 2011), čeprav tega v naši raziskavi nismo mogli potrditi.

Pri gnojni bronhopnevmoniji smo od iskanih povzročiteljev s klasično bakteriološko preiskavo in/ali PCR največkrat dokazali bakterijo *P. multocida* (87,5 %), sledijo ji *H. somni* (37,5 %) in *T. pyogenes* (37,5 %) ter *M. haemolytica* (28,1 %). Vsi našeti povzročitelji so pri govedu pogost povzročitelj gnojne bronhopnevmonije (Tegtmeier in sod., 1999; Fulton in sod., 2009; Szeredi in sod., 2010; Lopez, 2011). Pri analizi povezave posameznega bakterijskega povzročitelja smo ugotovili statistično značilno povezavo med patološkimi procesi, značilnimi za gnojno bronhopnevmonijo, in bakterijami *P. multocida* ($p = 0,0013$) in *H. somni* ($p = 0,01806$).

Med prisotnostjo bakterije *T. pyogenes* ($p=0,18223$) in *M. haemolytica* ($p=0,18223$) ter patološkimi spremembami, značilnimi za gnojno bronhopnevmonijo, nismo ugotovili statistično značilnih razlik.

Vzrok za relativno nizek delež ugotovljenih mikoplazem pri gnojni bronhopnevmoniji (18,7 %) je dejstvo, da smo z RT-PCR ugotavljali samo *M. bovis*, gnojne procese na pljučih govedih pa povzročajo tudi druge vrste mikoplazem, ki pa jih v raziskavi nismo ugotavljali. Po podatkih drugih avtorjev so v pljučih govedih pogoste še *M. arginini*, *M. dispar*, *M. alkalescens*, *M. bovirhinis* (Parker in sod., 2018). Če bi za molekularno diagnostiko mikoplazem uporabili poseben set za mikoplazme, bi gotovo ugotovili višji delež mikoplazem. To je tudi ena od možnih razlag za prej navedeno diskrepanco med številom ugotovljenih bronhiektazij in številom ugotovitev bakterije *M. bovis*.

Od virusnih povzročiteljev smo pri gnojni bronhopnevmoniji najpogostejše ugotovili BVDV (15,6 %). V približno enakem deležu smo ugotovili BRSV in BAdV (12,5 %).

Druga najpogostejše ugotovljena pljučnica pri govedih iz skupine P je bila bronhointersticijska pljučnica (26,5 %). Pojem bronhointersticijske pljučnice se je v veterinarsko medicino vpeljal za skupino pljučnic, ki začnejo kot bronhopnevmonija, v svojem nadaljnjem poteku pa imajo vse značilnosti intersticijske pljučnice. Večinoma so posledica virusnih bolezni, na primer pri okužbi z BRSV, pri katerih virusni povzročitelj napada epiteljske celice bronhijev, bronhiolov in alveolov. V njih se replicira in povzroči njihovo nekrozo. Poškodbe bronhijalne in bronhiolarne sluznice privabijo nevtrofilce, ki migrirajo v svetlino bronhijev/bronhiolov, podobno kot pri bronhopnevmoniji, poškodbe alveolarnih celic pa izzovejo proliferacijo pnevmocitov tipa II, podobno kot pri intersticijski pljučnici (Lopez, 2011).

Od ugotavljanih povzročiteljev smo tudi pri bronhointersticijski pljučnici najpogostejše ugotovili bakterijo *P. multocida* (63,3 %), sledijo BRSV (50,0 %), BAdV (20,0 %) in *H. somni* (16,7 %). Zanimivo, bakterije *M. haemolytica* nismo ugotovili niti v enem primeru čiste bronhointersticijske pljučnice, negativna povezava med tema dvema spremenljivkama pa je bila statistično značilna ($p = 0,0092$).

Čeprav smo najpogostejše ugotovili bakterijo *P. multocida*, nismo ugotovili statistično značilne povezave med to bakterijo in patomorfološkimi spremembami, značilnimi za bronhointersticijsko pljučnico. Na splošno je glavni povzročitelj bronhointersticijske pljučnice pri govedu BRSV. Lahko trdimo, da je pljučnica, povzročena z BRSV, model za bronhointersticijski tip pljučnice, kar smo potrdili tudi v naši raziskavi, saj je bila povezava med prisotnostjo BRSV in patomorfološkimi spremembami, značilnimi za bronhointersticijsko pljučnico, statistično značilna ($p = 0,00004$).

Znano je, da se pri izbruhih pljučnic pri govedu BRSV večkrat pojavlja skupaj z bakterijo *P. multocida*. V naši raziskavi smo ju skupaj ugotovili v 28 vzorcih od 115 pregledanih govedih (24,34 %). Mehanizmi njune sinergije niso povsem razjasnjeni, so pa v *in vitro* pogojih dokazali, da se je bakterija *P. multocida* 2- do 8-krat bolje prilepila na respiratorne epitelne celice, okužene z BRSV, kot na zdrave (Sudaryatma in sod., 2018).

Po izkušnjah, pridobljenih v raziskavi, lahko rečemo, da je raztelesbena diagnostika bronhointersticijske pljučnice, povzročene z BRSV, dokaj enostavna. Navedeni tip pljučnice ima nekaj značilnosti, na podlagi katerih lahko izkušen patolog z veliko verjetnostjo napove, da je pljučnico povzročil ta virus. Še posebej to velja za primere čiste bronhointersticijske pljučnice, ki pa so dokaj redki, saj se ji pogosto pridruži sekundarna bakterijska okužba, ki izzove gnojne procese. To so večinoma akutni ali subakutni primeri okužbe z BRSV, ki se pojavljajo pretežno pri živalih, ki so se prvič srečale z virusom. V naši raziskavi smo v skupini P ugotovili 7 čistih primerov pljučnic, povzročenih z BRSV. V vseh 7 primerih smo pri raztelesbi ugotovili čisto bronhointersticijsko pljučnico, po patohistološki preiskavi pa smo eno označili kot intersticijsko in eno kot kombinirano z gnojno bronhopnevmonijo. S PCR poleg BRSV nismo ugotovili nobenega drugega respiratornega patogena. Klasična bakteriološka preiskava pljuč je bila negativna pri štirih govedih, pri treh govedih pa smo iz pljuč izolirali bakterijo *E. coli*, kar si, razen pri govedu s kombinirano gnojno bronhopnevmonijo, lahko razlagamo kot posmrtno kontaminacijo vzorca. Bronhointersticijsko pljučnico, povzročeno z

BRSV, lahko pri raztelesbi spoznamo po tem, da so pljuča rahlo lisasta, patološko spremenjeni deli so mesnate konsistence, rožnate ali temnejše rdeče barve. Pnevmonične spremembe so prisotne večinoma na kranioventralnih delih pljuč, čeprav jih lahko najdemo tudi v vseh delih pljuč. Zaradi bronhialne nekroze in obstrukcije bronhiolov s celičnim detritusom in vnetnimi celicami pogosto ugotovimo za to vrsto pljučnice dokaj značilen emfizem. V blažjih primerih ga vidimo kot tu in tam rahlo razmaknjen interlobularni intersticij ali od pljučnega tkiva rahlo privzdignjeno plevro, ki je zaradi tega motna. Na rezni ploskvi zmerno prizadetih pljuč je v interlobularnem intersticiju videti različno velike votlinice zraka, ki imajo premer 1 do 2 centimetrov. Ob napredovanju patoloških procesov pride do združevanja teh votlinic, pri čemer nastanejo prave bulozne spremembe, ki lahko dosežejo velikost pesti. Pri raztelesbi je ob njihovem odprtju mogoče zaznati vonj po goveji sapi oziroma po vampovi vsebini. V posameznih primerih so bulozne razširitve zaradi nabiranja zraka v interlobularnem intersticiju enormne in prodrejo na površino pljuč, kjer privzdignejo popljučnico do te mere, da bulozna razširitev zajame celoten pljučni reženj. V teh primerih lahko popljučnica celo poči, kar povzroči pnevmotoraks in pogin zaradi zadušitve. Pri okužbi z BRSV je opisan še en fenomen, katerega mehanizmi niso čisto pojasnjeni; pri tem naj bi prišlo do degranulacije mastocitov v tkivu in sproščanja biogenih aminov, ki povzročajo krčenje gladke mišičnine, zaradi česar pride do izrazitega krčenja bronhiolov in posledično dispneje (Dungworth, 1993; Jolly in sod., 2004).

Pri nastajanju buloznih razširitev zaradi emfizema redno prihaja tudi do pokanja krvnih žilic v interlobularnem intersticiju, kar nam je pri raztelesbi v diagnostično pomoč predvsem pri dlje časa trajajočih bronhointersticijskih pljučnicah, ko makroskopske spremembe niso več tako očitne. Emfizem počasi izginja, pljuča pa spet dobivajo bolj homogeno konsistenco. Ob najdbi subplevralnih ali interlobularnih krvavitev, pri čemer je kri zaradi starosti procesov velikokrat že rjavkasto obarvana, lahko z veliko verjetnostjo trdimo, da je šlo za pljučnico, ki jo je povzročil BRSV. S takšnimi nekaj dni starimi krvavitvami se lahko srečamo pri kravah molznicah, ki jih sicer za njihovo starost dokaj benigna okužba z BRSV pahne v katero od presnovnih bolezni, zaradi katere lahko tudi poginejo.

Pogini zaradi BRSV so pri odraslem govedu redki. V naši raziskavi smo ugotovili, da okužba z BRSV npr. pri kravah molznicah lahko povzroči hude motnje v presnovi, ki lahko privedejo do pogina živali. Tako smo pri pet let stari kravi, ki je v prvem mesecu brejosti prebolevala bronhointersticijsko pljučnico, povzročeno z BRSV, poleg blažjih pnevmoničnih sprememb ugotovili krvaveči čir siriščnika in jetrno steatozo. Okužba z BRSV je povzročila zmanjšano ješčnost živali, kar je vodilo v negativno energetske bilanco in posledično v hudo jetrno steatozo, zaradi česar je žival poginila.

Poleg značilnih sprememb na pljučih smo pri kadavrih govedi, poginulih v akutni fazi bolezni, zaznali izrazito cianozo - pomodrelost vidnih sluznic in kože, kar je seveda posledica hipoksije. Cianoza je bila zelo dobro vidna na smrčku, na sluznici ustne votline in na koži manj poraslih predelov telesa (seski, modnik, presredek). V takšnih primerih je bilo mogoče že ob zunanjem pregledu trupla na podlagi ugotovljene izrazite pomodrelosti sluznic in kože posumiti na okužbo z BRSV, ki smo jo kasneje z opravljenimi preiskavami pogosto tudi potrdili (npr. P4, P80, P87).

Še zanesljivejše je pljučnico, povzročeno z BRSV, mogoče prepoznati na podlagi patohistoloških sprememb. Z BRSV okužene epitelijske celice bronhiolov začnejo nabrekati, degenerirajo in se kot celični detritus odluščijo v lumen bronhiola. Tu jih najdemo združene v celice z več jedri, t. i. sincicijske celice, po katerih je virus dobil tudi ime. Sincicijske celice so sestavljene iz propadlih deskvamiranih bronialnih celic in/ali propadlih pnevmocitov tipa II. Virus ima namreč afiniteto tudi do pnevmocitov.

Če okužba z BRSV ne povzroči pogina v akutni fazi bolezni, ta preide v subakutno fazo. Pod mikroskopom lahko vidimo proliferacijo pnevmocitov tipa II, ki pokrivajo površino alveol. Zaradi tega imajo te videz majhnih žlez, pokritih s plastjo izoprizmatičnega epitelijskega tkiva, čemur pravimo tudi epitelizacija pljučnega tkiva.

Pogosto se bronhointersticijski pljučnici pridruži gnojna bronhopnevmonija, zlasti na kranialnih in medialnem pljučnem režnju.

Fibrinozna bronhopnevmonija je bila tretja najpogostejše zastopana vrsta pljučnice (13,3 %). Sicer je podobna gnojni, s tem da v eksudatu namesto nevtrofilnih granulocitov prevladuje fibrin. Njen potek je povečini bolj malignen, saj lahko živali poginejo tudi v primerih, ko je prizadetega manj kot 30 % pljučnega tkiva (Lopez, 2011). Vzrok za hiter pogin je toksemija ali septikemija. V začetni fazi se infekt širi po pljučih endobronhialno, pozneje se širi tudi prek mezgovnic in lahko zajame celotne pljučne režnje, zato so jo v preteklosti imenovali tudi lobarna pnevmonija. V naši raziskavi smo patohistološke spremembe, značilne za fibrinozno bronhopnevmonijo, ugotovili približno enako pogosto v vzorcih vseh treh pljučnih režnjev (kranialni reženj 14,5 %, medialni in kavdalni reženj 12,5 %).

Pri tej skupini pljučnic smo z bakteriološko preiskavo ali z RT-PCR najpogostejše in v enakih deležih ugotovili bakteriji *M. haemolytica* (46,7 %) in *P. multocida* (46,7 %), vendar povezava med njuno prisotnostjo in patomorfološkimi spremembami, značilnimi za fibrinozno bronhopnevmonijo, ni bila statistično značilna, kar je v nasprotju s splošno znanim dejstvom, da *M. haemolytica* povzroča fibrinozno bronhopnevmonijo. Menimo, da je do tega prišlo zaradi majhnosti vzorca.

M. haemolytica je oportunistična bakterija, sicer običajen prebivalec zgornjih dihalnih poti. Zadržuje se v tonzilarnih kriptah zdravih goved, iz katerih jo je težko izolirati. Obstaja več serotipov pri govedu, ki se med seboj razlikujejo po patogenosti. Najbolj patogena je *M. haemolytica* serotip S1, manj pa sta patogena serotipa S2 in S4. Ob virusnih okužbah, delovanju okoljskih stresorjev in/ali zmanjšani obrambni sposobnosti gostitelja se bakterija hitro razmnožuje v zgornjih dihalih. Namnožene bakterije se z nosno-žrelne sluznice skupaj z vdihanim zrakom v obliki aerosola vnesejo v sapnik in bronhije ter naselijo pljuča. V tej fazi *M. haemolytica* proizvaja eksotoksin; ker je toksičen za levkocite, so ga imenovali levkotoksin. Interakcija med determinantami patogenosti bakterije in obrambnim sistemom gostitelja povzroča v gostitelju poškodbe tkiva, kot so nekroze, tromboze mezgovnic in eksudacijo; posledica je fibrinozna bronhopnevmonija (Singh in sod.; 2011).

Za bolezen, ki jo povzroča, se je v zadnjem času v strokovnem jeziku uveljavil pojem pljučna manheimioza (Lopez, 2011). Zanj je pogosto značilen akuten, celo fulminantni tok bolezni.

Pojavlja se večinoma pri govejih pitancih po transportu ali ob združevanju živali iz različnih čred in je zelo pogosta v velikih pitališčih govedih, zlasti v ZDA. Bolezen zaradi njenega pogostega pojavljanja po transportu že dolgo imenujejo »shipping fever« (Rehmtulla in Thomson, 1981; Rice in sod., 2007; Panciera in Confer, 2010).

Ko ugotovimo fibrinozno bronhopnevmonijo, lahko z veliko verjetnostjo sklepamo, da jo povzročajo bakterije *M. haemolytica* in/ali *P. multocida*, lahko tudi *H. somni*. Če je v anamnezi navedeno, da živali poginjajo akutno ali perakutno in so v dobri kondiciji, pri sekciji pa ugotovimo fibrinozno pljučnico, vnetje popljučnice in ob pregledu zaznamo sladkoben vonj razpadajočega pljučnega tkiva, lahko z veliko zanesljivostjo trdimo, da gre za akutno pljučno manheimiozo. Ni nujno, da so patološke spremembe na pljučih obsežne, lahko so le omejene ali celo fokalne, saj omenjena bakterija izloča toksine, ki lahko hitro povzročijo pogin živali. Vnetje popljučnice lahko spremlja obilna eksudacija vnetne tekočine in fibrina. Če je pogin perakuten, povečini najdemo le manjše krpe fibrina na popljučnico prizadetih delov pljuč. Barva eksudata je pri manhemiozi lahko citronsko rumena, oranžna ali rdeča, z vsemi možnimi vmesnimi odtenki, odvisno od količine krvnih elementov v njem. Manheimioza lahko poteka v čisti obliki, torej brez prisotnosti še kakšnega drugega biološkega etiološkega dejavnika BRDC, lahko pa jo je izzval kateri od drugih virusnih ali bakterijskih povzročiteljev (BRSV, BCV).

V naši raziskavi nas je presenetil pojav akutne pljučne manheimioze z zelo malignim potekom pri kravah molznicah v visoko proizvodni čredi molznic. Imetnik živali je v anamnezi navedel, da je najprej opazil rahlo krvavkasto drisko, potem so se začeli pogini. V čredi 100 krav molznic sta najprej akutno poginili dve visoko proizvodni živali (P 85, P 86), takoj potem je zbolelo še nekaj krav, ki so imele visoko vročino (40 °C). Sekcijsko smo pri obeh poginulih kravah ugotovili tipično fibrinozno bronhopnevmonijo s plevritisom, v pljučih pa dokazali bakteriji *M. haemolytica* in *P. multocida*. Pri eni od obeh živali je bila v pljučih še bakterija *H. somni*. Kljub vsakokratnem preventivnem merjenju telesne temperature vseh krav na molzišču in takojšnji antibiotični terapiji krav z vročino so se pogini molznic nadaljevali. V približno tednu dni je rejec izgubil devet visoko proizvodnih molznic. Nato je obolenje v hlevu izzvenelo podobno hitro, kot se je pojavilo. Virusnih povzročiteljev v pljučih poginulih molznic nismo ugotovili. Pri iskanju vzroka za izbruh akutne manheimioze smo od rejca izvedeli, da je neposredno pred izbruhom bolezni živalim spremenil obrok. Da bi povečal vsebnosti beljakovin v obroku, je vanj vključil večjo količino bučnih tropin. Pri tem so prav visoko proizvodne molznice prejele večji delež bučnih tropin, kar je bil najverjetnejši razlog za izbruh manheimioze.

Čeprav smo pri fibrinozni bronhopnevmoniji bakterijo *P. multocida* ugotovili v enakem deležu kot bakterijo *M. haemolytica*, jo vzročno bolj kot s fibrinozno povezujemo z gnojno bronhopnevmonijo. Na splošno je njena patogeneza slabše poznana. *P. multocida* je oportunistična bakterija, ki običajno kolonizira pljuča, ko so ta že prizadeta zaradi delovanja nekega drugega škodljivega dejavnika. Njihova patogenost je bolj vezana na dlje časa trajajoče okvare obrambnih mehanizmov dihal, ki so pogosto posledica okužbe z drugimi respiratornimi patogeni (Ramírez-Romero in sod., 2012).

Drugi povzročitelji, ki smo jih ugotovili pri fibrinozni bronhopnevmoniji, so *M. bovis* (18,7 %), *H. somni* (18,7 %), BRSV (18,7 %) in BCV (18,7 %). Delež bakterije *T. pyogenes* (12,5 %) je majhen in v skladu s pričakovanji, saj ima fibrinozna bronhopnevmonija večinoma akuten potek, *T. pyogenes* pa je bakterija, ki jo večinoma povezujemo s kroničnimi patološkimi procesi.

Podatki iz literature kažejo, da je poleg bakterij *M. haemolytica* in *P. multocida* pri fibrinozni bronhopnevmoniji pogosto soudeležena *H. somni* (Fulton in sod., 2009; Lopez, 2011).

Čeprav smo bakterijo *P. multocida* v naši raziskavi ugotovili kar v 78,4 % vzorcev pljuč govedi iz skupine P, smo jo le v dveh primerih ugotovili kot edini respiratorni patogen (1,74 %); enkrat pri 5-mesečnem črno belem plemenskem biku s kronično abscedirajočo gnojno bronhopnevmonijo (P19) in enkrat pri 3-mesečnem črno belem teletu z akutno gnojno bronhopnevmonijo (P47). V vseh drugih primerih je bila *P. multocida* ugotovljena še z drugimi respiratornimi patogeni.

Pri odvzemu vzorcev smo dali prednost patološko spremenjenim delom posameznega pljučnega režnja pred tistimi brez patoloških sprememb, zato prisotnost pljučnice v pregledanem vzorcu še ne pomeni, da je bila pljučnica razširjena po celotnih pljučih. Prav pri fibrinozni bronhopnevmoniji obsežnost pnevmoničnega procesa ni nujno v povezavi s poginom živali, saj ima njen povzročitelj *M. haemolytica* številne determinante patogenosti, med njimi lipopolisaharide (LPS), levkotoksin (LKT) in različne proteaze, ki lahko povzročijo hiter pogin živali, čeprav je s pljučnico zajet le relativno majhen delež pljuč (Schiefer in sod., 1978; Singh in sod., 2011).

Pri 5,3 % govedi iz skupine P smo kot končno patomorfološko diagnozo na pljučih ugotovili intersticijsko pljučnico, o kateri govorimo takrat, ko škodljivi dejavnik deluje in izzove vnetni proces v steni alveolov. Pri sekciji jo je težko prepoznati, zato moramo za potrditev diagnostike nujno opraviti patohistološko preiskavo. Pri raztelesbi jo lahko hitro spregledamo, zlasti če so pljuča močno polnokrvna, edematozna ali emfizematozna. Patogeneza intersticijske pljučnice je kompleksna, saj lahko škodljivi dejavniki vplivajo na alveolarno steno aerogeno ali hematogeno. V prvem primeru pride do poškodb alveolarnega epitelija (pnevmocitov tipa I in II), v drugem pa do poškodb endotelija kapilar in/ali bazalne membrane. Na splošno intersticijske pljučnice delimo v akutne in kronične. (Lopez, 2011).

Akutna intersticijska pljučnica se začne s poškodbo pnevmocitov tipa I ali endotelija alveolarnih kapilar, zaradi česar pride do prekinitve pljučno krvne bariere in do eksudacije plazemskih beljakovin v alveolarni prostor. To izlitje plazemskih beljakovin predstavlja eksudativno fazo akutne intersticijske pljučnice. Ob bolj difuznih poškodbah se včasih v alveole izliti eksudat pomeša z lipidi ali drugimi komponentami surfaktanta in tako se tvorijo podolgovate membrane, ki so tu in tam prilepljene na bazalno membrano in na samo alveolarno steno. V histoloških preparatih so eozinofilne, homogene in amorfne, zaradi česar jih imenujemo hialine membrane. Poleg intraalveolarne eksudacije pride v samem interalveolarnem intersticiju do vnetnega edema in zbiranja nevtrofilcev, zaradi česar alveolarne stene postanejo zadebeljene. Po nekaj dneh trajajoči eksudativni fazi nastopi

proliferativna faza akutne intersticijske pljučnice. Zanja je značilna hiperplazija pnevmocitov tipa II, ki nadomeščajo odlučene pnevmocite tipa I. Posledica proliferacije pnevmocitov tipa II je občutna zadebelitev alveolarnih sten, kar je tudi eden od razlogov, da so pljuča v tej fazi bolj mesnate konsistence. Akutna intersticijska pljučnica je večinoma blaga in najpogosteje vodi v ozdravitev, zato jih pri raztelesbah relativno redko srečamo. V primerih hudih akutnih intersticijskih pljučnic živali poginejo zaradi zadušitve. V teh primerih gre za obsežne poškodbe alveol, posledično obsežno intraalveolarno eksudacijo z beljakovinami bogatim eksudatom in do fatalnega pljučnega edema (Lopez, 2011).

V primerjavi z bronhopnevmonijami, ki imajo večinoma kranioventralno distribucijo patoloških sprememb, so pri intersticijskih pljučnicah pnevmonične spremembe večinoma razporejene difuzno po vseh pljučnih režnjih (Panciera in Confer, 2010).

Pri raztelesbi intersticijsko pljučnico spoznamo po tem, da pljuča ob odprtju prsne votline slabo kolabirajo, na pljučnih krilih so pogosto vidni odtisi reber in v bronhijih ni eksudata. Barva pljuč pri intersticijski pljučnici variira od difuzno rdeče pri akutnih primerih do difuzno blede sive ali lisaste blede rdeče pri kroničnih primerih. Bledost pljuč je posledica obliteracije alveolarnih kapilar in zmanjšane prekrvavitve pljučnega tkiva. Značilna konsistenca pljuč pri intersticijski pljučnici je čvrsto elastična ali gumijasta. Rezna ploskev je mesnata, podobna tisti pri surovem mesu. Če škodljivi dejavnik vztraja, akutna intersticijska pljučnica preide v kronično, za katero so značilne fibroza alveolarnih sten, infiltracija interalveolarnega intersticija z limfociti, makrofagi, fibroblasti in miofibroblasti in proliferacija pnevmocitov tipa II. Čeprav je središče patološkega dogajanja v alveolarni steni, vedno najdemo mešanico odlučeneh epitelnih celic, makrofagov in nevtrofilnih granulocitov v svetlini bronhiolov in v alveolih. Druge patološke spremembe, ki jih lahko najdemo pri kronični intersticijski pljučnici, so mikroskopski granulomi, hiperplazija gladkih mišičnih celic v bronhiolih in pljučnih arterijolah.

Pri šestih primerih intersticijske pljučnice smo s klasično bakteriološko preiskavo in/ali PCR dvakrat dokazali bakterijo *P. multocida* (33,3 %) in BRSV (33,3 %), po enkrat pa *M. bovis* (16,6 %), BVDV (16,6 %), BAdV (16,6 %) in bakterijo *T. pyogenes* (16,6 %).

Pred začetkom raziskave smo na podlagi predhodnih izkušenj in podatkov iz literature vedeli, da vzrok za raznoliko patomorfološko sliko tiči v hkratnem delovanju različnih respiratornih patogenov v pljučih. To smo z opravljenimi diagnostičnimi preiskavami tudi dokazali. Pri pregledu povezave med ugotovljenimi vrstami pljučnic in prisotnostjo posameznega respiratornega patogena v pljučnem tkivu smo ugotovili, da se *P. multocida* najpogosteje pojavlja pri gnojni bronhopnevmoniji in bronhointersticijski pljučnici, *H. somni* in *T. pyogenes* pri gnojni bronhopnevmoniji, *M. haemolytica* pri gnojni in fibrinozni bronhopnevmoniji, *M. bovis* pa pri gnojni bronhopnevmoniji, vendar enako pogosto tudi pri vseh drugih vrstah pljučnic. Za virusne respiratorne patogene smo ugotovili, da se BRSV najpogosteje pojavlja pri bronhointersticijski pljučnici, BAdV pri bronhointersticijski in gnojni bronhopnevmoniji, BCV enako pogosto pri vseh vrstah pljučnic, BVDV najpogosteje pri gnojni in BPI3 najpogosteje pri

bronhointersticijski pljučnici. Zaradi nizkega števila dokazanih BoHV-1 sklepanje o povezavah med patološkimi spremembami in povzročiteljem ni smiselno.

S praktičnega vidika diagnostike smo želeli ugotoviti tudi, ali so IHC in molekularne metode v diagnostiki virusnih povzročiteljev bolezni dihal pri govedu enako uporabne. Pri tem smo uporabili statistični izračun koeficienta kappa po Cohenu. Izračunane vrednosti za posameznega povzročitelja so v tabeli 22. Na podlagi statističnega izračuna koeficienta kappa po Cohenu lahko sklepamo, da se rezultati IHC dovolj dobro ujemajo le pri ugotavljanju BVDV. Pri vseh drugih ugotavljanjih respiratornih povzročiteljih smo ugotovili nezadostno zanesljivost IHC v primerjavi s PCR.

Razlike med obema metodama lahko pripišemo različni interpretaciji rezultatov. Rezultati se pri IHC ocenjujejo subjektivno, pri PCR pa je rezultat numeričen v obliki Ct vrednosti.

Zanimalo nas je tudi, ali obstajajo razlike v pojavnosti bolezni dihal in njihovih povzročiteljev med našimi pitovnimi in mlečnimi rejami govedi. Pri govedih iz skupine P smo število respiratornih patogenov ugotavljali z molekularno diagnostiko in klasično bakteriološko preiskavo. Iz vzorcev pljuč govedi iz skupine P iz mlečnih rej smo v povprečju ugotovili 2,5 respiratornega patogena na žival, najpogosteje po dva patogena na žival. V vzorcih pljuč govedi iz skupine P iz pitovnih rej smo v povprečju ugotovili 2,9 respiratornega patogena, najpogosteje po tri patogene na žival. Največje število patogenov, ki smo jih ugotovili pri istem govedu, je bilo 7. Razlike v številu patogenov pri govedih iz skupine P in različnih tipov rej niso bile statistično značilne ($p = 0,6601$).

Pri 137 govedih iz skupine Ž, pri katerih smo opravili RT-qPCR in qPCR, smo najpogosteje ugotovili dva respiratorna patogena na žival, v povprečju 1,5 respiratornega patogena na žival. V nosnih brisih govedi iz skupine Ž smo pri tistih iz mlečnih rej najpogosteje ugotovili po en respiratorni patogen na žival, v povprečju 0,9 respiratornega patogena na žival. V nosnem brisu govedi iz skupine Ž smo pri tistih iz pitovnih rej najpogosteje ugotovili po dva respiratorna patogene na žival, v povprečju 2,3 respiratornega patogena na žival. V nosnih brisih govedi iz skupine Ž in kombiniranih rej smo najpogosteje ugotovili po en respiratorni patogen na žival, v povprečju 1,5 respiratornega patogena na žival. Največje število različnih patogenov, ki smo jih ugotovili pri istem govedu iz skupine Ž, je bilo štiri. Razlike v številu ugotovljenih respiratornih patogenov v nosnih brisih govedi iz skupine Ž in mlečnih rej v primerjavi s tistimi iz pitovnih rej so bile statistično značilne ($p = 0,00365$).

Večje število patogenov pri govedih iz pitovnih rej naj bi po naših hipotezah bila posledica združevanja telet različnih provenienc, ki se v novem okolju med seboj okužujejo z novimi patogeni. Izbruhi in pogini pa so lahko posledica drugih dejavnikov, ki povzročijo stres, npr. združevanje živali iz različnih hlevov ali boksov, transport, veterinarske akcije, slabe mikroklimatske razmere ipd. Na splošno je obravnava živali v pitovnih rejah zaradi številčnosti živali pogosto skupinska, pri mlečnih rejah pa se živali obravnava bolj individualno. Pomembno vlogo pri poginih zaradi pljučnic ima starost, saj so pljučnice mnogo pogostejše pri mladih živalih kot pri odraslih.

Na podlagi rezultatov opravljenih preiskav menimo, da je za ugotovitev etiološke diagnoze BRDC nujno opraviti več različnih diagnostičnih preiskav. Razen kliničnega pregleda obolelih živali je ugotavljanje respiratornih patogenov z molekularnimi metodami iz nosnih brisov, odvzetih klinično bolnim govedim v akutni fazi bolezni, primerna metoda za diagnostiko BRDC, zlasti v zgodnji fazi bolezni, ko živali (še) ne poginjajo.

Če se pojavijo pogini, je najprimernejši material za diagnostiko kadaver. Če so pogini številčnejši, moramo patoanatomsko pregledati več poginulih živali. Če se pogini pojavljajo pri več kategorijah, patoanatomsko pregledamo živali vseh kategorij. Pri prvih pregledanih primerih moramo v vzorcih pljuč opraviti še patohistološko, bakteriološko in molekularno diagnostiko ugotavljanja respiratornih patogenov. Izvedba navedenih preiskav je nujna za ugotovitev povzročiteljev pogina, čeprav njihova ugotovitev morda ne bo vedno imela neposrednega vpliva na potek bolezni v čredi. Če smo pri posameznem izbruhu opravili navedeno diagnostiko in nam je ta prinesla relevantne rezultate, lahko v nadaljevanju izbruha izvedbo posameznih diagnostičnih metod opustimo. Nadaljnje usmerjanje preiskav vselej skrbno pretehtamo, za kar so seveda potrebne izkušnje, sicer lahko katerega od povzročiteljev izbruha spregledamo.

Etiološka patologija respiratornih bolezni pri govedu je eno najzahtevnejših področij veterinarske patologije. Diagnostike respiratornih bolezni pri govedu se je potrebno lotiti kompleksno, z več diagnostičnimi orodji hkrati, in se hkrati zavedati, da nobena od diagnostičnih metod ni popolna.

Pri presoji rezultatov mora patolog vedno biti kritičen. Izkušnje so dobrodošle, a ne vsemogočne. Naj nas že večkrat videne spremembe ne prevzamejo in usmerijo v lahkotno in preuranjeno sklepanje. Pri delu bodimo racionalno skeptični, zavidljivo skrbni, z brezmejno širino presojanja.

»V patologiji je namreč vse mogoče.« (prof. dr. Leon Šenk)

6 SKLEPI

Z raztelesbo smo pri govedih iz skupine P najpogosteje ugotovili gnojno bronhopnevmonijo (28,3 %), bronhointersticijsko pljučnico (26,5 %) in fibrinozno bronhopnevmonijo (13,3 %). Delež čiste intersticijske pljučnice je bil 5,3 %.

Patomorfološka slika pljučnic pri govedu je zelo heterogena, saj smo pri 24,8 % patomorfološko pregledanih govedih iz skupine P pri isti živali ugotovili več različnih tipov pljučnic.

V pljučih govedi iz skupine P smo z RT-qPCR in s qPCR ugotavljali prisotnost BoHV-1, BPI3, BCV, BRSV, BVDV, BAdV, *H. somni*, *M. haemolytica*, *P. multocida* in *M. bovis*. Prisotnost bakterije *T. pyogenes* v pljučih govedi iz skupine P smo ugotavljali s klasično bakteriološko preiskavo. Z navedenimi preiskavami smo ugotovili vse naštete respiratorne patogene.

Pri govedu iz skupine Ž smo z RT-qPCR in s qPCR iz nosnih brisov, odvzetih v akutni fazi bolezni, ugotovili vse iskane respiratorne patogene: BoHV-1, BPI3, BCV, BRSV, BVDV, BAdV, *H. somni*, *M. haemolytica*, *P. multocida* in *M. bovis*. Prisotnosti bakterije *T. pyogenes* v nosnem brisu nismo ugotavljali.

Iz vzorcev pnevmonično spremenjenih pljuč poginulih govedi je ponavadi mogoče dokazati več različnih respiratornih patogenov hkrati. Pri simultnem dokazovanju 10 respiratornih patogenov v vzorcih pljuč govedi iz skupine P smo z molekularnimi metodami pri 95,7 % govedi ugotovili vsaj enega od iskanih respiratornih patogenov. Pri 75 % govedi smo v vzorcih pljuč ugotovili od dva do pet respiratornih patogenov. Največkrat smo ugotovili po dva respiratorna patogena na žival, največje število ugotovljenih patogenov pri eni živali pa je bilo sedem.

Čeprav smo iz vzorcev poginulih govedi iz pitovnih rej v povprečju ugotovili večje število različnih respiratornih patogenov (2,9) kot pri govedih iz mlečnih rej (2,5), razlike med skupinama niso bile statistično značilne.

Iz nosnih brisov klinično bolnih govedi iz pitovnih rej smo z RT-qPCR in s qPCR v povprečju ugotovili večje število različnih respiratornih patogenov (2,3) kot pri govedih iz mlečnih rej (0,9), razlika med skupinama pa je bila statistično značilna ($p = 0,00365$).

P. multocida je bila v pljučih govedi iz skupine P najpogosteje ugotovljeni bakterijski respiratorni patogen. Z molekularnimi metodami smo jo ugotovili v vzorcih pljuč 78,4 % govedi iz skupine P.

Bakterija *H. somni* je eden od najpomembnejših bakterijskih etioloških dejavnikov BRDC, saj smo jo z molekularnimi metodami ugotovili v vzorcih pljuč 31,0 % pregledanih govedi iz skupine P. Za ugotavljanje *H. somni* so molekularne diagnostične metode primernejše od klasične gojiščne bakteriološke diagnostike.

Z RT-qPCR in s qPCR smo nukleinsko kislino *M. bovis* ugotovili v vzorcih pljuč 19 % govedi iz skupine P, kar kaže na to, da je eden od pomembnejših respiratornih patogenov pri govedu.

Najpogosteje dokazani virusni respiratorni patogen je BRSV, ki smo ga z molekularnimi metodami dokazali v vzorcih pljuč 33,0 % govedi iz skupine P ter v nosnem brisu pri 40,1 % govedi iz skupine Ž, kar kaže na to, da je BRSV najpogostejši virusni povzročitelj BRDC v slovenskih rejah govedi. Po našem vedenju gre za prvi dokaz nukleinske kisline BRSV v Sloveniji.

Fibrinozno bronhopnevnijo, povzročeno z bakterijo *M. haemolytica*, smo pogosteje ugotovili pri govedu, starejšem od 24 mesecev, kot pa pri teletih in mladem govedu.

Povezava med patomorfološkimi spremembami, značilnimi za gnojno bronhopnevmonijo, in prisotnostjo respiratornih patogenov *H. somni*, *P. multocida* in BRSV je bila statistično značilna.

Povezava med patomorfološkimi spremembami, značilnimi za bronhointersticijsko pljučnico, in prisotnostjo respiratornega patogena BRSV je bila statistično značilna.

Negativna povezava med bronhointersticijsko pljučnico in bakterijama *M. haemolytica* in *T. pyogenes* je bila statistično značilna.

Z RT-qPCR in s qPCR smo v vzorcih pljuč 15,5 % poginulih govedi dokazali nukleinsko kislino BAdV. Po našem vedenju gre za prvi dokaz nukleinske kisline BAdV v Sloveniji.

V slovenskih rejah govedi je pojavnost BoHV-1 zelo nizka.

BVDV smo ugotovili v vzorcih pljuč 13 % govedi iz skupine P, pri čemer so bile patomorfološke spremembe na pljučih neznailne in diskretne.

Nosni brisi, odvzeti v akutni fazi bolezni, so primeren vzorec za molekularno diagnostiko BRDC pri klinično bolnih govedih.

Molekularna diagnostika respiratornih patogenov iz vzorcev pljuč govedi iz skupine P je zanesljivo potrditveno diagnostično orodje za ugotavljanje etiologije BRDC.

Primerjavo med molekularno diagnostiko in IHC smo opravili na podlagi primerjave rezultatov, dobljenih pri obeh metodah. Izračun koeficienta kappa po Cohenu je pokazal, da se rezultati obeh metod dobro ujemajo pri ugotavljanju BVDV, ne pa tudi pri ugotavljanju preostalih respiratornih patogenov.

7 POVZETEK

Raziskali smo etiologijo BRDC. Te smo se lotili z več različnimi diagnostičnimi metodami pri dveh skupinah govedi. V prvo skupino smo vključili 116 poginulih govedi iz 79 različni čred, pri katerih smo z raztelesbo ugotovili pljučnico. Na podlagi makroskopske ocene patoanatomskih sprememb na pljučih smo največkrat ugotovili bronhopnevmonijo (51,7 %), intersticijsko pljučnico pri 37,9 %, embolično pljučnico pri 1,7 % in kombinacijo bronhopnevmonije in intersticijske pljučnice pri 8,6 % poginulih govedi. Po razdelitvi osnovnih tipov pljučnic na podtipove smo ugotovili: gnojno bronhopnevmonijo pri 44,0 %, bronhointersticijsko pljučnico pri 32,8 %, fibrinozno bronhopnevmonijo pri 7,8 %, intersticijsko pljučnico pri 5,2 % in embolično pljučnico pri 1,7 % raztelešenih govedi. Pri 8,6 % raztelešenih govedi smo ugotovili kombinacijo bronhopnevmonije in intersticijske pljučnice.

Za natančnejšo klasifikacijo patoloških sprememb smo opravili patohistološko preiskavo vzorcev pljuč. Pri 113 patohistološko pregledanih govedih smo najpogosteje ugotovili gnojno bronhopnevmonijo (28,3 %). Bronhointersticijsko pljučnico smo ugotovili pri 26,5 % govedi, fibrinozno pri 13,3 % govedi in intersticijsko pljučnico pri 5,3 % patohistološko pregledanih govedi. Delež kombiniranih tipov pljučnic je skupaj predstavljal 24,8 % patohistološko pregledanih govedi.

Na vzorcu kranialnega pljučnega režnja naključno izbranih govedi iz skupine P smo opravili IHC na šest potencialnih povzročiteljev pljučnic pri govedu. Največji delež pozitivnih vzorcev smo ugotovili pri ugotavljanju bakterije *M. bovis* (39,8 %), sledijo BAdV (28,1 %), BRSV (22,8 %), BPI3 (14,3 %). BVDV smo ugotovili pri 6,0 % pregledanih govedi, BoHV-1 pa pri 1,0 % IHC pregledanih govedi.

Opravili smo bakteriološko preiskavo pljuč 107 govedi iz skupine P. Najpogosteje izolirana bakterija je bila *P. multocida*, saj smo jo izolirali pri 25,2 % bakteriološko pregledanih govedi. Bakterijo *M. haemolytica* smo izolirali iz vzorcev pljuč 11 bakteriološko pregledanih govedi iz skupine P (10,3 %). Bakterijo *T. pyogenes* smo ugotovili pri 22,4 % govedi iz skupine P. Bakterijo *H. somni* smo izolirali iz pljuč enega bakteriološko pregledanega goveda (0,9 %). Koliformne bakterije smo izolirali iz pljuč 19 bakteriološko pregledanih govedi iz skupine P (17,8 %).

Iz vzorcev pljuč 115 govedi iz skupine P smo opravili IVCK. CPE smo ugotovili le pri 6 vzorcih (5,2 %) pljuč govedi iz skupine P. Z IF smo v dveh primerih dokazali BoHV-1 in v štirih primerih BPI3.

Pri 115 govedih iz skupine P smo z RT-qPCR in s qPCR ugotavljali 10 različnih respiratornih patogenov. Bakterijo *P. multocida* smo ugotovili pri 79,1 % govedi, BRSV pri 33,0 % govedi, *H. somni* pri 31,3 % govedi, *M. bovis* pri 19,1 % govedi, *M. haemolytica* pri 19,1 % govedi, BAdV pri 15,7 % govedi, BVDV pri 13,0 % govedi, BCV pri 11,3 % govedi, BPI3 pri 6,1 % govedi in BoHV-1 pri 1,7 % govedi.

Z RT-qPCR in s qPCR ter z gojiščno bakteriološko preiskavo smo v istem vzorcu pljuč najpogosteje ugotovili več respiratornih patogenov hkrati. Pri 31,6 % govedi iz skupine P smo ugotovili dva patogene, pri 26,5 % tri patogene, pri 16,3 % štiri patogene, pri 14,3 % en patogen, pri 6,1 % govedi pet patogenov, pri 2 % govedi šest patogenov in pri 1,0 % govedi sedem patogenov. Pri 2,0 % govedi nismo ugotovili nobenega respiratornega patogena.

Raziskovanje etiologije BRDC smo dopolnili z ugotavljanjem respiratornih patogenov pri 137 klinično bolnih govedih (skupina Ž) iz 28 različnih rej. V nosnem brisu smo bakterijo *P. multocida* ugotovili pri 59,9 % govedi, BRSV pri 40,1 % govedi, *M. haemolytica* pri 14,6 % govedi, BCV pri 11,7 % govedi, *M. bovis* pri 10,9 %, *H. somni* pri 9,5 % govedi, BPI3 pri 3,6 % govedi, BVDV pri 1,5 % govedi in BoHV-1 pri 0,7 % govedi ter BAdV pri 0,7 % govedi.

Iz krvnih vzorcev 84 govedi iz skupine Ž smo opravili serološko diagnostiko na protitelesa proti sedmim respiratornim povzročiteljem. Na BPI3 je bilo serološko pozitivnih 56,8 % vzorcev, na BAdV 54,5 %, na BRSV 31,8 %, na *M. bovis* 19,3 %, BoHV-1 11,4 %, BVDV 10,2 % in na *M. haemolytica* 6,8 % preiskanih vzorcev.

8 SUMMARY

We examined the aetiology of BRDC with different diagnostic methods in two cattle groups. The first group consisted of 116 dead cattle with pathologically diagnosed pneumonia from 79 different herds. Based on gross pathological lesions in lungs we mostly found bronchopneumonia (51.7%), interstitial pneumonia in 37.9%, embolic pneumonia in 1.7% and combination of bronchopneumonia and interstitial pneumonia in 8.6% of dead cattle. We categorised the types of pneumonia into subtypes, among which we most commonly found purulent bronchopneumonia (44.0%). Bronchointerstitial pneumonia was found in 32.8%, fibrinous bronchopneumonia in 7.8%, interstitial pneumonia in 5.2%, embolic pneumonia in 1.7% and the combination of two different types of pneumonia in 8.6% of pathologically examined cattle of the first group.

For a more precise classification of pneumonia we used a histopathological examination of lung samples. We found purulent bronchopneumonia in 28.3%, bronchointerstitial pneumonia in 26.5%, fibrinous bronchopneumonia in 13.3%, interstitial pneumonia in 5.3% and the combination of two different types of pneumonia in 24.8% of 113 histopathologically examined cattle of the first group.

On lung samples of randomly chosen animals from the first group, we tested six respiratory pathogens with the IHC method. Among positive samples we found *M. bovis* (39.8%), BAdV (28.1%), BRSV (22.8%) and BPI3 (14.3%). We found BVDV in 6.0% and BoHV-1 in 1.0% of examined cattle.

In 107 cattle from the first group, we made bacteriological examination of the lung. The bacteria most commonly isolated was *P. multocida* (25.2%), followed by *T. pyogenes* (22.4%), *M. haemolytica* (10.3%) and *H. somni* being isolated in 0.9% of bacteriologically examined animals. Coliform bacteria were isolated in 17.8% of examined cattle.

From lung samples of 115 cattle from the first group, we made the virus isolation on cell culture. The CPE was found in 5.2% of the samples. With immunofluorescence, we confirmed the BoHV-1 in two cases and the BPI3 in four cases.

From the same lung samples we examined 10 different respiratory pathogens, using the RT-qPCR and qPCR methods. *P. multocida* was found in 79.1%, BRSV in 33.0%, *H. somni* in 31.3%, *M. bovis* in 19.1%, *M. haemolytica* in 19.1%, BAdV in 15.7%, BVDV in 13.0%, BCV in 11.3%, BPI3 in 6.1% and BoHV-1 in 1.7% of the cattle from the first group.

The number of different respiratory pathogens in the same lung sample was detected with RT-qPCR, qPCR and classical cultural bacteriological examination. A single pathogen was detected only in 14.3% of examined samples. We mostly detected several respiratory pathogens in the same lung sample. Two pathogens were detected in 31.6%, three in 26.5%, four in 16.3%, five in 6.1%, six in 2.0% and seven pathogens in 1.0% of examined samples. In 2% of lung samples we did not detect any respiratory pathogens.

The examination of the aetiology of BRDC was also made in the second group, consisting of 137 ill cattle with clinical symptoms of BRDC, originating from 28 different herds. We examined same respiratory pathogens using the RT-qPCR and qPCR methods from nasal swabs. *P. multocida* was found in 59.9%, BRSV in 40.1%, *M. haemolytica* in 14.6%, BCV in 11.7%, *M. bovis* in 10.9%, *H. somni* in 9.5%, BPI3 in 3.6%, BVDV in 1.5%, BoHV-1 in 0.7% and BAdV in 0.7% of the cattle from the second group.

From blood samples of 84 cattle from the second group, we made a serological diagnostics of seven different respiratory pathogens. BPI3 was positive in 56.8%, BAdV in 54.5%, BRSV in 31.8%, *M. bovis* in 19.3%, BoHV-1 in 11.4%, BVDV in 10.2% and *M. haemolytica* in 6.8% of examined samples.

9 ZAHVALA

Najprej se iskreno zahvaljujem svojemu mentorju in dolgoletnem učitelju, zaslužnem prof. dr. Milanu Pogačniku, ki mi je davnega leta 1994 dal priložnost, da kot pripravnik prestopim prag takratnega Inštituta za patologijo, sodno in upravno veterinarstvo VF, kjer sem pozneje, kot sam pravi, »gor zrasu«.

Hvala somentorju prof. dr. Petru Hostniku za idejo, pomoč, izkušnje, potrpljenje in za razumevanje.

Velika hvala dr. Ivanu Toplaku za vrhunsko opravljeno molekularno diagnostiko, za pomoč pri mojih prvih korakih v vesolju PCR-ja, za nesebičen odnos in zaupanje.

Hvala dr. Danijeli Rihtarič, Poloni Žagar in Nataliji Novak za izvedbo nekaterih molekularnih testov. Hvala Meliti Žlindra za opravljeno delo pri serologiji.

Hvala kolegom na IMP, ki so mi nesebično pomagali pri nalogi in opravili bakteriološko diagnostiko. Predvsem hvala kolegici in sotrpinki mag. Jasni Mičunovič za vedno odprta vrata laboratorija. Hvala tudi dr. Tini Pirš, dr. Igorju Gruntarju, Nataši Peterka in Maji Kavalič.

Hvala Žani, Igorju, Urbanu in Jožetu, prijaznemu osebju Sprejemnice vzorcev, ki mi je pomagalo pri centrifugiranju in pipetiranju krvnih vzorcev.

Najlepša hvala veterinarjem praktikom z različnih koncev Slovenije, ki so mi pomagali pri odvzemu materiala na terenu: Miranu Kukovici, Jožetu Matavžu, Ivanu Amonu, Franciju Leskovcu, Darku Novaku, Jerneju Poglajnu, Ivanu Gačniku, Matiji Čakšu, Jaki Kastelcu, Tadeju Kogovšku, Petri Bandelj in Francetu Briškiju.

Iskrena hvala doc. dr. Tanji Švara za pomoč pri izvedbi imunohistokemije in za strokovne pripombe na področju patohistologije.

Najlepša hvala lektorici, ga. Marjani Jus, za zelo natančno opravljeno delo in potrpežljivost.

Hvala mag. Brigiti GreCs-Smole za popravke pri seznamu literature.

Hvala znan. svet.dr. Vesni Cerkenik Flajs za pregled angleškega teksta.

Hvala kolegici Tanji Knific za učne ure iz statistike in za pomoč pri statističnih izračunih.

Hvala fantom iz VHS Ljubljana, ki so me v obdobjih pljučnic zasovali s kadavri smrkavih govejih pitancev. Posebna hvala tistim, ki so mi pomagali secirati: Matjažu Kropivniku, Janezu Pipanu, Roku Trilerju in Marku Božnarju.

Iskrena in velika hvala fantoma iz laboratorija IPDRČ, Benjaminu Cerku in ambasadorju tkivnih rezin Juretu Omahnu, za pomoč pri izdelavi »morja« patohistoloških preparatov ter dobro družbo.

Hvala doc. dr. Mitji Gombaču za strokovne diskusije.

Hvala sodelavcem Vasiliju Cociancichu, Špeli Vidrih in Meri Culjkar, ki so v konici dokončanja naloge prevzeli večino mojega vsakodnevnega dela na NVI.

Hvala prof. dr. Leonu Šenku, prvovrstnemu učitelju patološke morfologije.

Hvala Veterinarski fakulteti v Ljubljani.

Hvala očetu in mami za vse.

Hvala mojim najdražjim: Izaku, Mii in Kristini.

Hvala vsem tistim, brez katerih tega dela ne bi mogel ne začeti ne končati.

10 LITERATURA

1. Agnes JT, Zekarias B, Shao M, Anderson ML, Gershwin LJ, Corbeil LB. Bovine respiratory syncytial virus and *Histophilus somni* interaction at the alveolar barrier. *Infect Immun* 2013; 81(7): 2592–7.
2. Andrews JJ, Anderson TD, Slife LN, Stevenson GW. Microscopic lesions associated with the isolation of *Haemophilus somnus* from pneumonic bovine lungs. *Vet Pathol* 1985; 22 (2): 131–6.
3. Autio T, Pohjanvirta T, Holopainen R, et al. Etiology of respiratory disease in non-vaccinated, non-medicated calves in rearing herds. *Vet Microbiol* 2007; 119(2/4): 256–65.
4. Bank WJ. *Applied veterinary histology*. 3rd ed. St. Louis : Mosby-Year Book, 1993: 24, 390–404.
5. Bell CJ, Blackburn P, Elliott M, et al. Investigation of polymerase chain reaction assays to improve detection of bacterial involvement in bovine respiratory disease. *J Vet Diagn Invest* 2014; 26(5): 631–4.
6. Blodörn K, Hägglund S, Gavier-Widen D, et al. A bovine respiratory syncytial virus model with high clinical expression in calves with specific passive immunity. *BMC Vet Res* 2015; 11: e76 (1–14). doi:10.1186/s12917-015-0389-6
7. Bolin SR. Bovine viral diarrhoea virus in mixed infection. In: Brogden KA, Guthmiller JM, eds. *Polymicrobial diseases*. Washington: ASM Press, 2002. Chapter 3. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2491/> (julij 2019)
8. Booker CW, Abutarbush M, Morley PS, et al. Microbiological and histopathological findings in cases of fatal bovine respiratory disease of feedlot cattle in western Canada. *Can Vet J* 2008; 49: 473–81.
9. Brooks KR, Raper KC, Ward CE, Holland BP, Krehbiel CR, Step DL. Economic effects of bovine respiratory disease on feedlot cattle during backgrounding and finishing phases1. *Prof Anim Sci* 2011; 27(3): 195–203.
10. Brownlie J, Clarke MC, Howard CJ, Pocock DH. Pathogenesis and epidemiology of bovine diarrhoea virus infection of cattle. *Ann Rech Vét* 1987; 18(2): 157–66.
11. Bryson DG, McConnell S, McAliskey M, McNulty MS. Ultrastructural features of alveolar lesions in induced respiratory syncytial virus pneumonia of calves. *Vet Pathol* 1991; 28: 286–92.
12. Buhman MJ, Perino LJ, Galyean ML, Wittum TE, Montgomery TH, Swingle RS. Association between changes in eating and drinking behaviors and respiratory tract disease in newly arrived calves at a feedlot. *Am J Vet Res* 200; 61: 1163–8.
13. Carroll JA, Forsberg NE. Influence of stress and nutrition on cattle immunity. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 2007; 23(1): 105–49.
14. Caswell JL, Archambault M. *Mycoplasma bovis* pneumonia in cattle. *Anim Health Res Rev* 2007; 8(2): 161–86.

15. Caswell JL, Williams KJ. Respiratory system. In: Jubb KVF, Kennedy PC, Palmer N, eds. Pathology of domestic animals. St. Louis : Elsevier, 2016: 465–591.
16. Caswell JL. Failure of respiratory defense in the pathogenesis of bacterial pneumonia of cattle. Vet Pathol 2014; 51(2): 393–409.
17. Ceribasi AO, Ozkaraca M, Ceribasi S, Ozer H. Histopathologic, immunoperoxidase and immunofluorescent examinations on natural cattle pneumonia originated from parainfluenza type 3, respiratory syncytial virus, adenovirus type 3 and hepesvirus type 1. Rev Med Vet 2014; 165(7/8): 201–12.
18. Collins PL, Chanock RM, McIntosh K. Parainfluenza viruses. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, et al., eds. Fields virology. 3rd ed. Philadelphia : Lippincott-Raven Publishers, 1996: 1205–43.
19. Corbeil LB. *Histophilus somni* host–parasite relationships. Anim Health Res Rev 2007; 8: 151–60.
20. Dabo SM, Taylor JD, Confer AW. *Pasteurella multocida* and bovine respiratory disease. Anim Health Res Rev 2007; 8(2): 129–50.
21. Decaro N, Campolo M, Desario C, et al. Respiratory disease associated with bovine coronavirus infection in cattle herds in Southern Italy. J Vet Diagn Invest 2008; 20: 28–32.
22. Hodgins DC, Conlon JA, Shewen PE. Respiratory viruses and bacteria in cattle. In: Brogden KA, Guthmiller JM, eds. Polymicrobial diseases. Washington : ASM Press, 2002: Chapter 12. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2480/> (julij 2019)
23. Doyle D, Credille B, Lehenbauer TW, et al. Agreement among 4 sampling methods to identify respiratory pathogens in dairy calves with acute bovine respiratory disease. J Vet Intern Med 2017; 31(3): 954–9.
24. Dungworth DL. The respiratory system. In: Jubb KVF, Kennedy PC, Palmer N, eds. Pathology of domestic animals. San Diego : Academic Press, 1993: 539–699.
25. Ellis J. Update on viral pathogenesis in BRD. Anim Health Res Rev 2009; 10(2): 149–53.
26. Elvander M. Severe respiratory disease in dairy cows caused by infection with bovine respiratory syncytial virus. Vet Rec 1996; 138: 101–5.
27. Fulton RW, Blood KS, Panciera RJ, et al. Lung pathology and infectious agents in fatal feedlot pneumonias and relationship with mortality, disease onset, and treatments. J Vet Diagn Invest 2009; 21(4): 464–77.
28. Fulton RW, Confer AW. Laboratory test descriptions for bovine respiratory disease diagnosis and their strengths and weaknesses: gold standards for diagnosis, do they exist?. Can Vet J 2012; 53(7): 754–61.
29. Fulton RW, Whitley EM, Johnson BJ, et al. Prevalence of bovine viral diarrhea virus (BVDV) in persistently infected cattle and BVDV subtypes in affected cattle in beef herds in south central United States. Can J Vet Res 2009; 73(4): 283–91.
30. Gagea MI, Bateman KG, van Dreumel T, et al. Diseases and pathogens associated with mortality in Ontario beef feedlots. J Vet Diagn Invest 2006; 18(1): 18–28.

31. Garcia MD, Thallman RM, Wheeler TL, Shackelford SD, Casas E. Effect of bovine respiratory disease and overall pathogenic disease incidence on carcass traits. *J Anim Sci* 2010; 88: 491–6.
32. Giomarelli P, Scolletta S, Borrelli E, Biagioli B. Myocardial and lung injury after cardiopulmonary bypass: role of interleukin (IL)-10. *Ann Thorac Surg* 2003; 76: 117–23.
33. Gogolewski RP, Leathers CW, Liggitt HD, Corbei B. Experimental *Haemophilus somnus* pneumonia in calves and immunoperoxidase localization of bacteria. *Vet Pathol* 1987; 24: 250–6.
34. Graham DA, Calvert V, Benkő M, et al. Isolation of bovine adenovirus serotype 6 from a calf in the United Kingdom. *Vet Rec* 2005; 156: 82–6.
35. Griffin JFT. Stress and immunity: a unifying concept. *Vet Immunol Immunopathol* 1989; 20: 263–312.
36. Haines DM, Martin KM, Clark EG, Jim GK, Janzen ED. The immunohistochemical detection of *Mycoplasma bovis* and bovine viral diarrhea virus in tissues of feedlot cattle with chronic, unresponsive respiratory disease and/or arthritis. *Can Vet J* 2001; 42: 857–60.
37. Härtel H, Nikunen S, Neuvonen E, et al. Viral and bacterial pathogens in bovine respiratory disease in Finland. *Acta Vet Scand* 2004; 45: 193–200.
38. Hasoksuz M, Lathrop SL, Gadfield KL, Saif LJ. Isolation of bovine respiratory coronaviruses from feedlot cattle and comparison of their biological and antigenic properties with bovine enteric coronaviruses. *Am J Vet Res* 1999; 60: 1227–33.
39. Hostnik P., Železnik Z., Piškal I, Grom J., Valenčak Z. Indirektni imunofluorescenčni test (IF) za ugotavljanje protiteles proti govejemu respiratornemu sincicialnemu virusu. *Zb Vet fak* 1990; 27, 1: 57–64.
40. Hostnik P., Železnik Z. Serološka študija IBR-IPV okužbe v rejah bikovskih mater. *Vet nov* 1992a; 18, 3: 89–92.
41. Hostnik P., Železnik Z. Izbruh okužbe IBR v dveh pitališčih goved. *Zb Vet fak* 1992b; 29, 1: 53–7.
42. Hostnik P., Železnik Z, Grom J. Kontrola okužbe z virusom IBR/IPV pri govedu. *Zb Vet fak* 1995; 32, 1: 13–20.
43. Hostnik P., Grom J. Laboratorijska diagnostika in kontrola okužb z virusom IBR/IPV. *Zb Vet fak* 1997; 34, 1: 33–8.
44. Hostnik P. Respiratorni sincicialni virus pri govedu. Ljubljana: Veterinarska fakulteta UL, 1992. Doktorska disertacija.
45. Hostnik P, Železnik Z, Piškal I, Grom J., Valenčak Z. Indirektni imunofluorescenčni test (IF) za ugotavljanje protiteles proti govejemu respiratornemu sincicialnemu virusu. *Zb Vet fak UL* 1990; 27(1): 57–64.
46. Hotchkiss EJ, Dagleish MP, Willoughby K, et al. Prevalence of *Pasteurella multocida* and other respiratory pathogens in the nasal tract of Scottish calves. *Vet Rec* 2010; 167: 555–60.

-
47. Jensen R, Pierson RE, Braddy PM et al. Shipping fever pneumonia in yearling feedlot cattle. *J Am Vet Med Assoc* 1976; 169(5): 500-6.
 48. Jolly S1, Detilleux J, Desmecht D. Extensive mast cell degranulation in bovine respiratory syncytial virus-associated paroxysmic respiratory distress syndrome. *Vet Immunol Immunopathol* 2004; 97(3/4): 125-36.
 49. Jones C, Chowdhury S. Bovine herpesvirus type 1 (BHV-1) is an important cofactor in the bovine respiratory disease complex. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 2010; 26(2): 303-21.
 50. Jung K, Alekseev KP, Zhang X, Cheon DS, Vlasova AN, Saif LJ. Altered pathogenesis of porcine respiratory coronavirus in pigs due to immunosuppressive effects of dexamethasone: implications for corticosteroid use in treatment of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *J Virol* 2007; 81:13681-93.
 51. Kapikian AZ, Mitchell RH, Chanock RM, Ruth A, Shvedoff RA, Stewart CE. An epidemiologic study of altered clinical reactivity to respiratory syncytial (RS) virus infection in children previously vaccinated with an inactivated RS virus vaccine. *Am J Epidemiol* 1969; 89(4): 405-21.
 52. Kim HW, Canchola JG, Brandt CD, et al. Respiratory syncytial virus disease in infants despite prior administration of antigenic inactivated vaccine. *Am J Epidemiol* 1969; 89(4): 422-34.
 53. Kirby FD, Nicholas RA. Isolation of *Mycoplasma bovis* from bullocks' eyes. *Vet Rec* 1996; 138(22): 552.
 54. Klein M, Earley E, Zellat J. Isolation from cattle of a virus related to human adenovirus. *Proc Soc Exp Biol Med* 1959; 102: 1-4.
 55. Klima CL, Zaheer R, Cook SR, et al. Pathogens of bovine respiratory disease in North American feedlots conferring multidrug resistance via integrative conjugative elements. *J Clin Microbiol* 2014; 52(2): 438-48.
 56. Kovács F. Állathigiénia. Budapest : Mezőgazdasági kiadó, 1990: 111-47.
 57. Kumar Pr, Yadav A, Yadav R, Kumar Pa, Diwakar RP. Bovine respiratory disease complex: a review. *Int J Curr Microbiol App Sci* 2018; 7(12): e352-8. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2018.712.043>
 58. Larsen LE, Tegtmeier C, Pedersen E. Bovine respiratory syncytial virus (BRSV). Pneumonia in beef calf herds despite vaccination. *Acta Vet Scand* 2001; 42: 113-21.
 59. Lathrop SL, Wittum TE, Brock KV, et al. Association between infection of the respiratory tract attributable to bovine coronavirus and health and growth performance of cattle in feedlots. *Am J Vet Res* 2000; 61: 1062-6.
 60. Lillie LE. The bovine respiratory disease complex. *Can Vet J* 1974; 15(9): 233-42.
 61. Liu L, Häggglund S, Hakhverdyan M, Alenius S, Larsen LE, Belák S. The rest of the ORFs encode unknown or less-characterized nonstructural proteins. Molecular epidemiology of bovine coronavirus on the basis of comparative analyses of the S gene. *J Clin Microbiol* 2006; 44(3): 957-60.
 62. Loneragan GH, Dargatz DA, Morley PS, Smith MA. Trends in mortality ratios among cattle in US feedlots. *J Am Vet Med Assoc* 2001; 219(8): 1122-7.

-
63. Lopez A. Respiratory system, mediastinum and pleurae. In: Zachary J, McGavin M, eds. Pathologic basis of veterinary disease. 5th ed. St. Louis : Mosby, 2011: 458–538.
 64. Ribeiro MG, Riseti RM, Bolaños CAD, et al. *Trueperella pyogenes* multispecies infections in domestic animals: a retrospective study of 144 cases (2002 to 2012). Vet Q 2015; 35(2): 82–7.
 65. MacLachlan NJ, Dubovi EJ. Fenner's veterinary virology. 5th ed. London : Academic Press, Elsevier, 2017: 189–216.
 66. Maunsell F, Woolums A, Francoz D, et al. *Mycoplasma bovis* infections in cattle. J Vet Intern Med 2011; 25: 772–83.
 67. Murray GM, More SJ, Sammin D, et al. Pathogens, patterns of pneumonia, and epidemiologic risk factors associated with respiratory disease in recently weaned cattle in Ireland. J Vet Diagn Invest 2017; 29(1): 20–34.
 68. Murray GM, More SJ, Clegg TA, et al. Risk factors associated with exposure to bovine respiratory disease pathogens during the peri-weaning period in dairy bull calves. BMC Vet Res 2018; 14(1): e53. doi:10.1186/s12917-018-1372-9
 69. Nagaraja TG. Arcanobacterium. In: McVey DS, Kennedy M, Chengappa MM, eds. Veterinary microbiology. 3rd ed. Ames : Wiley-Blackwell, 2013: 203–5.
 70. Nandi S, Kumar M, Manohar M, Chauhan RS. Bovine herpes virus infections in cattle. Anim Health Res Rev 2009; 10: 85–98. doi:10.1017/S1466252309990028
 71. Narita M, Yamada M, Tsuboi T, Kawashima K. Immunohistopathology of calf pneumonia induced by endobronchial inoculation with bovine adenovirus 3. Vet Pathol 2002; 39(5): 565–71.
 72. Narita M, Yamada M, Tsuboi T, Kawashima K. Bovine adenovirus type 3 pneumonia in dexamethasone-treated calves. Vet Pathol 2003; 40(2): 128–135.
 73. Nicholas RA, Ayling RD. Mycoplasma bovis: disease, diagnosis, and control. Res Vet Sci 2003; 74(2): 105–12.
 74. Nuotio L, Neuvonen E, Hyytiäinen M. Epidemiology and eradication of infectious bovine rhinotracheitis/infectious pustular vulvovaginitis (IBR/IPV) virus in Finland. Acta Vet Scand 2007; 49(1): e3. doi:10.1186/1751-0147-49-3
 75. Oma VS, Tråvén M, Alenius S, Myrmel M, Stokstad M. Bovine coronavirus in naturally and experimentally exposed calves; viral shedding and the potential for transmission. Virol J 2016; 13: e100 <https://doi.org/10.1186/s12985-016-0555-x>
 76. Paller T, Hostnik P, Toplak I, Pogačnik M. The prevalence of ten pathogens detected by a real time PCR method in nasal swab samples collected from live cattle with respiratory disease. Slo Vet Res 2017; 54(3): 101–7.
 77. Panciera RJ, Confer AW. Pathogenesis and pathology of bovine pneumonia. Vet Clin North Am Food Anim Pract 2010; 26(2): 191–214.
 78. Pardon B, De Bleecker K, Dewulf J, et al. Prevalence of respiratory pathogens in diseased, non-vaccinated, routinely medicated veal calves. Vet Rec 2011; 169(11): 278.

-
79. Parker AM, Sheehy PA, Hazelton MS, Bosward KL, House JK. A review of mycoplasma diagnostics in cattle. *J Vet Intern Med* 2018; 32(3): 1241–52. doi:10.1111/jvim.15135
 80. Pevec J. Virusne pljučnice pri mladem pitanem govedu na Ptujsko-Dravskem polju. Veterinarska fakulteta, 1993. Magistrsko delo.
 81. Pfützner H, Sachse K. *Mycoplasma bovis* as an agent of mastitis, pneumonia, arthritis and genital disorders in cattle. *OIE Rev Sci Tech* 1996; 15(4): 1477–94.
 82. Poulsen KP, McGuirk SM. Respiratory disease of the bovine neonate. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 2009; 25: 121–37
 83. R Core Team. R: a language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing, 2018.
<http://www.R-project.org>. (junij, 2019)
 84. Radaelli E, Luini M, Loria GR, Nicholas RAJ, Scanzani E. Bacteriological, serological, pathological and immunohistochemical studies of *Mycoplasma bovis* respiratory infection in veal calves and adult cattle at slaughter. *Res Vet Sci* 2008; 85: 282–90.
 85. Ramírez-Romero R, Nevárez-Garza AM, Rodríguez-Tovar LE, Wong-González A, Ledezma-Torres RA, Hernández-Vidal G. Histopathological analogies in chronic pulmonary lesions between cattle and humans: basis for an alternative animal model. *Sci World J* 2012; 2012: e647403. doi:10.1100/2012/647403
 86. Rehmtulla AJ, Thomson RG. A Review of the Lesions in Shipping Fever of Cattle. *Can Vet J* 1981; 22(1): 1–8.
 87. Rice JA, Carrasco-Medina L, Hodgins DC, Shewen PE. *Mannheimia haemolytica* and bovine respiratory disease. *Anim Health Res Rev* 2007; 8(2): 117–28.
 88. Rigler L. Anatomija domačih živali. Ljubljana : Oddelek za veterinarstvo BF, 1987
 89. Rijsewijk AM, Kaashoek MJ, Langeveld PM, et al. Epitopes on glycoprotein C of bovine herpesvirus-1 (BHV-1) that allow differentiation between BHV-1.1 and BHV-1.2 strains. *J Gen Virol* 1999; 80: 1477–83.
 90. Rodriguez-Castillo JL et al. Detection and economic impact related to bovine respiratory disease, shrink, and traveling distance in feedlot cattle in Northwest Mexico. *Turk J Vet Anim Sci* 2017; 41: 294–301
 91. Rosendal S, Martin SW. The association between serological evidence of mycoplasma infection and respiratory disease in feedlot calves. *Can J Vet Res* 1986; 50(2): 179–83.
 92. Rusvai M, Fodor L. Occurrence of some viruses and bacteria involved in respiratory diseases of ruminants in Hungary. *Acta Vet Hung* 1998; 46(4): 405–14.
 93. Rusvai M, Glávits R, Kucsera L, Belák S. Experimental infection of weaned calves and lambs with two strains of bovine adenovirus type 2. *Zentralbl Veterinarmed B* 1993; 40(2): 148–54.
 94. Sacco RE, McGill JL, Pillatzki AE, Palmer MV, Ackermann MR. Respiratory syncytial virus infection in cattle. *Vet Pathol* 2014; 51(2): 427–36.

-
95. Saif L J. Bovine respiratory coronavirus. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 2010; 26(2): 349–64.
 96. Schiefer B, Ward GE, Moffatt RE. Correlation of microbiological and histological findings in bovine fibrinous pneumonia. *Vet Pathol* 1978;15(3): 313–21.
 97. Schmidt AC, McAuliffe JM, Huang A, et al. Bovine parainfluenza virus type 3 (BPIV3) fusion and hemagglutinin-neuraminidase glycoproteins make an important contribution to the restricted replication of BPIV3 in primates. *J Virol* 2000; 74(19): 8922–9.
 98. Schreiber P, Matheise JP, Dessy F, et al. High mortality rate associated with bovine respiratory syncytial virus (BRSV) infection in Belgian white blue calves previously vaccinated with an inactivated BRSV vaccine *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 2000; 47: 535–50.
 99. Shahriar FM, Clark EG, Janzen E, West K, Wobeser G. Coinfection with bovine viral diarrhea virus and *Mycoplasma bovis* in feedlot cattle with chronic pneumonia. *Can Vet J* 2002; 43(11): 863–8.
 100. Singh K, Ritchey JW, Confer AW. *Mannheimia haemolytica*: bacterial-host interactions in bovine pneumonia. *Vet Pathol* 2011; 48 (2): 338–48.
 101. 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.
 102. Snowden GD, Van Vleck LD, Cundiff V, Bennett L, Koohmaraie M. Bovine respiratory disease in feedlot cattle: phenotypic, environmental, and genetic correlations with growth, carcass, and longissimus muscle palatability traits. *J Anim Sci* 2007; 85(8): 1885–92.
 103. Sorden SD, Kerr RW, Janzen ED. Interstitial pneumonia in feedlot cattle: concurrent lesions and lack of immunohistochemical evidence for bovine respiratory syncytial virus infection. *J Vet Diagn Invest* 2000; 12: 510–7.
 104. Storz J, Lin X, Purdy CHW, et al. Coronavirus and *Pasteurella* infections in bovine shipping fever pneumonia and Evans' criteria for causation. *J Clin Microbiol* 2000b; 38(9): 3291–8.
 105. Storz J, Purdy CW, Lin X, et al. Isolation of respiratory bovine coronavirus, other cytotoxic viruses, and *Pasteurella* spp from cattle involved in two natural outbreaks of shipping fever. *J Am Vet Med Assoc* 2000a; 216(10): 1599–604.
 106. Strait EL, Madsen ML. Mollicutes. In: McVey DS, Kennedy M, Chengappa MM, eds. *Veterinary microbiology*. 3rd ed. Ames : Wiley-Blackwell, 2013: 283–92.
 107. Sudaryatma PE, Nakamura K, Mekata H, et al. Bovine respiratory syncytial virus infection enhances *Pasteurella multocida* adherence on respiratory epithelial cells. *Vet Microbiol* 2018; 220: 33–8.
 108. Szeredi L, János Sz, Pálfi V. Microbiological and pathological examination of fatal calf pneumonia cases induced by bacterial and viral respiratory pathogens. *Acta Vet Hung* 2010; 58(3): 341–56.

109. Taylor JD, Fulton RW, Lehenbauer TW, Step DL, Confer AW. The epidemiology of bovine respiratory disease: what is the evidence for predisposing factors? *Can Vet J* 2010; 51(10): 1095–102.
110. Tegtmeier C, Uttenthal A, Friis NF, Jensen NE, Jensen HE. Pathological and microbiological studies on pneumonic lungs from Danish calves. *J Vet Med B* 1999; 46: 693–700.
111. Thomas A, Dizier I, Trolin A, et al. Isolation of *Mycoplasma* species from the lower respiratory tract of healthy cattle and cattle with respiratory disease in Belgium. *Vet Rec* 2002; 151: 472–6.
112. Thomas CJ, Hoet AE, Sreevatsan S, et al. Transmission of bovine coronavirus and serologic responses in feedlot calves under field conditions. *Am J Vet Res* 2006; 67: 1412–20.
113. Thonur L, Maley M, Gilray J, et al. One-step multiplex real time RT-PCR for the detection of bovine respiratory syncytial virus, bovine herpesvirus 1 and bovine parainfluenza virus 3. *BMC Vet Res* 2012; 8: e37(1–9). doi:10.1186/1746-6148-8-37
114. Tizard IR. *Veterinary immunology: an introduction*. 8th ed. St. Louis : Saunders Elsevier, 2009: 239–54.
115. Tjørnehøj K, Uttenthal A, Viuff B, Larsen LE, Røntved C, Rønsholt L. An experimental infection model for reproduction of calf pneumonia with bovine respiratory syncytial virus (BRSV) based on one combined exposure of calves. *Res Vet Sci* 2003; 74: 55–65.
116. Toplak I, Barlič Maganja D, Hostnik P, Grom J. Ugotavljanje perzistentnih izločevalcev virusa bovine virusne diareje (BVD) v serološko pozitivnih rejah bikovskih mater v Sloveniji. *Vet nov* 2001; 27., 3: 97–102.
117. Toplak I, Hostnik P, Barlič Maganja D, Grom J. Spremljanje prevalence infekcij z virusom bovine virusne diareje (BVD) v rejah bikovskih mater v Sloveniji med letoma 1997 in 2001. *Vet nov* 2002; 28, 10: 397–404.
118. Toplak I, Hostnik P, Barlič Maganja D, Grom J. Bovina virusna diareja genotipa 2 (BVD-2): nova nevarnost za slovenske reje. *Vet nov* 2004; 30, 1: 5–9.
119. Toplak I. Molekularna epidemiologija bovine virusne diareje (BVD) v slovenskih plemenskih rejah govedi. Veterinarska fakulteta Ljubljana, 2004. Doktorska disertacija.
120. Tsunemitsu H, Smith DR, Saif LJ. Experimental inoculation of adult dairy cows with bovine coronavirus and detection of coronavirus in feces by RT-PCR. *Arch Virol* 1999; 144: 167–75.
121. Valarcher JF, Bourhy H, Lavenu A, et al. Persistent infection of B lymphocytes by bovine respiratory syncytial virus. *Virology* 2001; 291: 55–67.
122. Valarcher JF, Schelcher F, Bourhy H. Evolution of bovine respiratory syncytial virus. *J Virol* 2000; 74(22): 10714–28.
123. Valarcher JF, Taylor G. Bovine respiratory syncytial virus: review article. *Vet Res* 2007; 38: 153–80.

124. van Bömmel C. Untersuchungen an Kälbern mit enzootischer Bronchopneumonie: klinische, labordiagnostische und impulsoszilloresistometrische Ergebnisse. Hannover : Tierärztliche Hochschule, 2000. Inaugural dissertation
125. Viuff B, Tjørnehøj K, Larsen LE, et al. Replication and clearance of respiratory syncytial virus: apoptosis is an important pathway of virus clearance after experimental infection with bovine respiratory syncytial virus. *Am J Pathol* 2002;161(6): 2195–207.
126. Viuff B, Uttenthal C, Tegtmeier C, Alexandersen S. Sites of replication of bovine respiratory syncytial virus in naturally infected calves as determined by in situ hybridization. *Vet Pathol* 1996; 33(4): 383–90.
127. Wong K, Xagorarakis I. Quantitative PCR assays to survey the bovine adenovirus levels in environmental samples. *J Appl Microbiol* 2010; 109(2): 605–12.
128. Woolums AR. Pasteurellaceae: *Avibacterium*, *Bibersteinia*, *Mannheimia*, and *Pasteurella*. In: McVey DS, Kennedy M, Chengappa MM, eds. *Veterinary microbiology*. 3rd ed. Ames : Wiley-Blackwell, 2013a: 101–7.
129. Woolums AR. Pasteurellaceae: *Haemophilus* and *Histophilus*. In: McVey DS, Kennedy M, Chengappa MM, eds. *Veterinary microbiology*. 3rd ed. Ames : Wiley-Blackwell, 2013b: 115–9.
130. Yaman T, Büyükbayram H, Özyıldız Z, et al. Detection of bovine respiratory syncytial virus, *Pasteurella multocida*, and *Mannheimia haemolytica* by immunohistochemical method in naturally-infected cattle. *J Vet Res* 2018; 62(4): 439–45.
131. Zhang X, Alekseev K, Jung K, Vlasova A, Hadya N, Saif LJ. Cytokine responses in porcine respiratory coronavirus-infected pigs treated with corticosteroids as a model for severe acute respiratory syndrome. *J Virol* 2008; 82: 4420–8.
132. Železnik Z. Raziskovanje etiologije virusne pnevmonije pri teletih. Ljubljana: RSS, 1965.
133. Železnik Z. Komparativna raziskovanja etiološke vloge virusa parainfluenca-3 pri respiratornih boleznih ljudi in živali. Ljubljana: RSS, 1968.
134. Železnik Z. Raziskovanje in preprečevanje bolezni dihal pri teletih v pitališčih. Projekt: Fiziologija in patologija animalne proizvodnje. Ljubljana: RSS, 1972.
135. Železnik Z. Raziskovanje in preprečevanje bolezni dihal pri teletih v pitališčih. Ljubljana: RSS, 1973.
136. Železnik Z. Respiratorna obolenja pri govedu. Ljubljana: RSS, 1979.

11 PRILOGE

Tabela 23: Osnovni podatki o govedih iz P skupine

Table 23: Basic data about the cattle from the P-group

<i>zap.št</i>	<i>oznaka vzorca</i>	<i>kategorija</i>	<i>starost (mesecev)</i>	<i>starostni razred</i>	<i>provenienca</i>	<i>oznaka reje</i>	<i>št. živali v reji</i>	<i>vrsta reje</i>
1	P 1	goveji pitanec	7	II	CZ	Pr1	300	pitovna
2	P 2	goveji pitanec	7	II	CZ	Pr1	300	pitovna
3	P 3	goveji pitanec	8	II	CZ	Pr1	300	pitovna
4	P 4	goveji pitanec	9	II	SI	Pr2	21	pitovna
5	P 5	krava	84	III	SI	Pr3	13	kombinirana
6	P 6	tele	4	I	SI	Pr4	21	pitovna
7	P 7	tele	5	I	SI	Pr5	53	pitovna
8	P 8	goveji pitanec	9	II	SI	Pr6	2	pitovna
9	P 9	goveji pitanec	10	II	CZ	Pr7	163	pitovna
10	P 10	tele	6	I	CZ	Pr8	142	pitovna
11	P 11	tele	5	I	SI	Pr9	621	mlečna
12	P 12	goveji pitanec	10	II	SI	Pr10	118	kombinirana
13	P 13	goveji pitanec	10	II	CZ	Pr11	140	pitovna
14	P 14	tele	5	I	SI	Pr12	48	mlečna
15	P 15	goveji pitanec	11	II	SI	Pr13	45	pitovna
16	P 16	telica	7	II	SI	Pr14	554	mlečna
17	P 17	goveji pitanec	8	II	IE	Pr15	27	pitovna
18	P 18	goveji pitanec	20	II	SI	Pr16	14	pitovna
19	P 19	tele	5	I	SI	Pr17	636	mlečna
20	P 20	tele	2	I	SI	Pr18	55	kombinirana
21	P 21	goveji pitanec	9	II	SI	Pr5	50	pitovna

<i>zap.št</i>	<i>oznaka vzorca</i>	<i>kategorija</i>	<i>starost (mesecev)</i>	<i>starostni razred</i>	<i>provenienca</i>	<i>oznaka reje</i>	<i>št. živali v reji</i>	<i>vrsta reje</i>
22	P 22	tele	6	I	SI	Pr19	88	kombinirana
23	P 23	goveji pitanec	18	II	SI	Pr20	458	kombinirana
24	P 24	tele	1	I	SI	Pr21	38	kombinirana
25	P 25	krava	47	III	SI	Pr22	152	mlečna
26	P 26	plemenski bik	23	II	SI	Pr23	25	mlečna
27	P 27	tele	4	I	SI	Pr24	152	kombinirana
28	P 28	goveji pitanec	7	II	SI	Pr25	29	kombinirana
29	P 29	tele	6	I	SI	Pr26	186	mlečna
30	P 30	tele	4	I	SI	Pr21	37	kombinirana
31	P 31	tele	6	I	SI	Pr22	52	mlečna
32	P 32	tele	4	I	SI	Pr23	68	kombinirana
33	P 33	tele	6	I	SI	Pr24	11	mlečna
34	P 34	telica	7	II	SI	Pr25	119	mlečna
35	P 35	tele	6	I	SI	Pr25	119	mlečna
36	P 36	tele	5	I	SI	Pr26	52	mlečna
37	P 37	tele	6	I	SI	Pr27	15	pitovna
38	P 38	tele	3	I	SI	Pr5	51	pitovna
39	P 39	tele	6	I	SI	Pr26	723	mlečna
40	P 40	krava	32	III	SI	Pr27	119	mlečna
41	P 41	tele	3	I	SI	Pr28	424	mlečna
42	P 42	tele	4	I	SI	Pr29	17	pitovna
43	P 43	goveji pitanec	7	II	SI	Pr30	28	kombinirana
44	P 44	telica	7	II	SI	Pr30	28	kombinirana
45	P 45	tele	6	I	RO	Pr31	48	pitovna
46	P 46*	krava	27	III	SI	Pr27	119	mlečna
47	P 47*	tele	3	I	SI	Pr26	559	mlečna
48	P 48	tele	2	I	SI	Pr28	26	pitovna
49	P 49	krava	99	III	SI	Pr32	14	kombinirana
50	P 50	telica	12	II	SI	Pr32	14	kombinirana
51	P 51*	krava	48	III	SI	Pr27	115	mlečna
52	P 52	tele	6	I	SI	Pr33	28	pitovna
53	P 53	tele	5	I	SI	Pr33	27	pitovna

<i>zap.št</i>	<i>oznaka vzorca</i>	<i>kategorija</i>	<i>starost (mesecev)</i>	<i>starostni razred</i>	<i>provenienca</i>	<i>oznaka reje</i>	<i>št. živali v reji</i>	<i>vrsta reje</i>
54	P 54	tele	4	I	SI	Pr34	80	kombinirana
55	P 55	goveji pitanec	13	II	SI	Pr20	352	pitovna
56	P 56	telica	15	II	SI	Pr35	17	mlečna
57	P 57	tele	5	I	SI	Pr36	26	kombinirana
58	P 58	tele	5	I	SI	Pr37	13	pitovna
59	P 59	tele	2	I	SI	Pr38	340	mlečna
60	P 60	tele	5	I	SI	Pr39	106	mlečna
61	P 61	tele	5	I	SI	Pr39	106	mlečna
62	P 62	tele	5	I	SI	Pr38	77	kombinirana
63	P 63	tele	3	I	SI	Pr40	103	mlečna
64	P 64	goveji pitanec	8	II	SI	Pr41	46	pitovna
65	P 65	krava	27	III	SI	Pr38	341	mlečna
66	P 66	tele	5	I	SI	Pr43	51	kombinirana
67	P 67	goveji pitanec	17	II	SI	Pr44	20	kombinirana
68	P 68	tele	4	I	SI	Pr45	76	mlečna
69	P 69	tele	2	I	SI	Pr46	100	kombinirana
70	P 70	tele	2	I	SI	Pr47	159	mlečna
71	P 71	tele	6	I	RO	Pr48	73	kombinirana
72	P 72	telica	12	II	SI	Pr49	86	kombinirana
73	P 73	tele	2	I	RO	Pr48	72	kombinirana
74	P 74	telica	8	II	SI	Pr50	23	kombinirana
75	P 75	goveji pitanec	8	II	CZ	Pr51	50	kombinirana
76	P 76	goveji pitanec	8	II	SI	Pr52	54	kombinirana
77	P 77	goveji pitanec	12	II	SI	Pr53	74	kombinirana
78	P 78	tele	4	I	SI	Pr54	10	kombinirana
79	P 79	tele	5	I	CZ	Pr51	49	kombinirana
80	P 80	tele	5	I	SI	Pr55	63	kombinirana
81	P 81	tele	5	I	RO	Pr48	71	kombinirana
82	P 82	goveji pitanec	7	II	SI	Pr56	29	pitovna
83	P 83	telica	15	II	SI	Pr57	85	kombinirana

<i>zap.št</i>	<i>oznaka vzorca</i>	<i>kategorija</i>	<i>starost (mesecev)</i>	<i>starostni razred</i>	<i>provenienca</i>	<i>oznaka reje</i>	<i>št. živali v reji</i>	<i>vrsta reje</i>
84	P 84	tele	3	I	SI	Pr21	40	kombinirana
85	P 85	krava	49	III	SI	Pr58	207	mlečna
86	P 86	krava	67	III	SI	Pr58	208	mlečna
87	P 87	tele	4	I	SI	Pr59	18	kombinirana
88	P 88	telica	7	II	SI	Pr58	203	mlečna
89	P 89	tele	4	I	SI	Pr60	203	mlečna
90	P 90	tele	4	I	SI	Pr61	56	kombinirana
91	P 91	telica	8	II	SI	Pr61	54	kombinirana
92	P 92	goveji pitanec	8	II	SI	Pr62	43	pitovna
93	P 93	tele	6	I	SI	Pr48	62	kombinirana
94	P 94	goveji pitanec	7	II	SI	Pr48	59	kombinirana
95	P 95	goveji pitanec	26	III	SI	Pr63	40	pitovna
96	P 96	goveji pitanec	8	II	SI	Pr64	53	kombinirana
97	P 97	tele	4	I	SI	Pr66	33	kombinirana
98	P 98	tele	5	I	SI	Pr67	18	pitovna
99	P 99	tele	3	I	SI	Pr68	43	kombinirana
100	P 100	goveji pitanec	9	II	SI	Pr65	47	kombinirana
101	P 101	tele	4	I	LU	Pr8	241	pitovna
102	P 102	tele	5	I	B	Pr8	240	pitovna
103	P 103	goveji pitanec	19	II	SI	Pr8	329	pitovna
104	P 104	krava	37	III	SI	Pr69	243	mlečna
105	P 105	tele	4	I	SI	Pr70	41	pitovna
106	P 106	tele	6	I	CZ	Pr71	326	pitovna
107	P 107	tele	6	I	SI	Pr72	164	mlečna
108	P 108	goveji pitanec	8	II	CZ	Pr73	118	pitovna
109	P 109	tele	5	I	SI	Pr74	119	kombinirana
110	P 110	goveji pitanec	8	II	SI	Pr75	37	pitovna
111	P 111	tele	3	I	SI	Pr14	507	mlečna
112	P 112	tele	5	I	SI	Pr8	326	pitovna

<i>zap.št</i>	<i>oznaka vzorca</i>	<i>kategorija</i>	<i>starost (mesecev)</i>	<i>starostni razred</i>	<i>provenienca</i>	<i>oznaka reje</i>	<i>št. živali v reji</i>	<i>vrsta reje</i>
113	P 113	tele	3	I	SI	Pr76	26	kombinirana
114	P 114	goveji pitanec	20	II	CZ	Pr77	19	pitovna
115	P 116	telica	9	II	SI	Pr78	80	mlečna
116	P 117	krava	63	III	SI	Pr79	71	kombinirana

Tabela 24: Osnovni podatki o govedih iz Pk skupine

Table 24: Basic data about the cattle from the Pk-group

zap. št.	oznaka živali	kategorija	starost (mesecev)	starostni razred	provinienca	oznaka reje	št. živali v reji	vrsta reje
1	PK 1	goveji pitanec	13	II	RO	Pkr1	35	pitovna
2	PK 2	goveji pitanec	11	II	CZ	Pkr2	135	pitovna
3	PK 3	tele	2	I	SI	Pkr3	15	kombinirana
4	PK 4	krava	30	III	SI	Pkr4	10	kombinirana
5	PK 5	goveji pitanec	19	II	SI	Pkr5	11	pitovna
6	PK 6	telica	13	II	SI	Pkr6	34	mlečna
7	PK 7	telica	9	II	CZ	Pkr7	35	pitovna
8	PK 8	krava	50	III	SI	Pkr8	89	kombinirana
9	PK 9	krava	24	II	SI	Pkr9	379	mlečna
10	PK 10	tele	2	I	SI	Pkr10	13	kombinirana
11	PK 11	tele	2	I	SI	Pkr11	17	pitovna
12	PK 12	telica	21	II	SI	Pkr12	86	kombinirana
13	PK 13	goveji pitanec	10	II	SI	Pkr13	2	pitovna
14	PK 14	krava	24	II	SI	Pkr14	159	kombinirana
15	PK 15	tele	3	I	SI	Pkr15	42	kombinirana
16	PK 16	goveji pitanec	8	II	SI	Pkr16	73	kombinirana

Tabela 25: Osnovni podatki o govedih iz Ž skupine

Table 25: Basic data about the cattle from the Ž-group

<i>zap. št.</i>	<i>oznaka vzorca</i>	<i>kategorija</i>	<i>starost (mesecev)</i>	<i>starostni razred</i>	<i>provenienca</i>	<i>oznaka reje</i>	<i>št. živ. v reji</i>	<i>vrsta reje</i>
1	Ž 1	krava	31	III	SI	Žr1	16	kombinirana
2	Ž 2	krava	29	III	SI	Žr1	16	kombinirana
3	Ž 3	tele	5	I	SI	Žr1	16	kombinirana
4	Ž 6	pitaneč	17	II	SI	Žr1	16	kombinirana
5	Ž 8	telica	12	II	SI	Žr1	16	kombinirana
6	Ž 9	telica	17	II	SI	Žr1	16	kombinirana
7	Ž 13	krava	36	III	SI	Žr1	16	kombinirana
8	Ž 14	tele	1	I	SI	Žr2	299	pitovna
9	Ž 15	tele	3	I	SI	Žr2	299	pitovna
10	Ž 16	goveji pitaneč	7	II	SI	Žr2	299	pitovna
11	Ž 17	tele	5	I	SI	Žr2	299	pitovna
12	Ž 18	tele	6	I	SI	Žr2	299	pitovna
13	Ž 19	tele	3	I	SI	Žr2	299	pitovna
14	Ž 20	tele	6	I	CZ	Žr2	299	pitovna
15	Ž 21	tele	5	I	CZ	Žr2	299	pitovna
16	Ž 22	goveji pitaneč	7	II	CZ	Žr2	299	pitovna
17	Ž 23	goveji pitaneč	7	II	CZ	Žr2	299	pitovna
18	Ž 24	tele	6	I	CZ	Žr2	299	pitovna
19	Ž 31	goveji pitaneč	7	II	SI	Žr3	56	pitovna
20	Ž 32	tele	5	I	SI	Žr3	56	pitovna
21	Ž 33	tele	4	I	SI	Žr3	56	pitovna
22	Ž 34	tele	2	I	SI	Žr3	56	pitovna
23	Ž 35	tele	3	I	SI	Žr3	56	pitovna
24	Ž 36	tele	3	I	SI	Žr4	10	kombinirana
25	Ž 37	goveji pitaneč	12	II	SI	Žr4	10	kombinirana
26	Ž 38	goveji pitaneč	7	II	SI	Žr4	10	kombinirana
27	Ž 39	tele	4	I	SI	Žr4	10	kombinirana
28	Ž 45	krava	30	III	SI	Žr5	35	kombinirana
29	Ž 46	krava	36	III	SI	Žr5	35	kombinirana
30	Ž 47	goveji pitaneč	14	II	SI	Žr5	35	kombinirana
31	Ž 48	tele	6	I	SI	Žr5	35	kombinirana
32	Ž 49	goveji pitaneč	14	II	SI	Žr5	35	kombinirana
33	Ž 50	tele	1	I	SI	Žr6	117	mlečna

<i>zap. št.</i>	<i>oznaka vzorca</i>	<i>kategorija</i>	<i>starost (mesecev)</i>	<i>starostni razred</i>	<i>provenienca</i>	<i>oznaka reje</i>	<i>št. živ. v reji</i>	<i>vrsta reje</i>
34	Ž 51	tele	2	I	SI	Žr6	117	mlečna
35	Ž 52	tele	1	I	SI	Žr6	117	mlečna
36	Ž 53	tele	6	I	SI	Žr6	117	mlečna
37	Ž 54	telica	8	II	SI	Žr6	117	mlečna
38	Ž 60	tele	4	I	SI	Žr7	34	kombinirana
39	Ž 61	goveji pitanec	7	II	SI	Žr7	34	kombinirana
40	Ž 62	tele	6	I	SI	Žr7	34	kombinirana
41	Ž 63	tele	6	I	SI	Žr7	34	kombinirana
42	Ž 64	tele	5	I	SI	Žr7	34	kombinirana
43	Ž 65	tele	1	I	SI	Žr8	27	kombinirana
44	Ž 66	tele	1	I	SI	Žr8	27	kombinirana
45	Ž 67	tele	1	I	SI	Žr9	10	kombinirana
46	Ž 68	goveji pitanec	8	II	SI	Žr10	270	kombinirana
47	Ž 69	goveji pitanec	8	II	SI	Žr10	270	kombinirana
48	Ž 70	goveji pitanec	7	II	SI	Žr10	270	kombinirana
49	Ž 71	goveji pitanec	8	II	SI	Žr10	270	kombinirana
50	Ž 72	goveji pitanec	8	II	SI	Žr10	270	kombinirana
51	Ž 73	goveji pitanec	7	II	SI	Žr10	270	kombinirana
52	Ž 74	tele	6	I	SI	Žr10	270	kombinirana
53	Ž 75	tele	5	I	SI	Žr10	270	kombinirana
54	Ž 76	krava	84	III	SI	Žr11	29	mlečna
55	Ž 77	krava	36	III	SI	Žr11	29	mlečna
56	Ž 78	krava	50	III	SI	Žr11	29	mlečna
57	Ž 79	krava	105	III	SI	Žr11	29	mlečna
58	Ž 80	krava	28	III	SI	Žr11	29	mlečna
59	Ž 81	krava	69	III	SI	Žr11	29	mlečna
60	Ž 82	krava	71	III	SI	Žr11	29	mlečna
61	Ž 83	krava	81	III	SI	Žr11	29	mlečna
62	Ž 84	krava	57	III	SI	Žr11	29	mlečna
63	Ž 85	krava	96	III	SI	Žr11	29	mlečna
64	Ž 86	krava	30	III	SI	Žr11	29	mlečna
65	Ž 87	goveji pitanec	12	II	SI	Žr11	29	mlečna
66	Ž 88	krava	45	III	SI	Žr11	29	mlečna
67	Ž 89	krava	48	III	SI	Žr11	29	mlečna
68	Ž 90	krava	96	III	SI	Žr11	29	mlečna

<i>zap. št.</i>	<i>oznaka vzorca</i>	<i>kategorija</i>	<i>starost (mesecev)</i>	<i>starostni razred</i>	<i>provenienca</i>	<i>oznaka reje</i>	<i>št. živ. v reji</i>	<i>vrsta reje</i>
69	Ž 91	krava	65	III	SI	Žr11	29	mlečna
70	Ž 92	krava	27	III	SI	Žr11	29	mlečna
71	Ž 93	krava	26	III	SI	Žr11	29	mlečna
72	Ž 94	krava	30	III	SI	Žr12	14	kombinirana
73	Ž 95	tele	6	I	SI	Žr12	14	kombinirana
74	Ž 96	goveji pitanec	10	II	SI	Žr12	14	kombinirana
75	Ž 97	goveji pitanec	12	II	SI	Žr12	14	kombinirana
76	Ž 98	goveji pitanec	18	II	SI	Žr12	14	kombinirana
77	Ž 99	krava	48	III	SI	Žr12	14	kombinirana
78	Ž 100	goveji pitanec	9	II	AT	Žr12	14	kombinirana
79	Ž 101	goveji pitanec	10	II	SI	Žr12	14	kombinirana
80	Ž 102	goveji pitanec	16	II	SI	Žr12	14	kombinirana
81	Ž 103	tele	2	I	SI	Žr13	55	mlečna
82	Ž 104	tele	3	I	SI	Žr13	55	mlečna
83	Ž 105	tele	6	I	SI	Žr14	29	pitovna
84	Ž 106	tele	6	I	SI	Žr14	29	pitovna
85	Ž 107	tele	6	I	SI	Žr14	29	pitovna
86	Ž 108	tele	6	I	SI	Žr14	29	pitovna
87	Ž 109	tele	6	I	SI	Žr14	29	pitovna
88	Ž 110	tele	5	I	SI	Žr15	19	pitovna
89	Ž 111	krava	63	III	SI	Žr15	19	pitovna
90	Ž 112	krava	26	III	SI	Žr15	19	pitovna
91	Ž 113	tele	1	I	SI	Žr16	20	kombinirana
92	Ž 114	tele	1	I	SI	Žr16	20	kombinirana
93	Ž 115	krava	66	III	SI	Žr16	20	kombinirana
94	Ž 116	tele	1	I	SI	Žr16	20	kombinirana
95	Ž 117	krava	72	III	SI	Žr16	20	kombinirana
96	Ž 118	tele	3	I	RO	Žr17	70	kombinirana
97	Ž 122	krava	86	III	SI	Žr18	22	kombinirana
98	Ž 123	goveji pitanec	9	II	SI	Žr18	22	kombinirana
99	Ž 124	telica	7	II	SI	Žr18	22	kombinirana
100	Ž 125	tele	3	I	SI	Žr18	22	kombinirana
101	Ž 126	telica	7	II	SI	Žr18	22	kombinirana
102	Ž 127	krava	94	III	SI	Žr19	12	pitovna
103	Ž 128	tele	5	I	SI	Žr19	12	pitovna

<i>zap. št.</i>	<i>oznaka vzorca</i>	<i>kategorija</i>	<i>starost (mesecev)</i>	<i>starostni razred</i>	<i>provenienca</i>	<i>oznaka reje</i>	<i>št. živ. v reji</i>	<i>vrsta reje</i>
104	Ž 129	goveji pitanec	8	II	SI	Žr19	12	pitovna
105	Ž 130	tele	2	I	SI	Žr19	12	pitovna
106	Ž 131	tele	6	I	SI	Žr20	27	kombinirana
107	Ž 132	tele	2	I	SI	Žr21	23	pitovna
108	Ž 133	tele	4	I	SI	Žr22	54	kombinirana
109	Ž 134	tele	4	I	SI	Žr22	54	kombinirana
110	Ž 135	tele	3	I	SI	Žr22	54	kombinirana
111	Ž 136	telica	16	II	SI	Žr23	6	kombinirana
112	Ž 137	krava	76	III	SI	Žr23	6	kombinirana
113	Ž 138	goveji pitanec	10	II	SI	Žr23	6	kombinirana
114	Ž 139	krava	74	III	SI	Žr23	6	kombinirana
115	Ž 140	tele	4	I	SI	Žr23	6	kombinirana
116	Ž 141	krava	ni pod.	III	SI	Žr24	208	mlečna
117	Ž 142	krava	ni pod.	III	SI	Žr24	208	mlečna
118	Ž 143	krava	ni pod.	III	SI	Žr24	208	mlečna
119	Ž 144	goveji pitanec	ni pod.	II	SI	Žr25	ni pod.	kombinirana
120	Ž 145	tele	2	I	SI	Žr26	7	kombinirana
121	Ž 146	tele	5	I	SI	Žr27	28	kombinirana
122	Ž 147	tele	3	I	SI	Žr28	15	kombinirana
123	Ž 148	tele	3	I	SI	Žr28	15	kombinirana
124	Ž 149	tele	1	I	SI	Žr28	15	kombinirana
125	Ž 150	krava	61	III	SI	Žr28	15	kombinirana
126	Ž 151	krava	60	III	SI	Žr28	15	kombinirana
127	Ž 152	tele	4	I	SI	Žr29	199	mlečna
128	Ž 153	plemen. bik	13	II	SI	Žr29	199	mlečna
129	Ž 154	telica	13	II	SI	Žr29	199	mlečna
130	Ž 155	tele	3	I	SI	Žr29	199	mlečna
131	Ž 156	tele	2	I	SI	Žr29	199	mlečna
132	Ž 157	tele	1	I	SI	Žr29	199	mlečna
133	Ž 158	tele	3	I	SI	Žr30	10	kombinirana
134	Ž 159	tele	5	I	SI	Žr31	59	kombinirana
135	Ž 160	tele	5	I	SI	Žr31	59	kombinirana
136	Ž 161	tele	5	I	SI	Žr31	59	kombinirana
137	Ž 162	tele	5	I	SI	Žr31	59	kombinirana

Tabela 26: Osnovni podatki o govedih iz Žk skupine

Table 26: Basic data about the cattle from the Žk-group

zap. št.	oznaka	kategorija	starost (M)	starostni razred	provenienca	oznaka reje	št. živ. v reji	vrsta reje
1	Žk 1	tele	3	I	SI	Žkr 1	18	kombinirana
2	Žk 2	tele	3	I	SI	Žkr 1	18	kombinirana
3	Žk 3	goveji pitanec	8	II	SI	Žkr 1	18	kombinirana
4	Žk 4	goveji pitanec	8	II	SI	Žkr 1	18	kombinirana
5	Žk 5	telica	24	II	SI	Žkr 1	18	kombinirana
6	Žk 6	goveji pitanec	18	II	SI	Žkr 2	5	pitovna
7	Žk 7	goveji pitanec	17	II	SI	Žkr 2	5	pitovna
8	Žk 8	goveji pitanec	18	II	SI	Žkr 2	5	pitovna
9	Žk 9	goveji pitanec	17	II	SI	Žkr 2	5	pitovna
10	Žk 10	telica	24	II	SI	Žkr 3	12	kombinirana
11	Žk 11	goveji pitanec	12	II	SI	Žkr 4	31	pitovna
12	Žk 12	tele	1	I	SI	Žkr 5	87	mlečna
13	Žk 13	tele	1	I	SI	Žkr 5	87	mlečna
14	Žk 14	tele	1	I	SI	Žkr 5	87	mlečna
15	Žk 15	tele	1	I	SI	Žkr 5	87	mlečna
16	Žk 16	tele	1	I	SI	Žkr 5	87	mlečna

Tabela 27: Rezultati dokazovanja respiratornih patogenov z RT-qPCR in qPCR iz vzorcev pljuč 115 govedi iz P skupine

Table 27: The results of detection of respiratory pathogens with the RT-qPCR and qPCR from lung samples of 115 cattle from the P-group

PCR P	oznaka	<i>M. bovis</i>	<i>H. somni</i>	<i>P. multocida</i>	<i>M. haemolytica</i>	BCV	BRSV	BPI3	BVDV	BoHV 1	BAdV
1	P 2	23,8	neg.	24,35	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	31,56	neg.
2	P 3	24,19	neg.	27,1	neg.	37,22	neg.	neg.	neg.	22,49	neg.
3	P 4	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	29,22	neg.	neg.	neg.	neg.
4	P 5	neg.	neg.	32,85	neg.	neg.	21,53	neg.	neg.	neg.	neg.
5	P 6	neg.	27,62	neg.	neg.	neg.	neg.	34,81	neg.	neg.	neg.
6	P 7	neg.	neg.	38,46	neg.	neg.	neg.	37,69	neg.	neg.	neg.
7	P 8	neg.	neg.	40,16	33,7	neg.	neg.	neg.	30,27	neg.	neg.
8	P 9	neg.	neg.	34,35	neg.	neg.	33,91	neg.	neg.	neg.	neg.
9	P 10	19,55	neg.	28,27	29,97	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
10	P 11	neg.	24,09	22,15	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
11	P 12	neg.	22,54	26,91	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
12	P 13	26,82	neg.	35,71	neg.	neg.	30,59	neg.	neg.	neg.	neg.
13	P 14	neg.	neg.	32,24	28,42	30,09	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
14	P 15	neg.	25,28	26,57	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
15	P 16	25,43	neg.	18,06	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	31,95
16	P 17	21,99	neg.	22,49	37,84	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	36,97
17	P 18	33,76	34,92	30,78	23,44	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
18	P 19	neg.	neg.	28,07	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
19	P 20	neg.	20,43	38,96	neg.	neg.	neg.	neg.	24,97	neg.	neg.
20	P 21	neg.	42,97	21,69	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
21	P 22	neg.	28,91	33,54	neg.	neg.	29,05	neg.	neg.	neg.	neg.
22	P 23	neg.	31,55	29,6	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
23	P 24	neg.	25,86	27,48	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
24	P 25	neg.	neg.	36,51	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
25	P 26	neg.	neg.	neg.	21,77	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	37,72
26	P 27	neg.	neg.	31,63	neg.	neg.	17,88	neg.	neg.	neg.	32,99
27	P 28	neg.	28,67	37,57	neg.	neg.	neg.	37,92	neg.	neg.	neg.
28	P 29	neg.	28,73	29,59	neg.	37,18	neg.	neg.	neg.	neg.	35,69
29	P 30	neg.	24,17	35,14	neg.	31,88	neg.	neg.	neg.	neg.	37,65
30	P 31	neg.	neg.	19,97	33,23	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
31	P 32	30,79	neg.	35,54	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
32	P 33	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	33,85	neg.	neg.	neg.	neg.

[illegible]

<i>PCR P</i>	<i>oznaka</i>	<i>M. bovis</i>	<i>H. somni</i>	<i>P. multocida</i>	<i>M. haemolytica</i>	<i>BCV</i>	<i>BRSV</i>	<i>BPI3</i>	<i>BVDV</i>	<i>BoHV 1</i>	<i>BAdV</i>
105	P 106	26,22	34,45	40,85	neg.	neg.	33,34	neg.	neg.	neg.	neg.
106	P 107	neg.	27,03	31,27	neg.	38,75	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
107	P 108	20,67	neg.	25,64	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
108	P 109	neg.	neg.	28,04	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
109	P 110	neg.	neg.	25,04	neg.	neg.	neg.	neg.	27,24	neg.	37,33
110	P 111	neg.	neg.	40,01	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	40,07
111	P 112	24,82	neg.	28,78	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
112	P 113	neg.	neg.	34,45	neg.	neg.	29,71	neg.	neg.	neg.	neg.
113	P 114	24,05	27,77	28,41	38,67	38,43	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
114	P 116	neg.	neg.	23,54	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
115	P 117	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	36,00	neg.	neg.	neg.	neg.

[illegible]

Tabela 29: Rezultati dokazovanja respiratornih patogenov z RT-qPCR in qPCR iz nosnega brisa 137 goved iz Ž skupine

Table 29: The results of detection of respiratory pathogens with the RT-qPCR and qPCR from nasal swab of 137 cattle from the Ž-group

[illegible]

PCR Ž	oznaka	M. bovis	H. somni	P. multocida	M. haemolytica	BCV	BRSV	B PI3	BVDV	BoHV-1	BAdV
34	Ž 51	neg.	40,97	29,34	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
35	Ž 52	neg.	neg.	25,35	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
36	Ž 53	neg.	neg.	28,95	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
37	Ž 54	neg.	neg.	32,92	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
38	Ž 60	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	27,55	neg.	neg.	neg.	neg.
39	Ž 61	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	26,56	neg.	neg.	neg.	neg.
40	Ž 62	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	33,43	neg.	neg.	neg.	neg.
41	Ž 63	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	35,57	neg.	neg.	neg.	neg.
42	Ž 64	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	32,1	neg.	neg.	neg.	neg.
43	Ž 65	neg.	neg.	24,7	neg.	27,95	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
44	Ž 66	neg.	neg.	28,94	neg.	25,48	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
45	Ž 67	neg.	neg.	neg.	43,54	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
46	Ž 68	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
47	Ž 69	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
48	Ž 70	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
49	Ž 71	neg.	neg.	37,74	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
50	Ž 72	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
51	Ž 73	neg.	neg.	30,01	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
52	Ž 74	neg.	neg.	27,73	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
53	Ž 75	neg.	neg.	26,87	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
54	Ž 76	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
55	Ž 77	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
56	Ž 78	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
57	Ž 79	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
58	Ž 80	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
59	Ž 81	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
60	Ž 82	37,81	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
61	Ž 83	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
62	Ž 84	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
63	Ž 85	neg.	neg.	neg.	35,24	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
64	Ž 86	neg.	neg.	neg.	36,36	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
65	Ž 87	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
66	Ž 88	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
67	Ž 89	neg.	neg.	neg.	36,94	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
68	Ž 90	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
69	Ž 91	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	37,34	neg.	neg.	neg.
70	Ž 92	neg.	41,97	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
71	Ž 93	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
72	Ž 94	neg.	neg.	neg.	30,75	31,38	32,16	42,05	neg.	neg.	neg.

PCR Ž	oznaka	M. bovis	H. somni	P. multocida	M. haemolytica	BCV	BRSV	B PI3	BVDV	BoHV-1	BAdV
73	Ž 95	neg.	neg.	neg.	38,76	29,04	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
74	Ž 96	neg.	neg.	neg.	neg.	32,47	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
75	Ž 97	neg.	neg.	neg.	31,59	35,08	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
76	Ž 98	neg.	neg.	neg.	33,07	33,82	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
77	Ž 99	neg.	neg.	neg.	36,28	36,04	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
78	Ž 100	neg.	neg.	neg.	34,33	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
79	Ž 101	neg.	neg.	28,88	33,70	34,12	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
80	Ž 102	neg.	neg.	36,39	34,41	33,25	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
81	Ž 103	neg.	neg.	26,29	neg.	29,25	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
82	Ž 104	neg.	neg.	27,17	neg.	30,76	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
83	Ž 105	neg.	neg.	28,27	neg.	neg.	34,98	neg.	neg.	neg.	neg.
84	Ž 106	neg.	neg.	24,75	neg.	neg.	39,89	neg.	neg.	neg.	neg.
85	Ž 107	neg.	neg.	24,91	neg.	neg.	24,44	neg.	neg.	neg.	neg.
86	Ž 108	neg.	neg.	24,13	neg.	neg.	31,13	neg.	neg.	neg.	neg.
87	Ž 109	neg.	neg.	27,30	32,90	neg.	24,58	neg.	neg.	neg.	neg.
88	Ž 110	neg.	neg.	26,68	28,61	neg.	23,30	neg.	neg.	neg.	neg.
89	Ž 111	neg.	neg.	29,56	neg.	neg.	32,05	neg.	neg.	neg.	neg.
90	Ž 112	neg.	neg.	36,66	neg.	neg.	31,12	neg.	neg.	neg.	neg.
91	Ž 113	neg.	neg.	36,07	neg.	neg.	33,33	neg.	neg.	neg.	neg.
92	Ž 114	neg.	36,85	23,46	neg.	neg.	30,13	neg.	neg.	neg.	neg.
93	Ž 115	neg.	neg.	36,24	neg.	neg.	29,12	neg.	neg.	neg.	neg.
94	Ž 116	neg.	neg.	32,29	neg.	neg.	29,98	neg.	neg.	neg.	neg.
95	Ž 117	neg.	neg.	38,36	neg.	29,14	34,03	neg.	neg.	neg.	neg.
96	Ž 118	30,00	neg.	22,50	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
97	Ž 122	neg.	35,95	30,90	neg.	neg.	32,38	neg.	neg.	neg.	neg.
98	Ž 123	neg.	36,15	26,68	neg.	neg.	27,96	neg.	neg.	neg.	neg.
99	Ž 124	neg.	neg.	26,20	neg.	neg.	24,38	neg.	neg.	neg.	neg.
100	Ž 125	neg.	neg.	36,30	neg.	neg.	25,18	neg.	neg.	neg.	neg.
101	Ž 126	neg.	36,77	27,50	neg.	neg.	23,06	neg.	neg.	neg.	neg.
102	Ž 127	neg.	neg.	36,80	neg.	neg.	24,23	neg.	neg.	neg.	neg.
103	Ž 128	neg.	neg.	40,61	neg.	neg.	24,48	neg.	neg.	neg.	neg.
104	Ž 129	neg.	neg.	42,33	neg.	neg.	26,5	neg.	neg.	neg.	neg.
105	Ž 130	neg.	neg.	33,89	neg.	neg.	25,94	neg.	neg.	neg.	neg.
106	Ž 131	neg.	neg.	34,84	neg.	neg.	25,43	neg.	neg.	neg.	neg.
107	Ž 132	neg.	26,63	22,09	neg.	29,72	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
108	Ž 133	neg.	neg.	32,96	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
109	Ž 134	neg.	neg.	36,84	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
110	Ž 135	neg.	neg.	35,09	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
111	Ž 136	neg.	neg.	34,79	neg.	neg.	28,82	neg.	neg.	neg.	neg.

Table 30: The results of detection of respiratory pathogens with the RT-qPCR and qPCR from nasal swabs of 10 cattle from the Žk-group

[illegible]

11.1 SLIKOVNA PRILOGA



Slika 49: Kadavri telet pred raztelesbo

Figure 49: Cadavers of calves before the autopsy



Slika 50: Shujšanost - posledica kronične gnojne bronhopnevmonije (na levi P10, na desni P12)

Figure 50: Poor body condition as a consequence of chronic purulent bronchopneumonia (left P10, right P12)



Slika 51: Shujšanost - posledica kronične gnojne bronhopnevmonije (P14)

Figure 51: Poor body condition as a consequence of chronic purulent bronchopneumonia (P14)



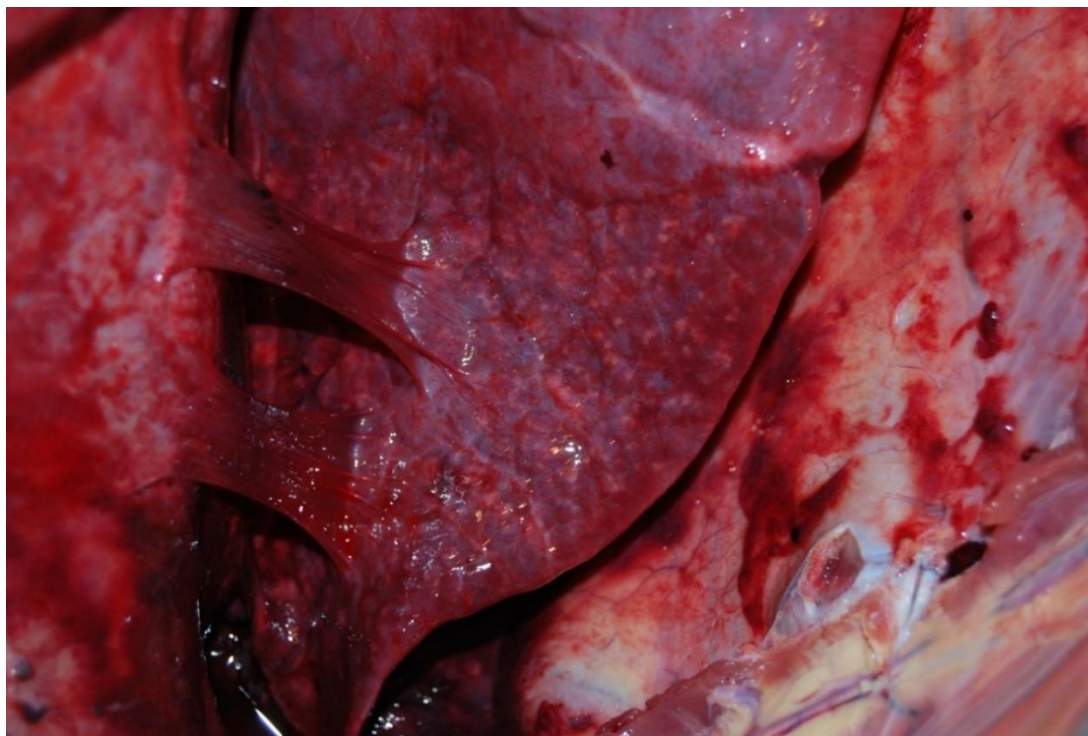
Slika 52: Močna shujšanost - posledica difuzne kronične bronhopnevmonije (P84)

Figure 52: Severe cachexia as a result of diffuse chronic bronchopneumonia (P84)



Slika 53: Kronična gnojna bronhopnevmonija prednjih delov pljuč (P21)

Figure 53: Chronic purulent bronchopneumonia of cranial parts of lungs (P21)



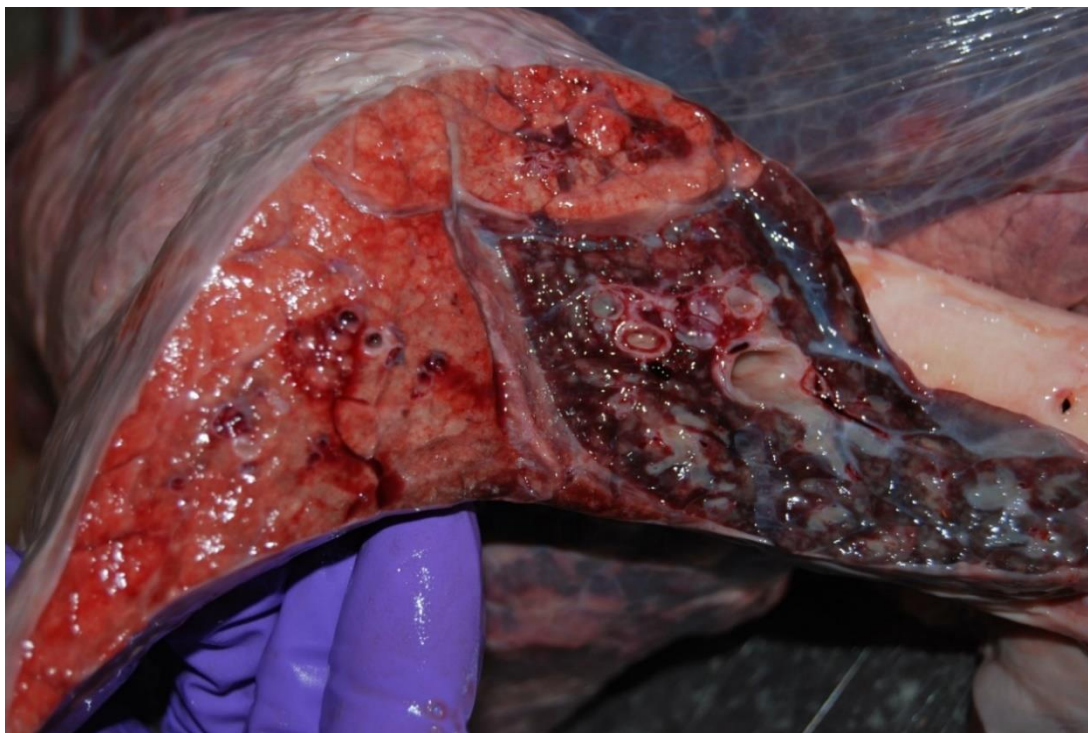
Slika 54: Adhezije popljučnice in porebrnice pri kronični gnojni bronhopnevmoniji (P14)

Figure 54: Adhesions between pulmonary pleura and costal pleura at chronic purulent bronchopneumonia (P14)



Slika 55: Kronična gnojna pljučnica, ki jo je povzročila *P. multocida* - sekvestracija inficiranega in odmrlega tkiva (P19).

Figure 55: Chronic purulent pneumonia caused by *P. multocida* -sequestration of infected and necrotic pulmonary tissue. (P19)



Slika 56: Kronična gnojna bronhopnevmonija, ki jo je povzročila *P. multocida* (P12).

Figure 56: Chronic purulent bronchopneumonia caused by *P. multocida* (P12)



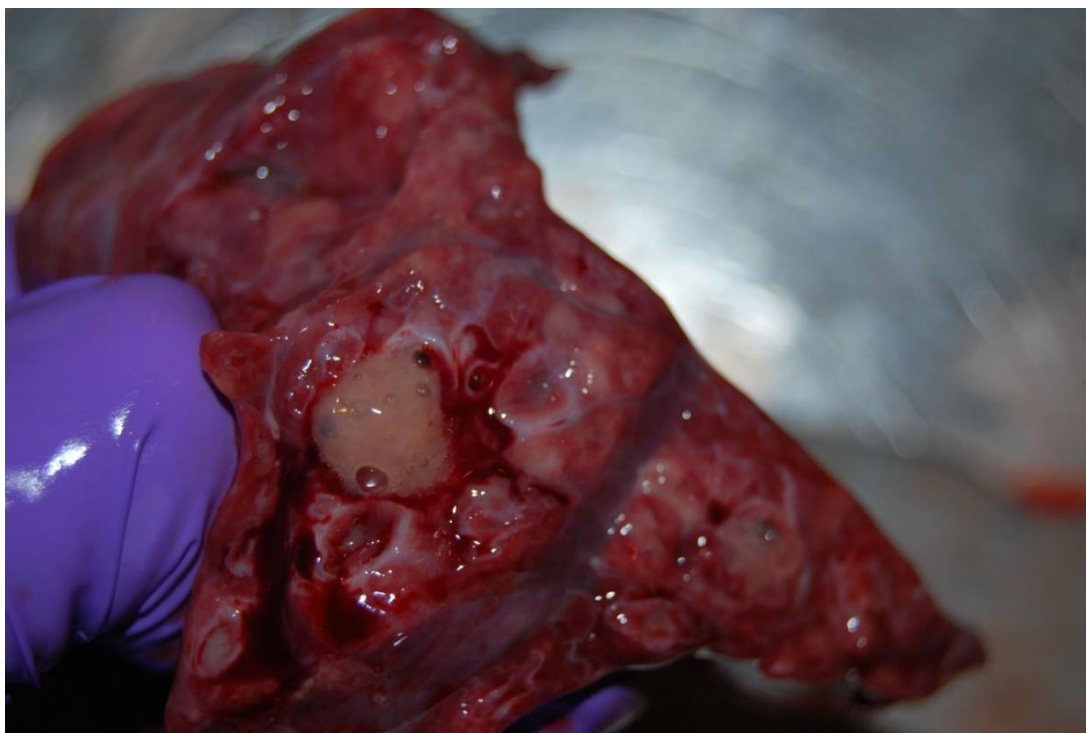
Slika 57: Kronična gnojna bronhopnevmonija - prizadet je levi kranialni pljučni reženj. Povzročitelji: *M. bovis*, *P. multocida*, BAdV (P16).

Figure 57: Chronic purulent bronchopneumonia - the left cranial lung lobe is affected. *M. bovis*, *P. multocida*, BAdV (P16)



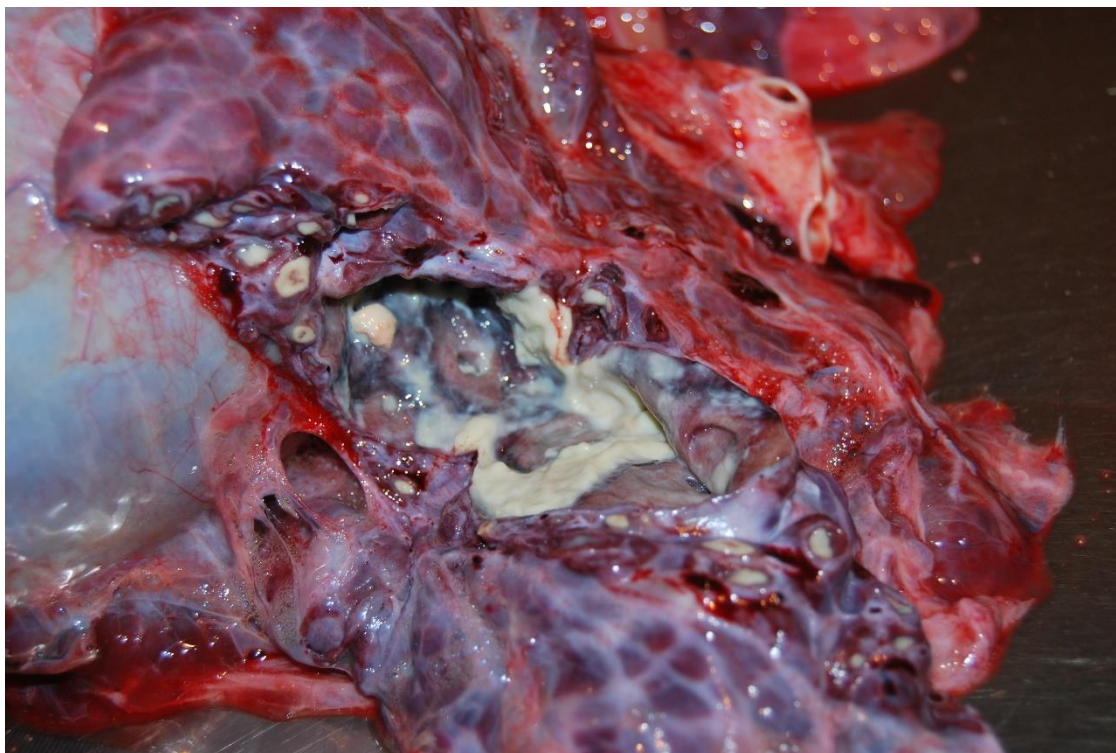
Slika 58: Kronična gnojna bronhopnevmonija - iz bronhov se na pritisk izceja mazav gnoj (P16).

Figure 58: Chronic purulent bronchopneumonia - under pressure, a creamy pus is oozing from the bronchae (P16)



Slika 59: Kronična gnojna bronhopnevmonija - rjav sluzast gnoj v bronhih. Povzročitelja: *H. somi*, *P. multocida* (P15)

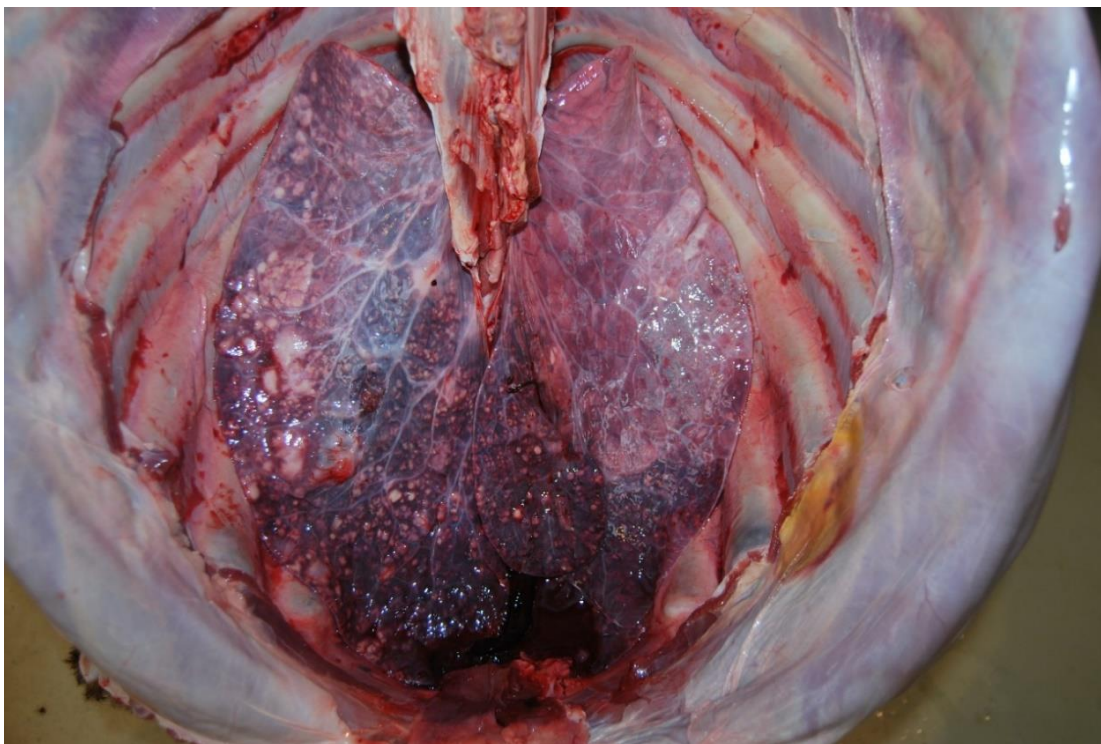
Figure 59: Chronic purulent bronchopneumonia - brown mucinous pus in bronchae. *H. somi*, *P. multocida* (P15)



Slika 60: Kronična gnojna bronhopnevmonija, ki sta jo povzročila *H. somni* in *P. multocida* (P23).
Figure 60: Chronic purulent bronchopneumonia caused by *H. somni* and *P. multocida*. (P23)



Slika 61: Kronična gnojna bronhopnevmonija, ki sta jo povzročila *P. multocida* in *T. pyogenes* (P25).
Figure 61: Chronic purulent bronchopneumonia caused by *P. multocida* and *T. pyogenes*. (P25)



Slika 62: Pljuča *in situ* - kronična mikoplazemska bronhopnevmonija, ki jo je povzročila *M. bovis* (P10).
Figure 62: The lungs *in situ* - chronic purulent mycoplasmal bronchopneumonia caused by *M. bovis*. (P10)

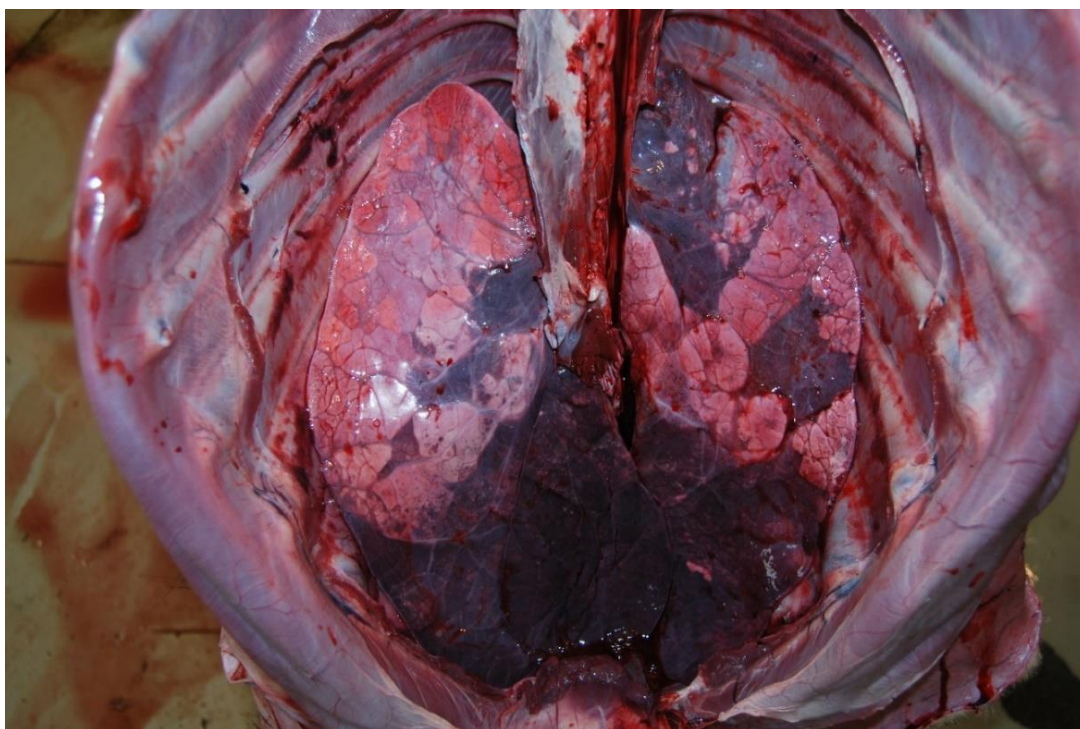


Slika 63: Kronična mikoplazemska pljučnica, ki jo je povzročila *M. bovis* (P10).
Figure 63: Chronic mycoplasmal pneumonia caused by *M. bovis*. (P10)



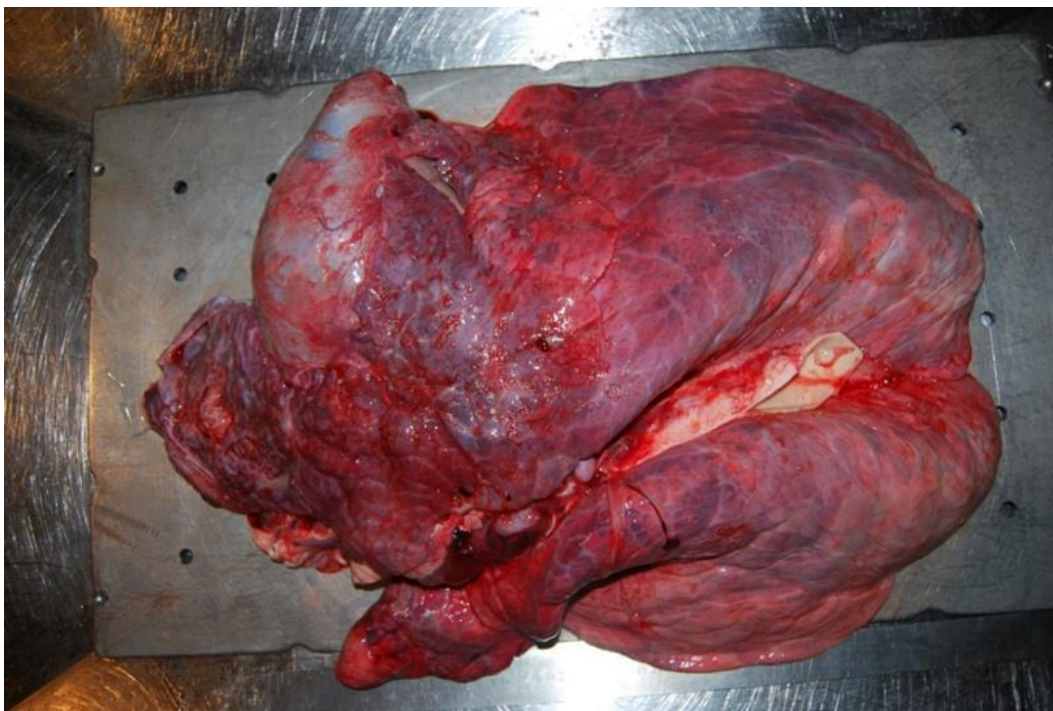
Slika 64: Prečno prerezan kranialni pljučni reženj - bronhiektazije z mazavim eksudatom. Povzročitelj: *M. bovis* (P10)

Figure 64: Cross-section of cranial lung lobe - bronchiectasis with creamy exudat. *M. bovis* (P10)



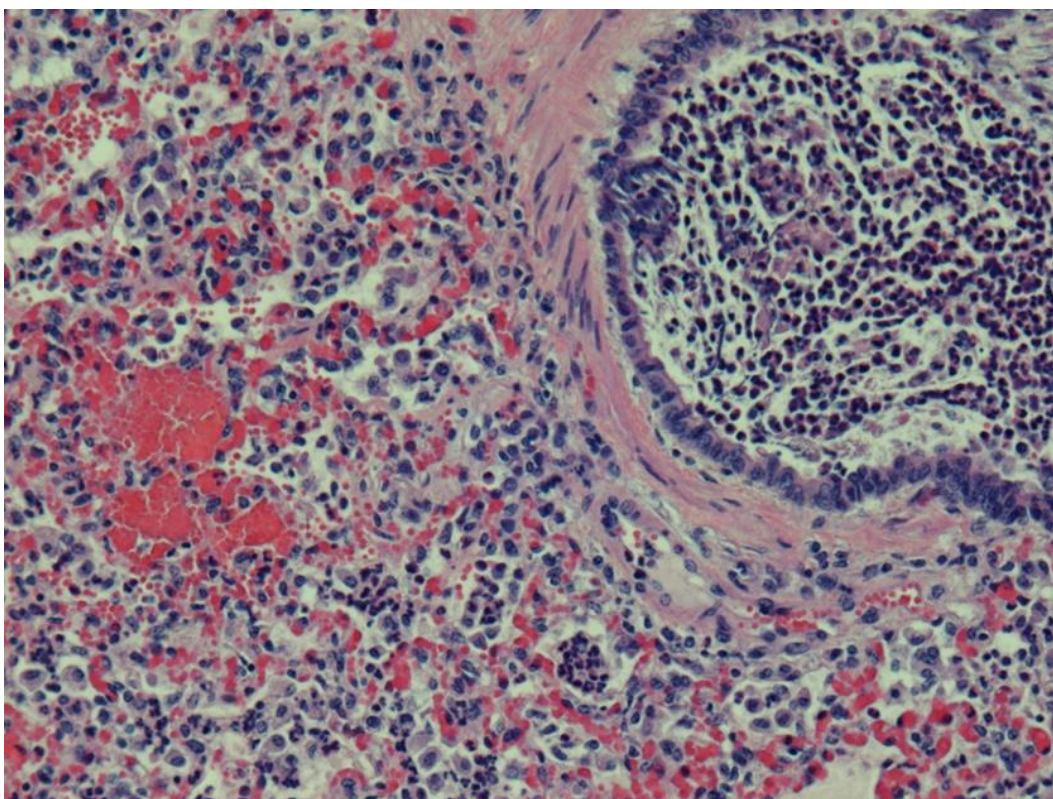
Slika 65: Pljuča *in situ* - kronična gnojna bronhopnevmonija, ki so jo povzročili *H. somni*, *P. multocida* in *T. pyogenes* (P11).

Figure 65: Lungs *in situ* - chronic purulent bronchopneumonia, caused by *H. somni*, *P. multocida* and *T. pyogenes*. (P11)



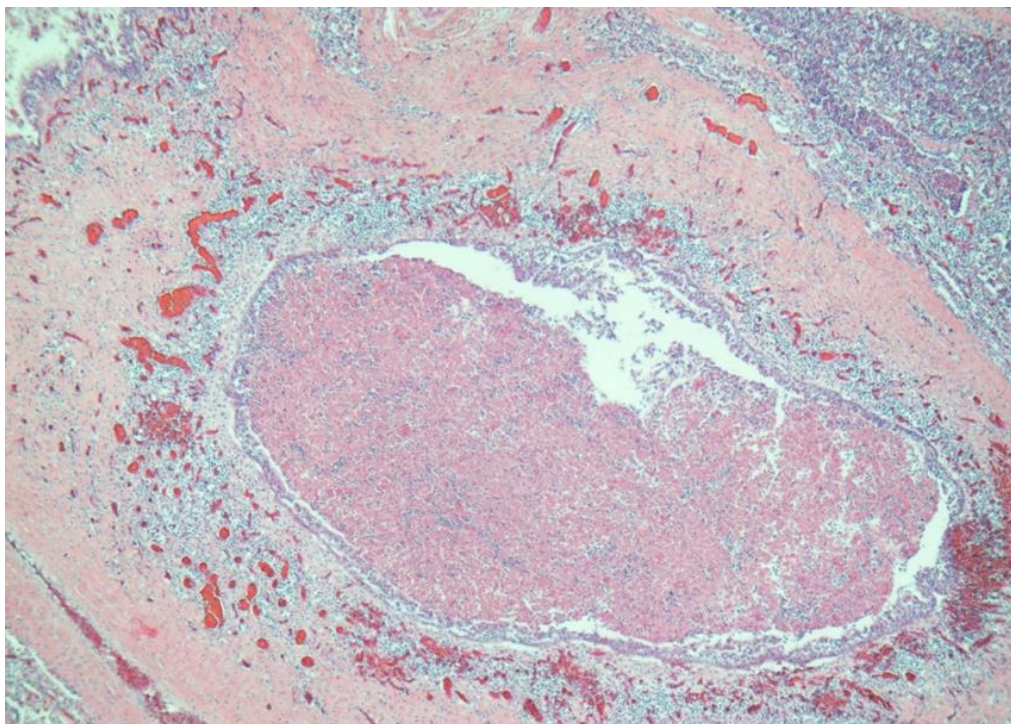
Slika 66: Kronična gnojna pljučnica desnega kranialnega pljučnega režnja (P23)

Figure 66: Chronic purulent pneumonia of right cranial lung lobe (P23)



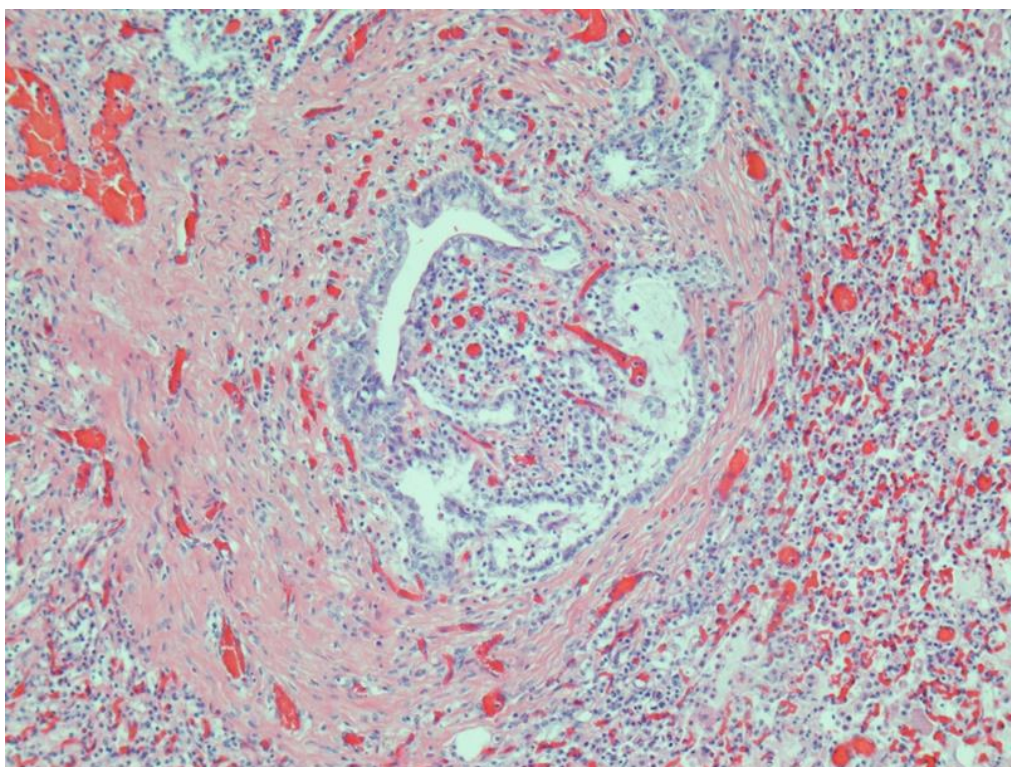
Slika 67: Akutna gnojna bronhopnevmonija - v alveolah so nevtrofilni granulociti, makrofagi in krvavitve. Povzročitelj: *P. multocida*, BPI3 (P67), HE, x 200

Figure 67: Acute purulent bronchopneumonia - neutrophil granulocytes, macrophages and haemorrhages in alveoli. *P. multocida*, BPI3 (P67), HE, x 200



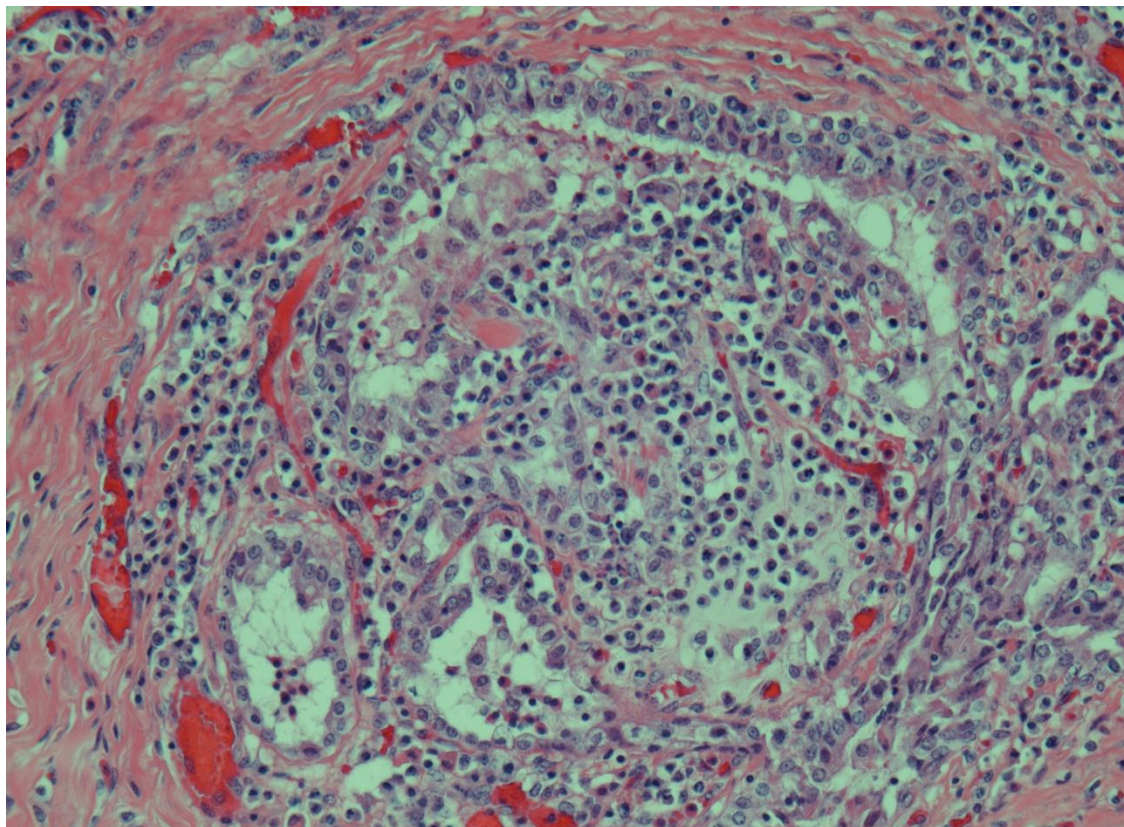
Slika 68: Bronhiektazija, napolnjena z gnojem. Povzročitelj: *M. bovis* (P32), HE, x 40

Figure 68: Bronchiectasis filled with pus. *M. bovis* (P32), HE, x 40



Slika 69: Obliterirajoči bronhiolitis - brstenje papilarnih podaljškov v lumen bronhiola. Povzročitelj: *M. bovis* (P32), HE, x 100

Figure 69: Obliterative bronchiolitis - proliferation of papillary projections in the bronchiolar lumen. *M. bovis*. (P32) HE, x 100



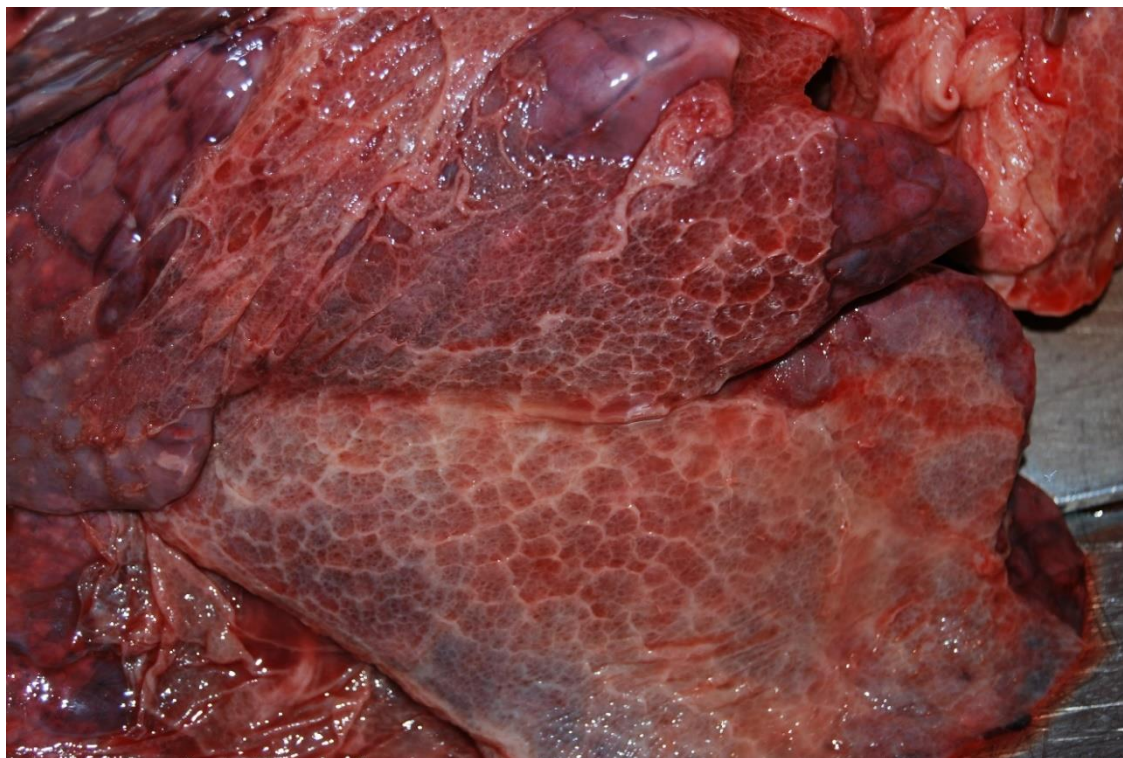
Slika 70: Obliterirajoči bronhiolitis. Povzročitelj: *M. bovis* (P32), HE, x 200

Figure 70: Obliterative bronchiolitis. *M. bovis* (P32), HE, x 200



Slika 71: Bika, ki sta poginila zaradi akutne pljučne manheimioze, sta v dobrem rejnem stanju (levo P18; desno P26).

Figure 71: Good body condition of young bulls, whose deaths were caused by the effects of acute manheimiosis (left P18; right P26).



Slika 72: Akutna fibrinozna bronhopnevmonija s fibrinoznim plevritisom (P18)

Figure 72: Acute fibrinous bronchopneumonia with fibrinous pleuritis (P18)



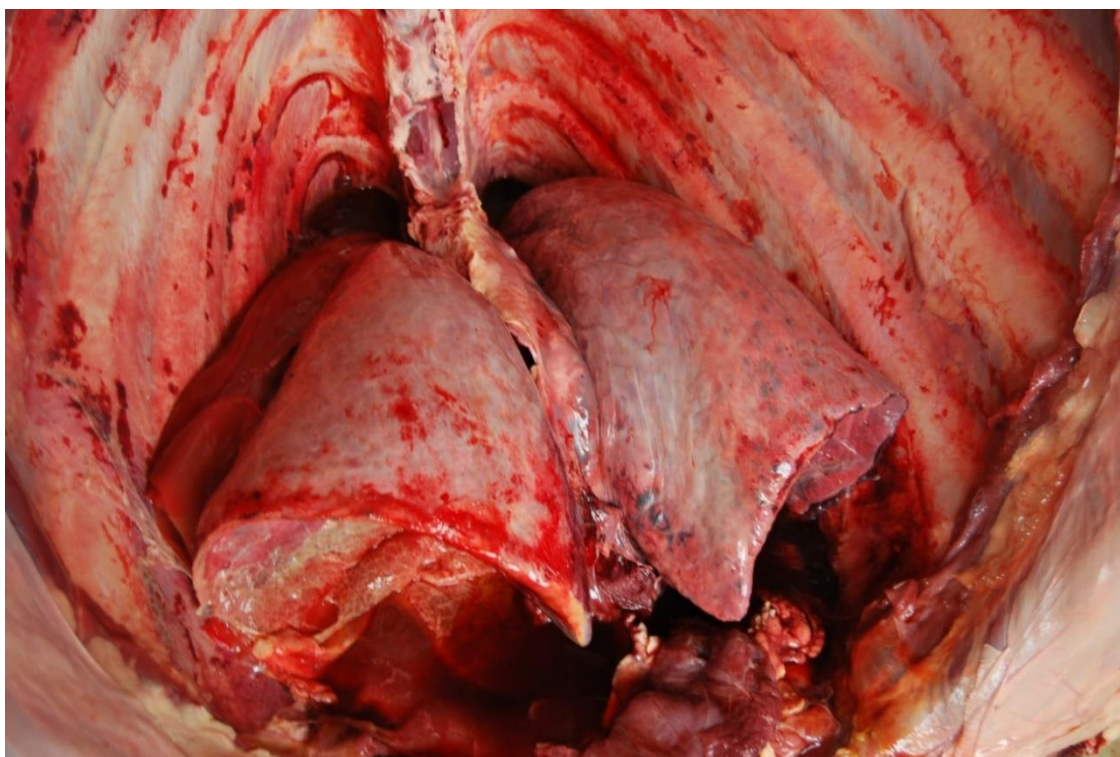
Slika 73: Akutna fibrinozna bronhopnevmonija s plevritisom, ki jo je povzročila bakterija *M. haemolytica* (P26).

Figure 73: Acute fibrinous bronchopneumonia with pleuritis caused by *M. haemolytica* (P26).



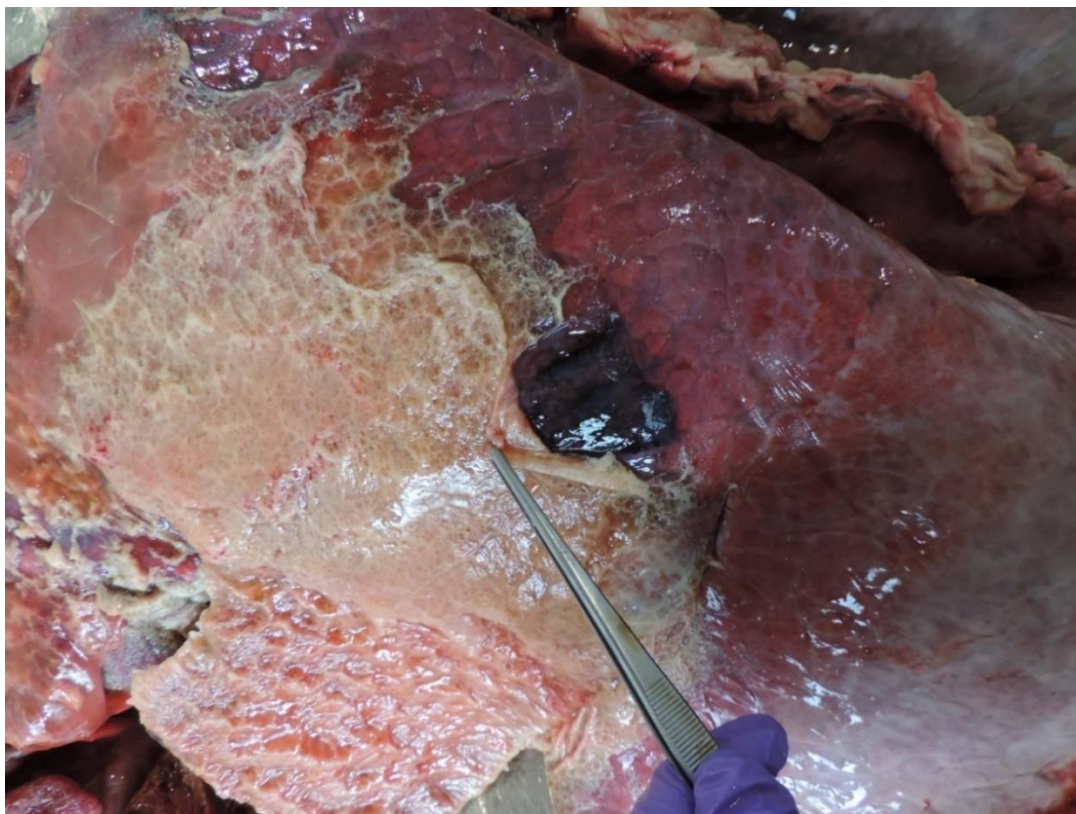
Slika 74: Marmoriran videz rezne ploskve pljuč pri fibrinozni bronhopnevmoniji. Povzročitelj: *M. haemolytica* (P26)

Figure 74: Marble-like look of cutting surface at fibrinous bronchopneumonia. *M. haemolytica* (P26)



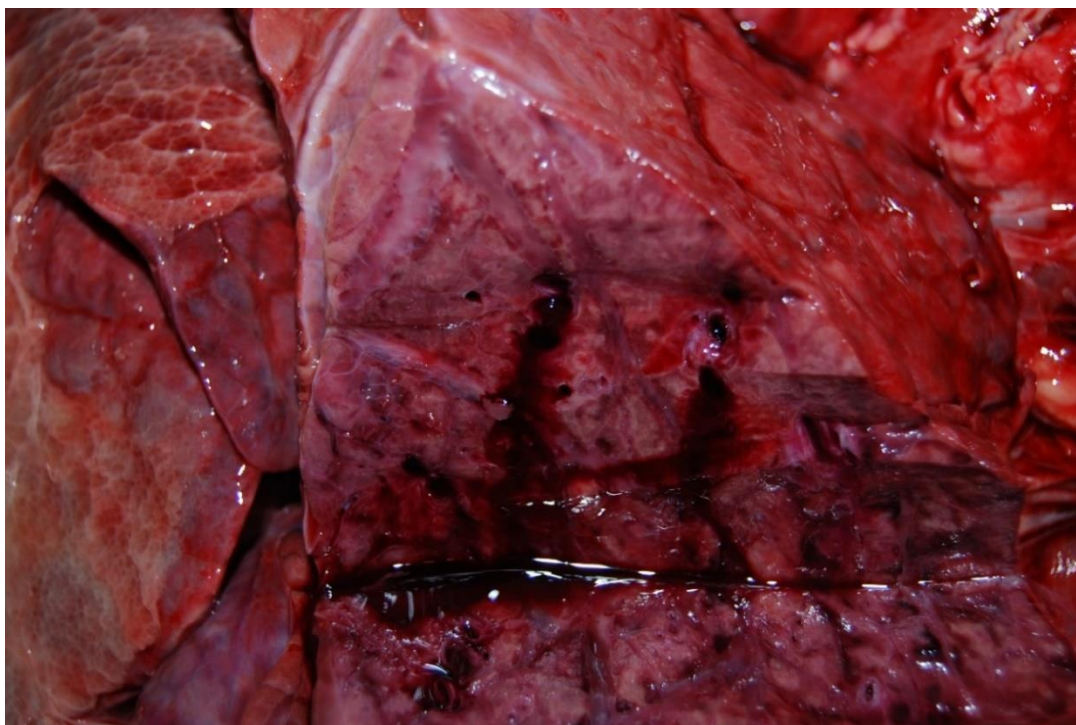
Slika 75: Fibrinozno hemoragični eksudat v prsni votlini. Slika akutne pljučne manheimioze (P85)

Figure 75: Fibrinous hemorrhagic exudate in thoracic cavity. A picture of acute pulmonary manheimiosis (P85)



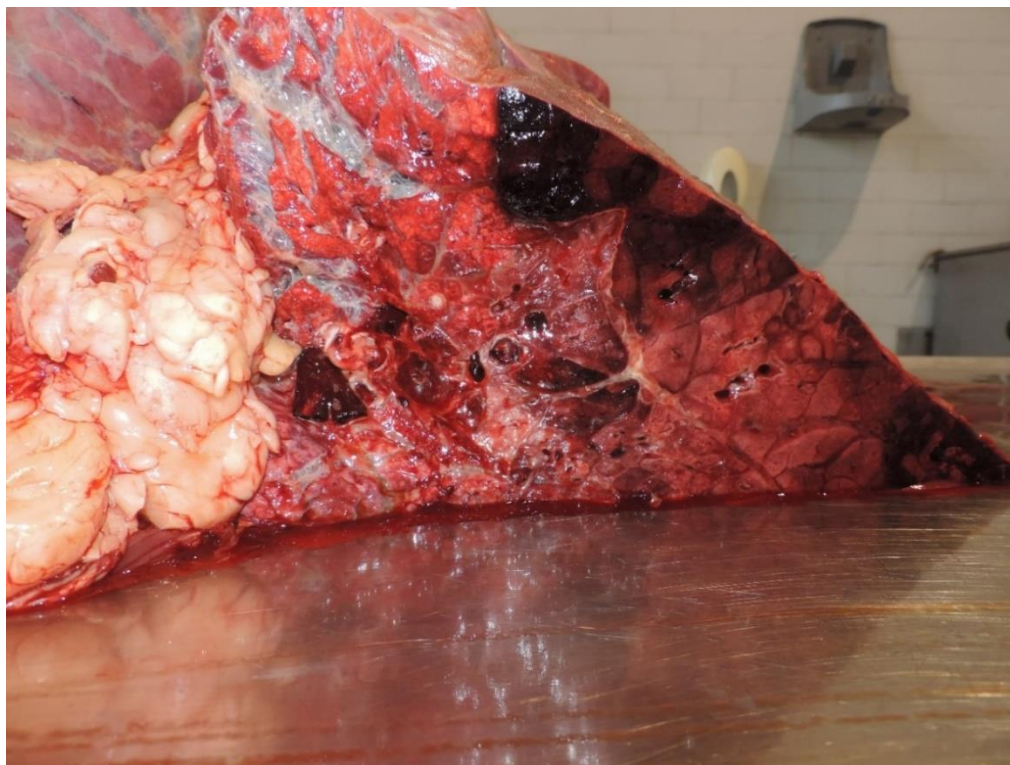
Slika 76: Hemoragično pnevmonično žarišče pri akutni pljučni manheimiozi (P85)

Figure 76: Hemorrhagic pneumonic focus in acute pulmonary manheimiosis (P85)



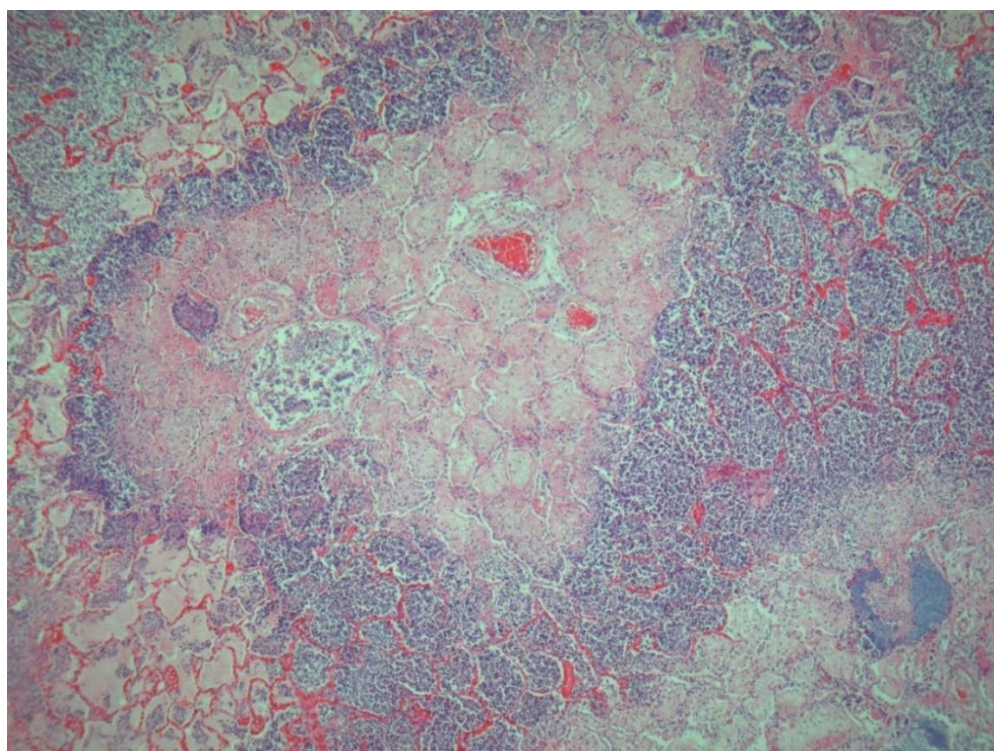
Slika 77: Fibrinозна bronhopnevmonija - nekroza pljučnega tkiva in fibrinózni plevritis (P18)

Figure 77: Fibrinous bronchopneumonia - necrosis of lung tissue and fibrinous pleuritis (P18)



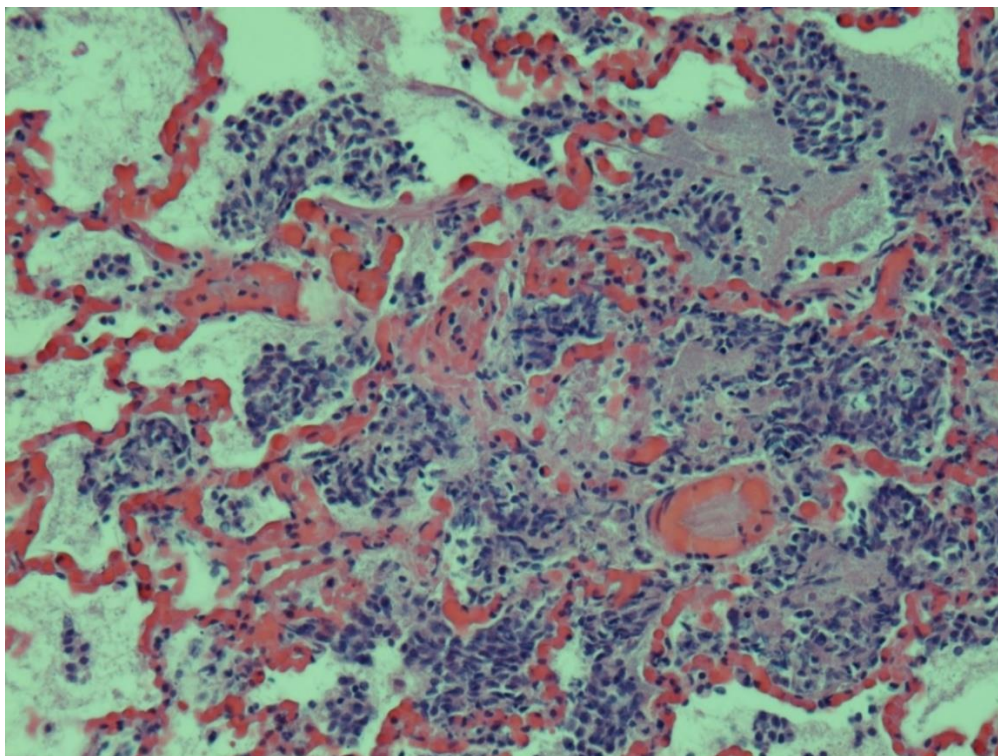
Slika 78: Hemoragična pnevmonična žarišča pri fibrinozni bronhopnevmoniji (P51)

Figure 78: Haemorrhagic pneumonic focuses of fibrinous bronchopneumonia (P51)



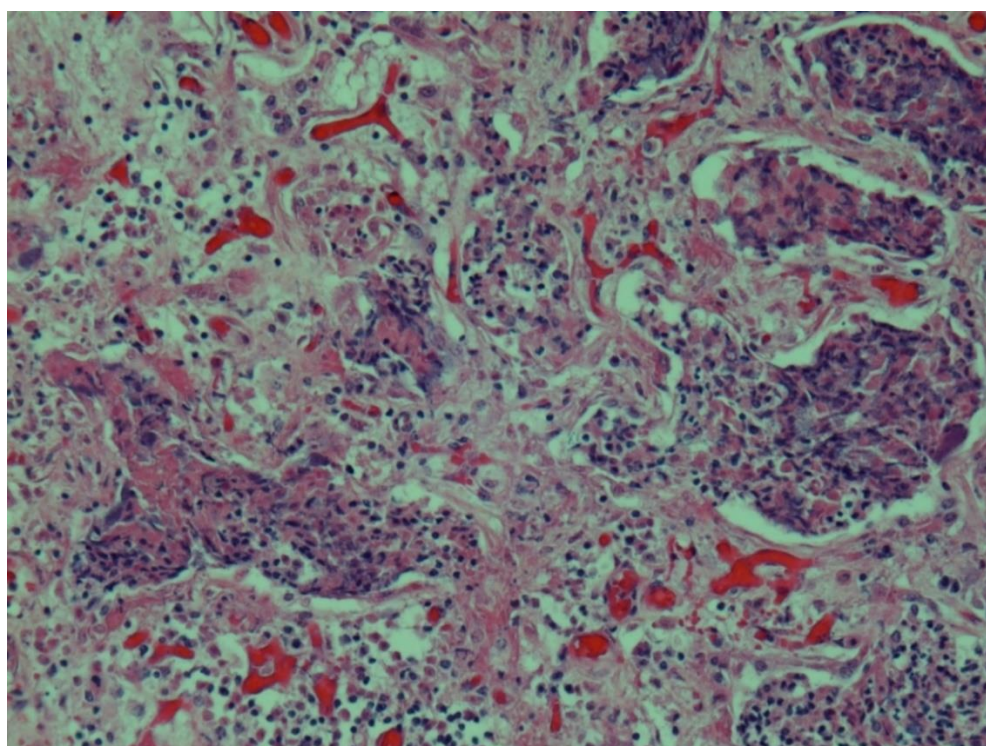
Slika 79: Nekrotični predeli pljučnega tkiva, obrobljeni s pasom ovsenih celic. Povzročitelj: *M. haemolytica* (P86), HE, x 40

Figure 79: Necrotic areas of lung tissue, surrounded by oat cells. *M. haemolytica* (P86), HE, x 40



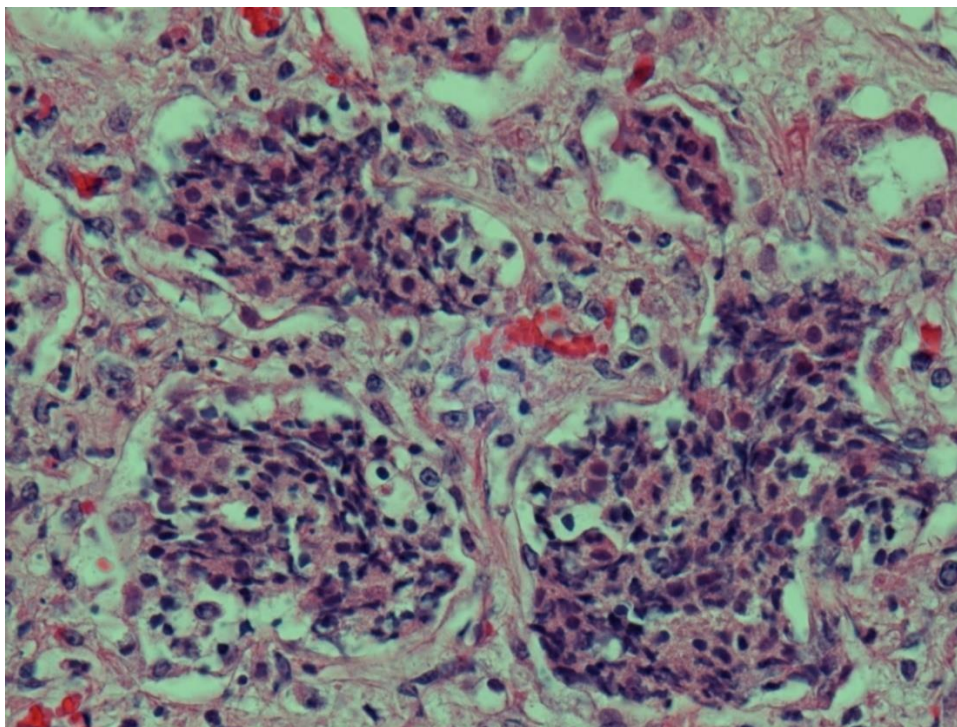
Slika 80: Alveole polne fibrina in ovsenih celic - fibrinozna bronhopnevmonija (P26), HE, x 200

Figure 80: Alveoli filled with fibrine and oat cells - fibrinous bronchopneumonia (P26), HE, x 200



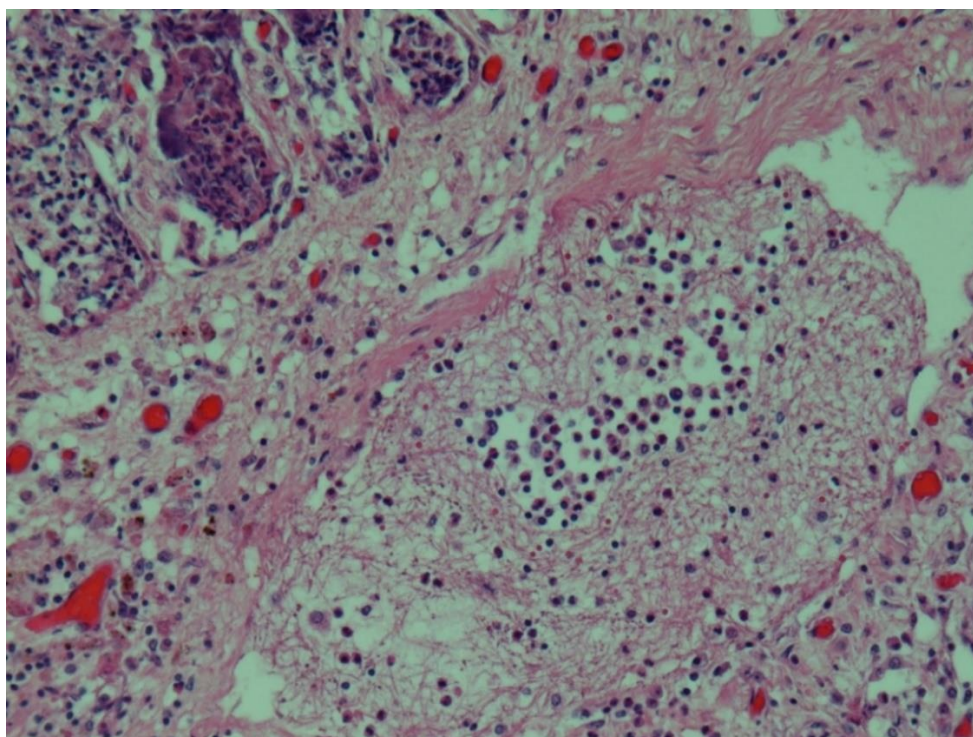
Slika 81: Kolonije bakterij, granulociti, ovsene celice in fibrin v alveolih. Povzročitelj: *M. haemolytica* (P86), HE, x 200

Figure 81: Bacterial colonies, granulocytes, oat cells and fibrin in alveoli. *M. haemolytica* (P86), HE, x 200



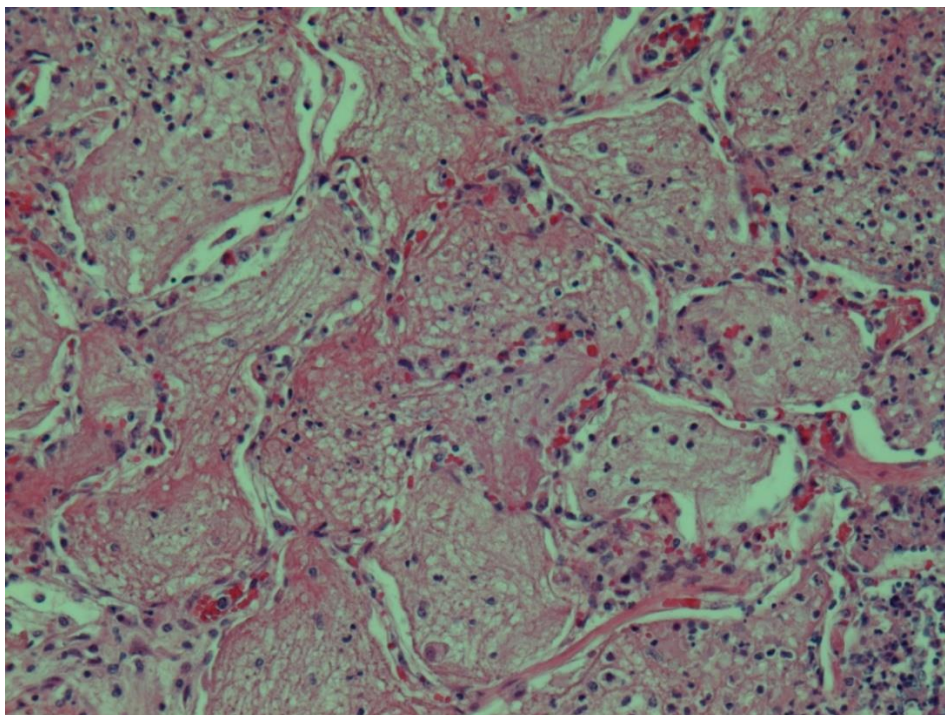
Slika 82: Alveoli, polni nevtrofilnih granulocitov, ki se spreminjajo v ovsene celice. Povzročitelj: *M. haemolytica* (P86), HE, x 400

Figure 82: Alveoli filled with neutrophil granulocytes which are transforming into oat cells. *M. haemolytica* (P86), HE, x 400



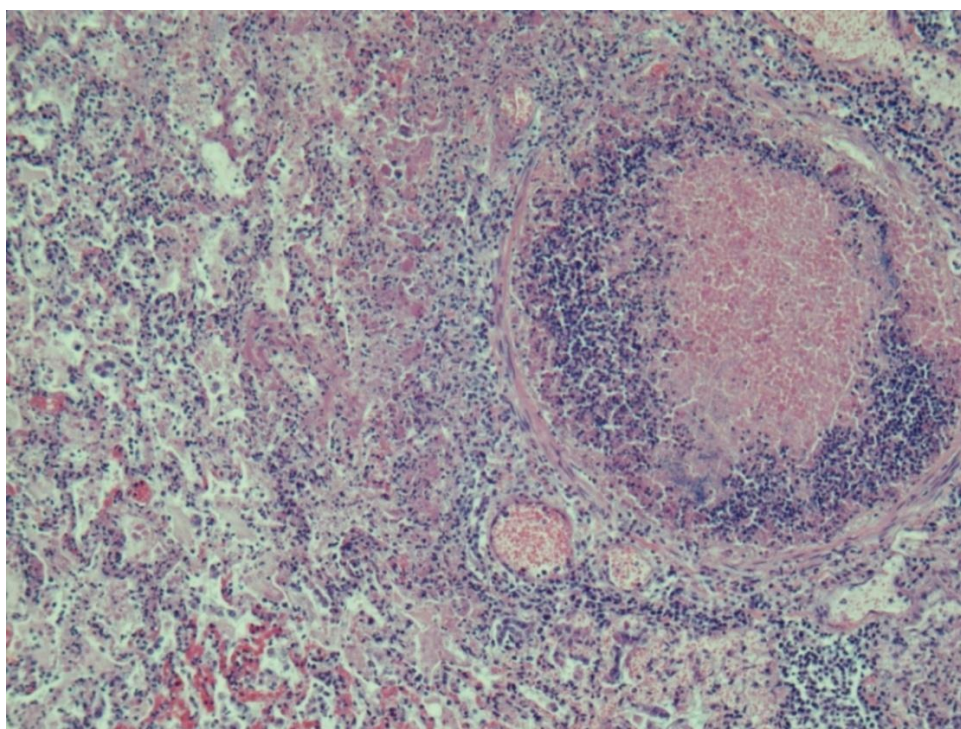
Slika 83: Tromboza mezgovnice v interlobularnem intersticiju. Povzročitelj: *M. haemolytica* (P86), HE, x 200

Figure 83: Thrombosis of lymphatic vessel in interlobular interstitium. *M. haemolytica* (P86); HE, x 200



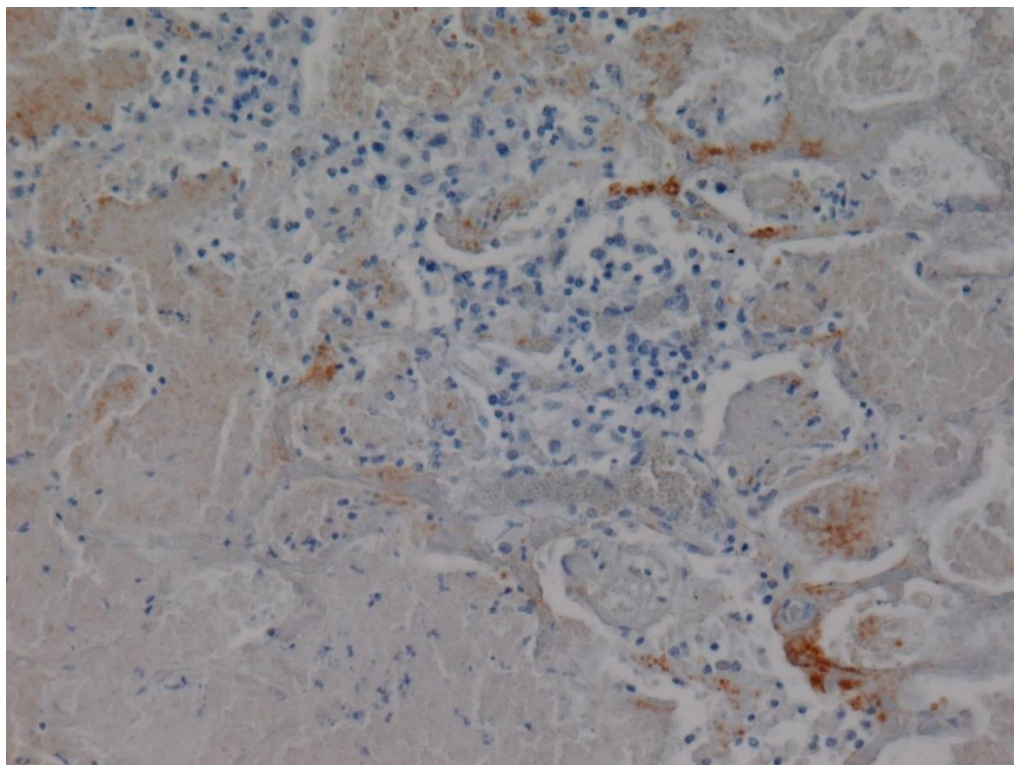
Slika 84: Alveoli polni fibrina, v katerem so posamezne vnetne celice. Povzročitelj: *M. haemolytica* (P86), HE, 200 x

Figure 84: Alveoli filled with fibrinous exudat containing some inflammatory cells. *M. haemolytica* (P86), HE, x 200



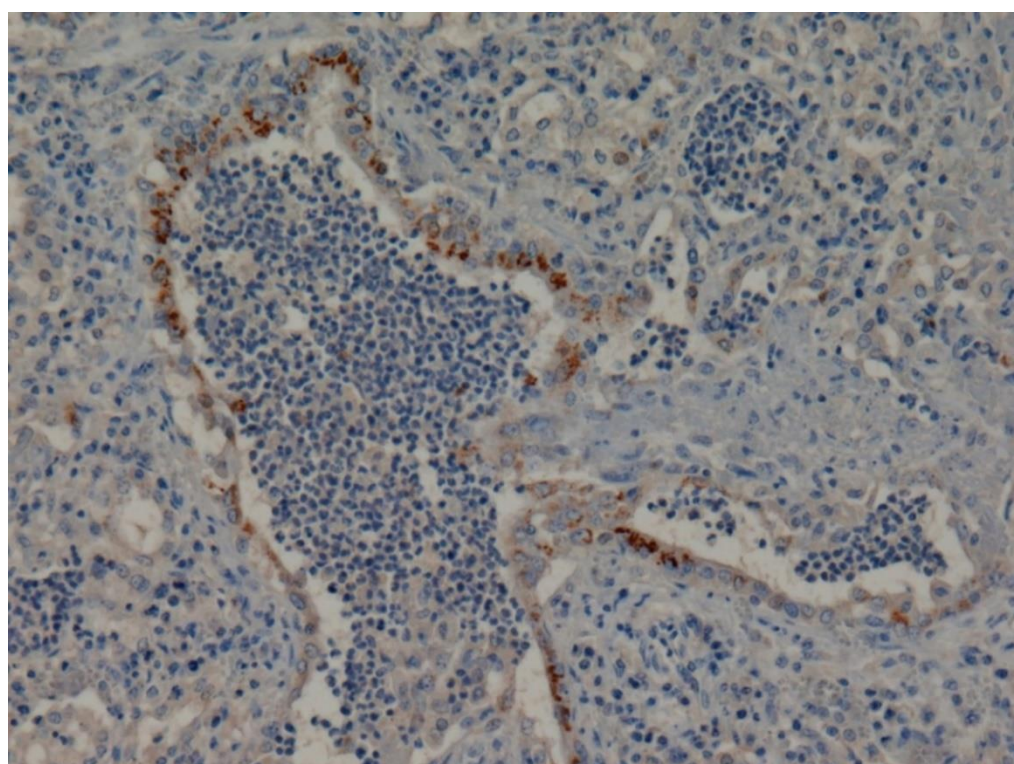
Slika 85: Nekrotični bronhiolitis pri okužbi z BoHV-1. (P3), HE, x 100

Figure 85: Necrotic bronchiolitis in infection with BoHV-1. (P3), HE, x 100



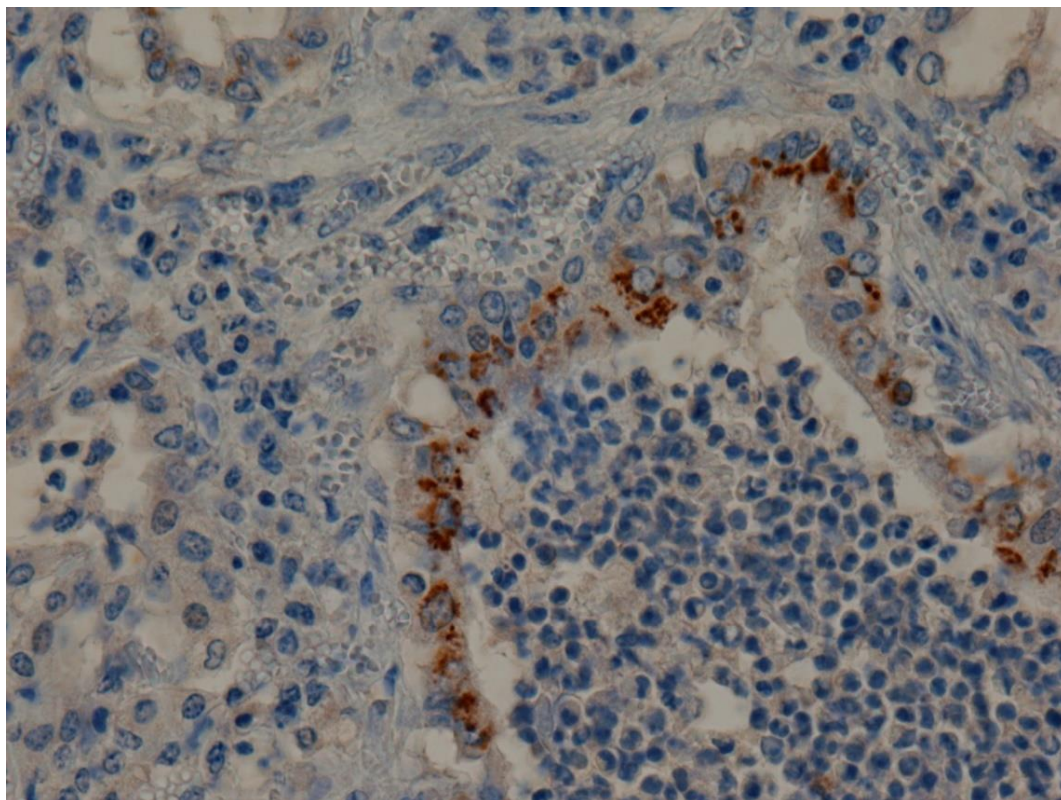
Slika 86: Diskretna pozitivna imunohistokemična reakcija na BPI3 (P1); x 200

Figure 86: Discrete positive immunohistochemical reaction to BPI3 (P1); x 200



Slika 87: Pozitivna imunohistokemična reakcija na *M. bovis* v epitelijskih celicah bronhiola (P37); x 200

Figure 87: Positive immunohistochemical reaction to *M. bovis* in epithelial cells of bronchioles (P37); x 200



Slika 88: Pozitivna imunohistokemična reakcija na *M. bovis* v epitelijskih celicah bronhiola (P37); x 400

Figure 88: Positive immunohistochemical reaction to *M. bovis* in epithelial cells of bronchioles (P37); x 400



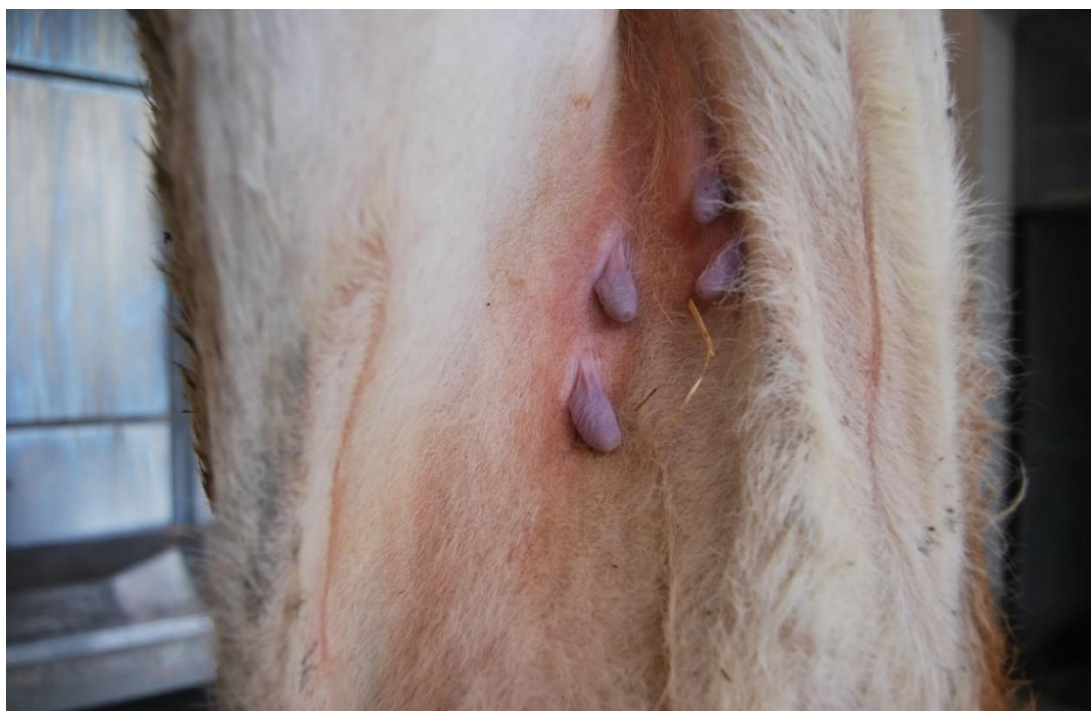
Slika 89: Izrazita cianoza smrčka in sluznice ustnic - posledica hipoksije. Povzročitelj: BRSV (P87)

Figure 89: Severe cyanosis of the muzzle and oral mucosa due to hypoxia. BRSV (P87)



Slika 90: Cianoza smrčka, očesnih veznic in kože - posledica hipoksije. Povzročitelj: BRSV (P80)

Figure 90: Cyanosis of the muzzle, conjunctivae and skin due to hypoxia. BRSV (P80)



Slika 91: Cianoza kože je dobro vidna le na neporaslih delih telesa – izrazita cianoza seskov. Povzročitelj: BRSV (P 87)

Figure 91: Cyanosis of the skin is visible only on the hairless parts of the body – severe teats cyanosis. BRSV (P 87)



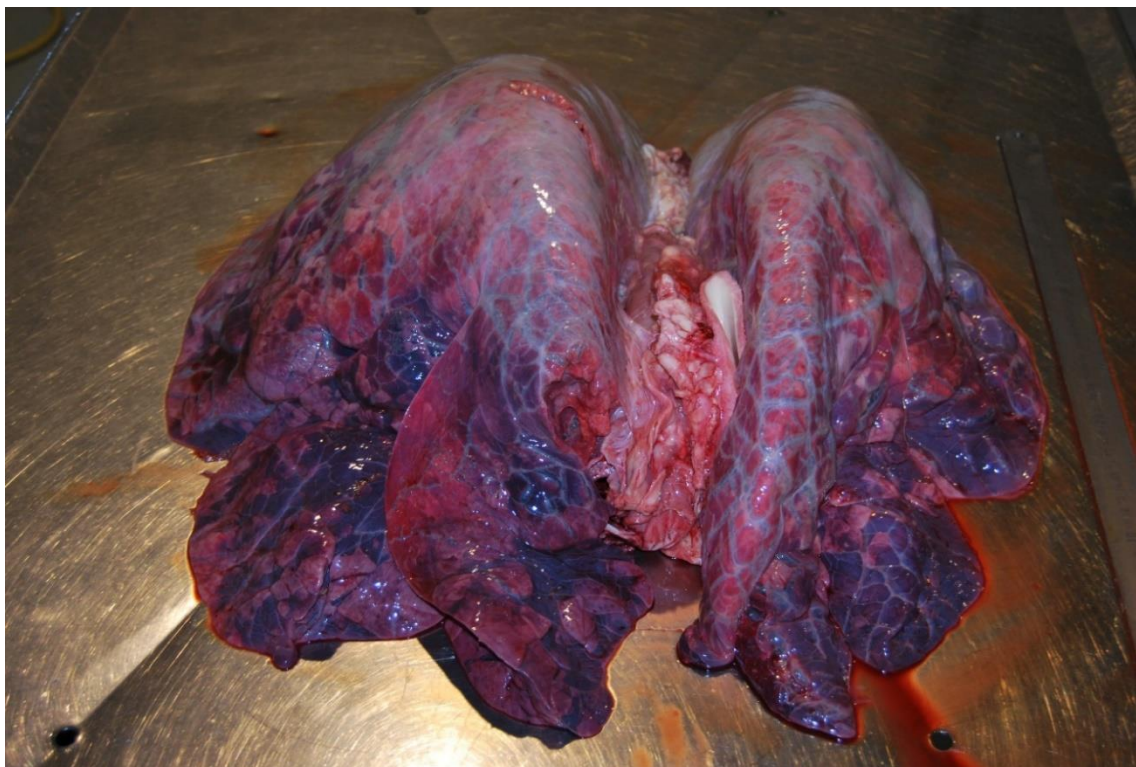
Slika 92: Akutna bronhointersticijska pljučnica - konsolidacija kranioventralnih delov in emfizem kaudalnih delov pljuč. Povzročitelj: BRSV (P87)

Figure 92: Acute bronchointerstitial pneumonia - consolidation of cranioventral parts and emphysema of caudal parts of the lung. BRSV (P87)



Slika 93: Akutna bronhointersticijska pljučnica. Povzročitelj: BRSV (P5)

Figure 93: Acute bronchointerstitial pneumonia. BRSV (P5)



Slika 94: Akutna bronhointersticijska pljučnica. BRSV (P5)

Figure 94: Acute bronchointerstitial pneumonia. BRSV (P5)



Slika 95: Akutna bronhointersticijska pljučnica - izrazit emfizem kavdalnih delov pljuč. BRSV (P33)

Figure 95: Acute bronchointerstitial pneumonia. Severe emphysema of caudal parts of the lung. BRSV (P33)



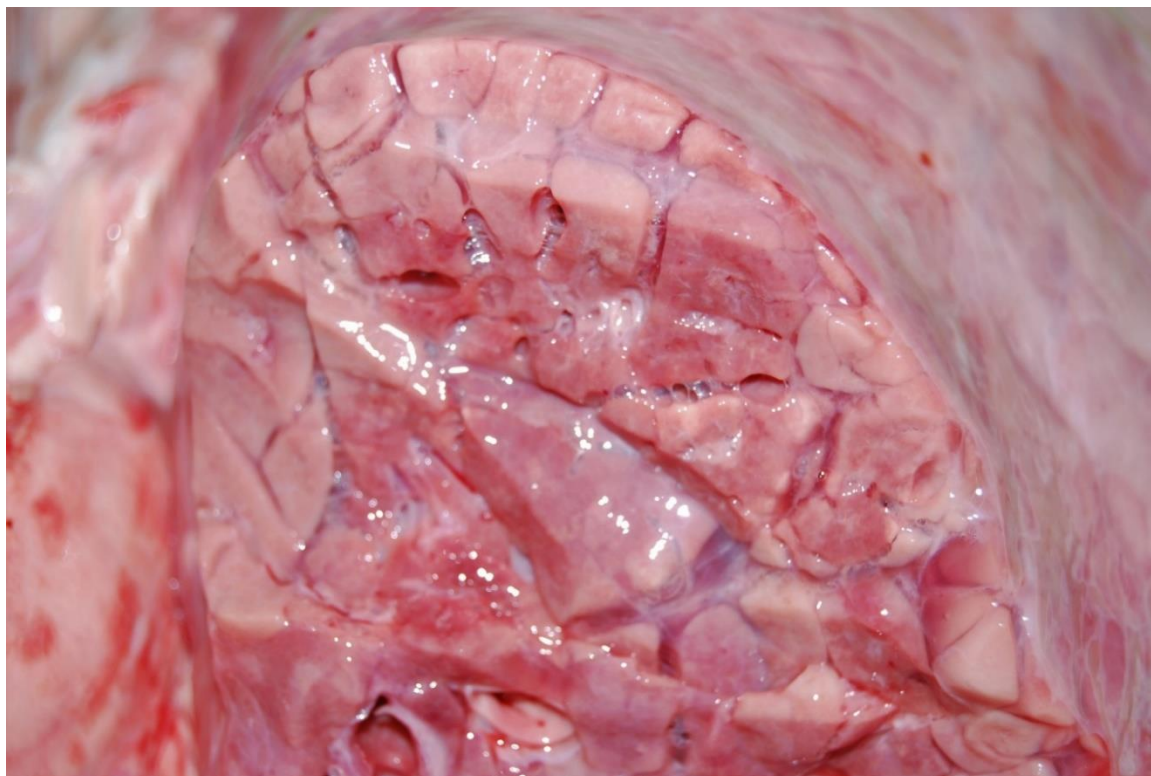
Slika 96: Akutna bronhointersticijska pljučnica - mesnatost kranialnih delov, bulozni emfizem kavdalnih delov pljuč. BRSV (P80)

Figure 96: Acute bronchointerstitial pneumonia - meaty cranial parts and bulous emphysema of caudal parts of the lung. BRSV (P80)



Slika 97: Bulozni emfizem kavdalnih pljučnih režnjev. BRSV (P80)

Figure 97: Bulous emphysema of caudal lung lobes. BRSV (P80)



Slika 98: Mesnat videz pljučnega tkiva, bronhiji so brez eksudata. BRSV (P79)

Figure 98: Meaty appearance of lung tissue, no exudate in the bronchioles. BRSV (P79)



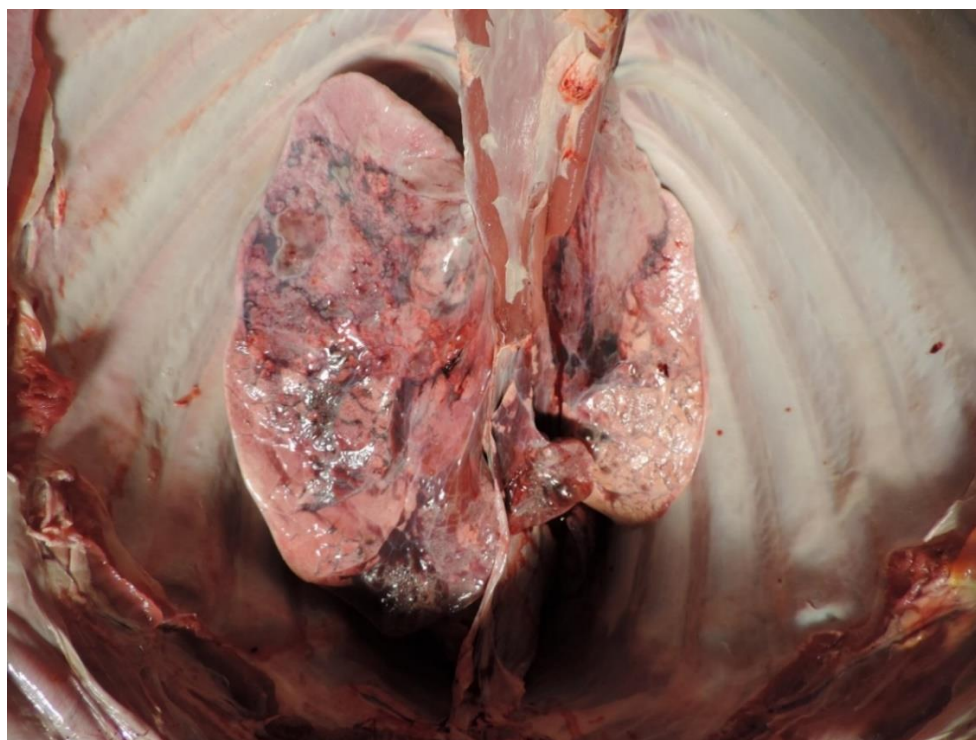
Slika 99: Prečni prerez kavdalnega pljučnega režnja - akutna bronhointersticijska pljučnica. BRSV (P32)

Figure 99: Cross-section of caudal lung lobe - acute bronchointerstitial pneumonia. BRSV (P32)



Slika 100: Ruptura popljučnice v predelu emfizematoznih sprememb je privedla do pnevmotoraksa. BRSV (P117)

Figure 100: Rupture of pulmonary pleura in the region of emphysematous changes caused pneumothorax. BRSV (P117)



Slika 101: Atelektaza pljuč zaradi pnevmotoraksa. BRSV (P90)

Figure 101: Pulmonary atelectasis due to pneumothorax. BRSV (P90)



Slika 102: Ruptura popljučnice. BRSV (P90)

Figure 102: Rupture of pulmonary pleura. BRSV (P90)



Slika 103: Pneumonični pljučni režnjiči v okolici bronhov kažejo na bronhogeno širjenje okužbe. BRSV (P90)

Figure 103: Pneumonic lung lobules around the bronchi indicate the bronchogenic spread of infection. BRSV (P90)



Slika 104: Konsolidacija kranioventralnih delov pljuč. BRSV (P105)

Figure 104: Consolidation of cranioventral parts of the lung, BRSV (P105)



Slika 105: Emfizem je povzročil poke interlobularnega intersticija s posledičnimi krvavitvami. BRSV (P105)

Figure 105: The emphysema caused rupture of interlobular interstitium, leading to haemorrhages. BRSV (P105)



Slika 106: Bronhointersticijska pljučnica. BRSV (P113)

Figure 106: Bronchointerstitial pneumonia. BRSV (P113)



Slika 107: Izrazit interlobularni emfizem je ena od značilnosti infekcije z BRSV (P113).

Figure 107: Obvious interlobular emphysema is one of the characteristics of BRSV infection (P113).



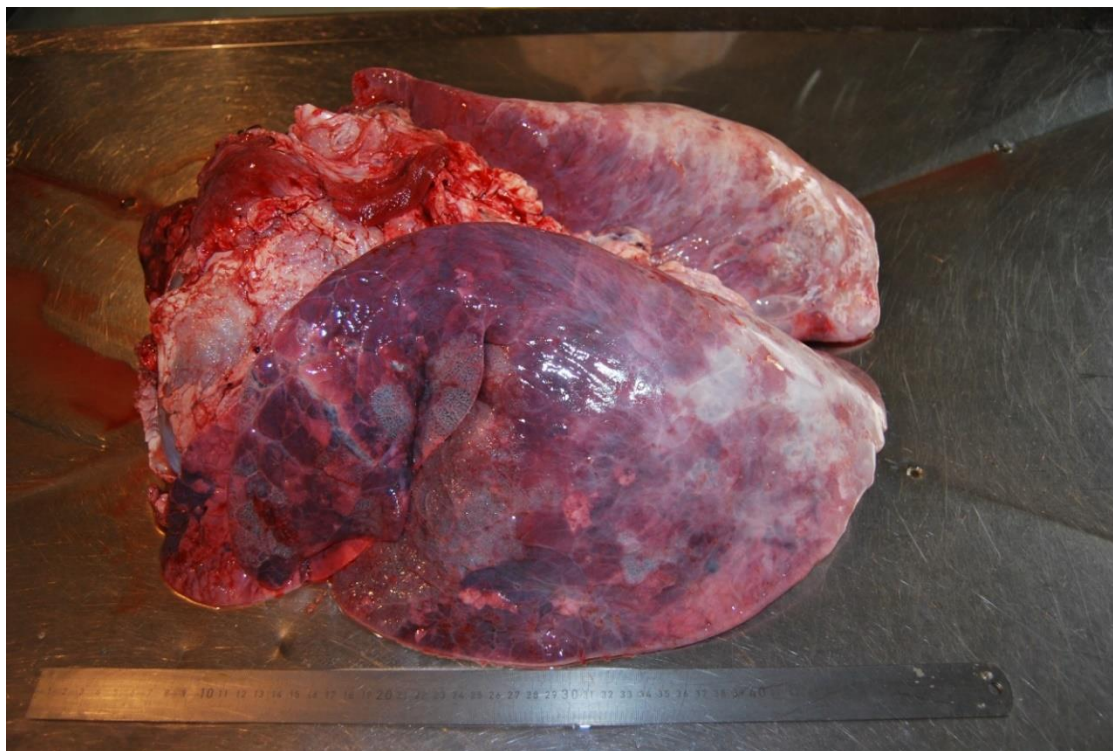
Slika 108: Bronhointersticijska pljučnica komplicirana z bakterijsko okužbo. BRSV, *P. multocida*, BAdV (P27)

Figure 108: Bronchointerstitial pneumonia complicated with bacterial infection. BRSV, *P. multocida*, BAdV (P27)



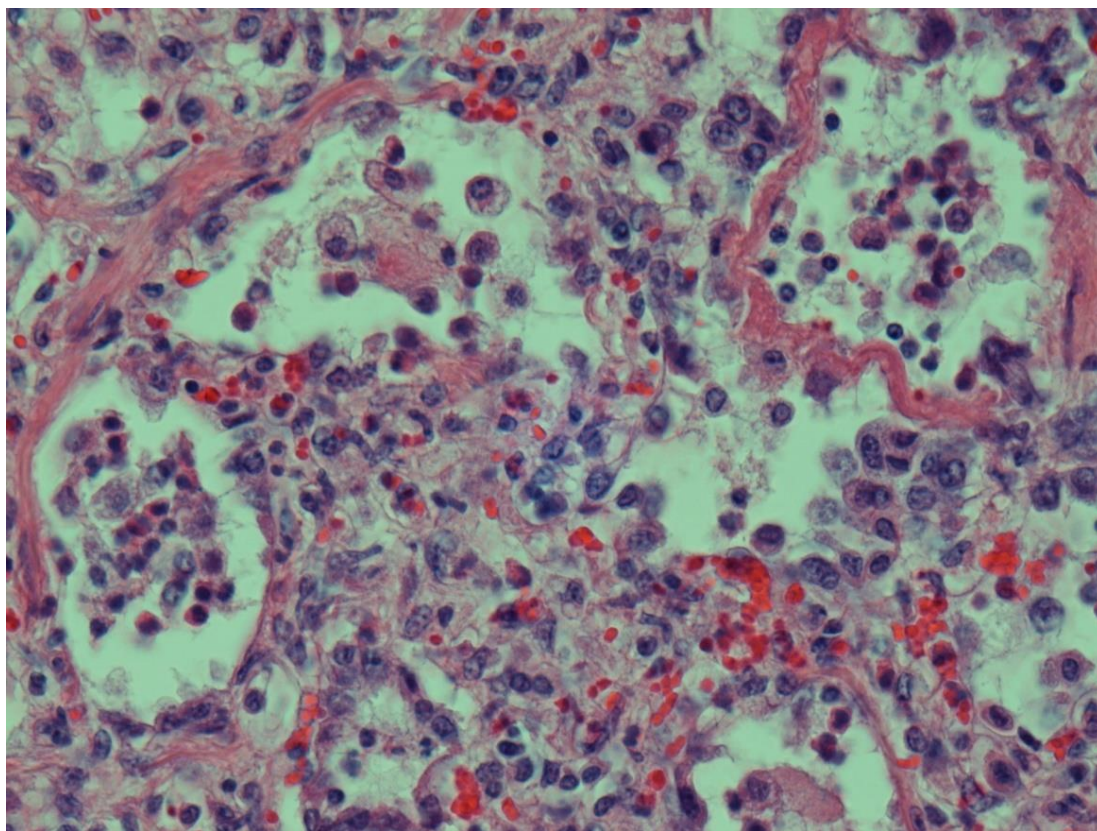
Slika 109: Kronična gnojna bronhopnevmonija, ki jo je povzročila *P. multocida*, v kombinaciji z bronhointersticijsko pljučnico, ki jo je povzročil BRSV (P32).

Figure 109: Chronic purulent bronchopneumonia (*P. multocida*) in combination with bronchointerstitial pneumonia (BRSV) (P32)



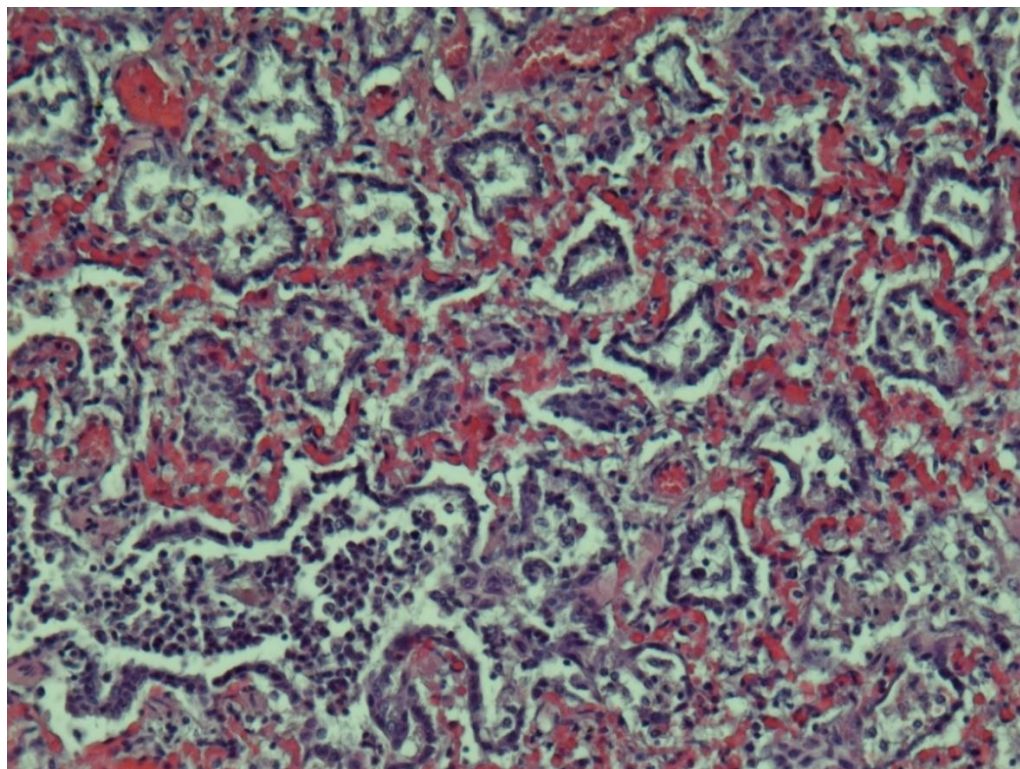
Slika 110: Akutna bronhointersticijska pljučnica. BRSV, *P. multocida* (P9)

Figure 110: Acute bronchointerstitial pneumonia. BRSV, *P. multocida* (P9)



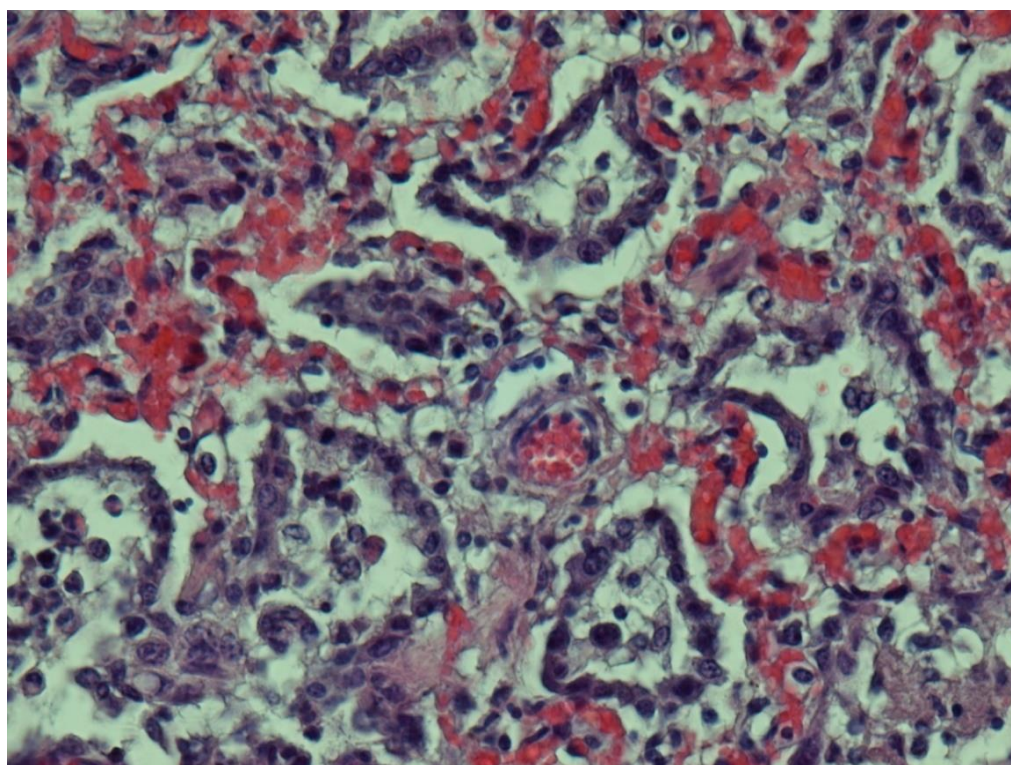
Slika 111: Alveolarne celice so nabrekle in propadle ter odluščene v lumnu alveol. BRSV (P32), HE, x 400

Figure 111: Alveolar cells are swollen and necrotic, peeling off into the alveolar lumen. BRSV (P32), HE x 400



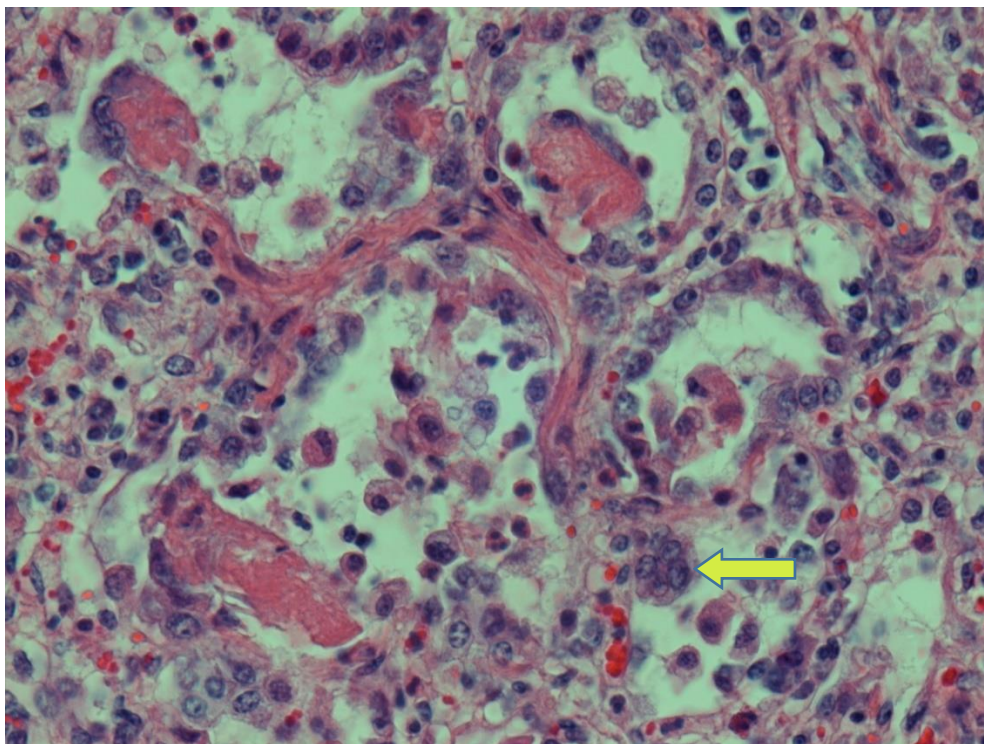
Slika 112: Epitelizacija alveol pri bronhointersticijski pljučnici. BRSV (P4), HE, x 200

Figure 112: Epythelisation of alveoli at bronchointerstitial pneumonia. BRSV (P4). HE, x 200



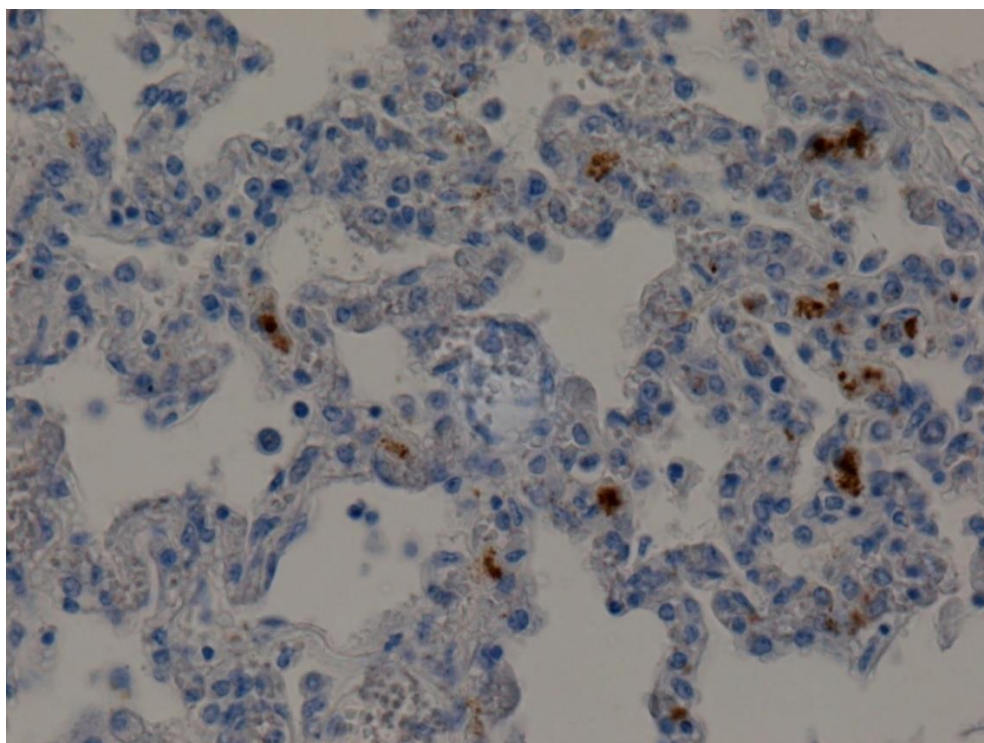
Slika 113: Epitelizacija alveol. BRSV (P4), HE, x 400

Figure 113: Epithelisation of alveoli. BRSV (P4), HE, x 400



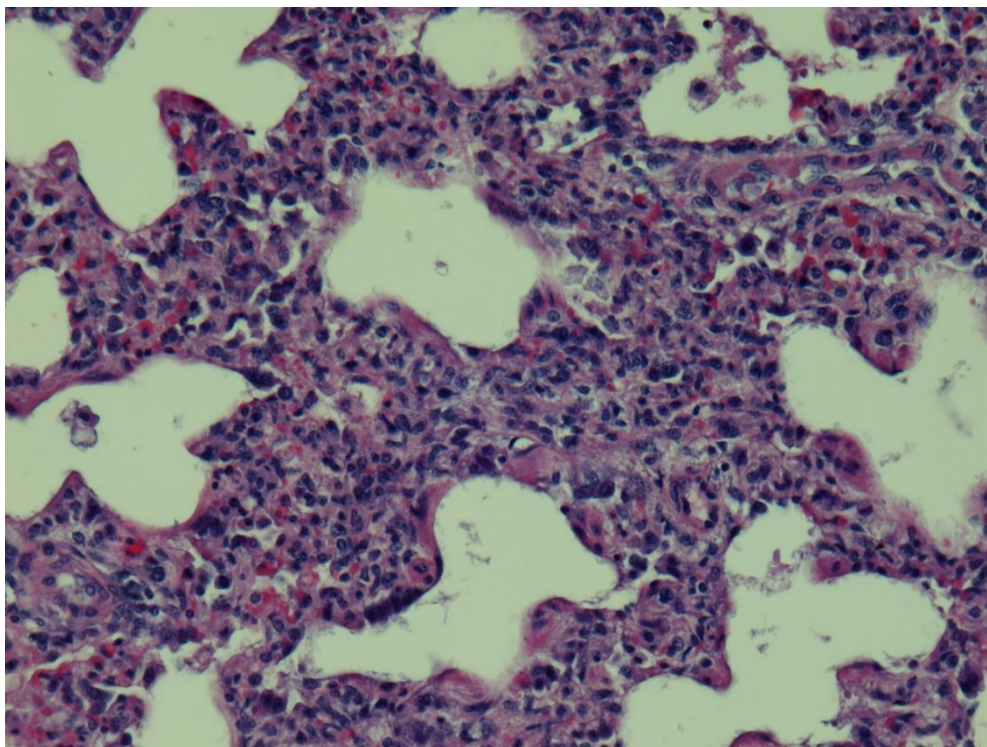
Slika 114: Bronhointersticijska pljučnica - v alveolah so odluščene alveolarne celice, makrofagi, granulociti in sincicijske celice (puščica) (P32), HE, x 400

Figure 114: Bronchioalveolar pneumonia; peeled-off alveolar cells, macrophages, granulocytes and syncytial cells in alveoli (arrow) (P32), HE, x 400



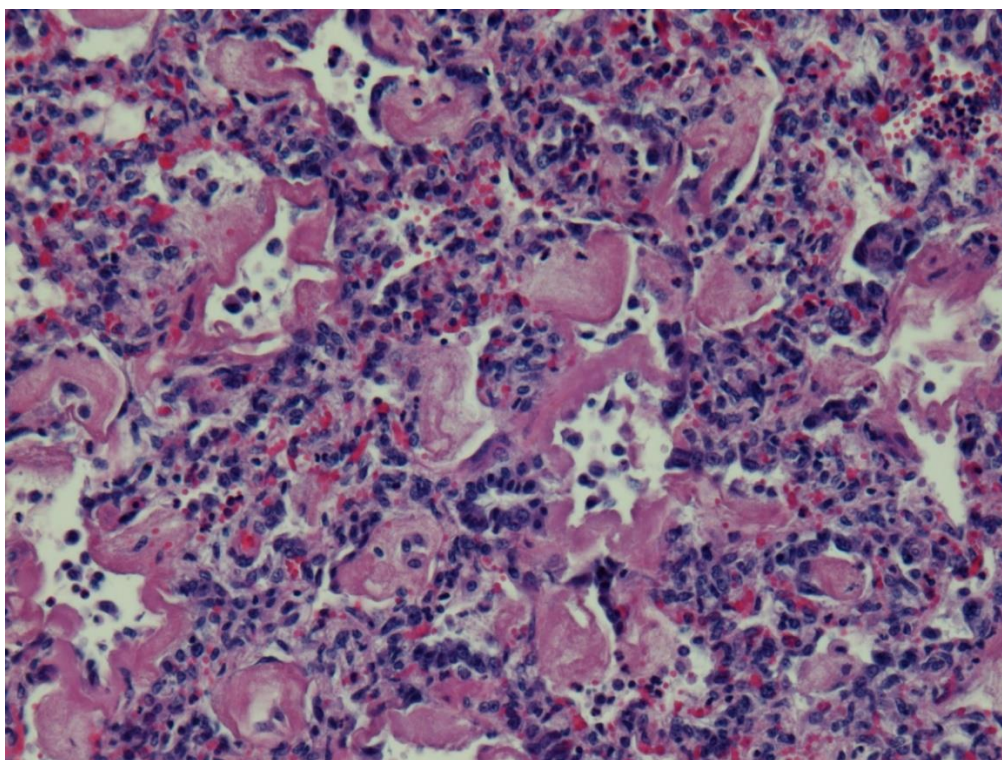
Slika 115: Pozitivna imunohistokemična reakcija na BRSV (P83); x 200

Figure 115: Positive immunohistochemical reaction to BRSV (P83); x 200



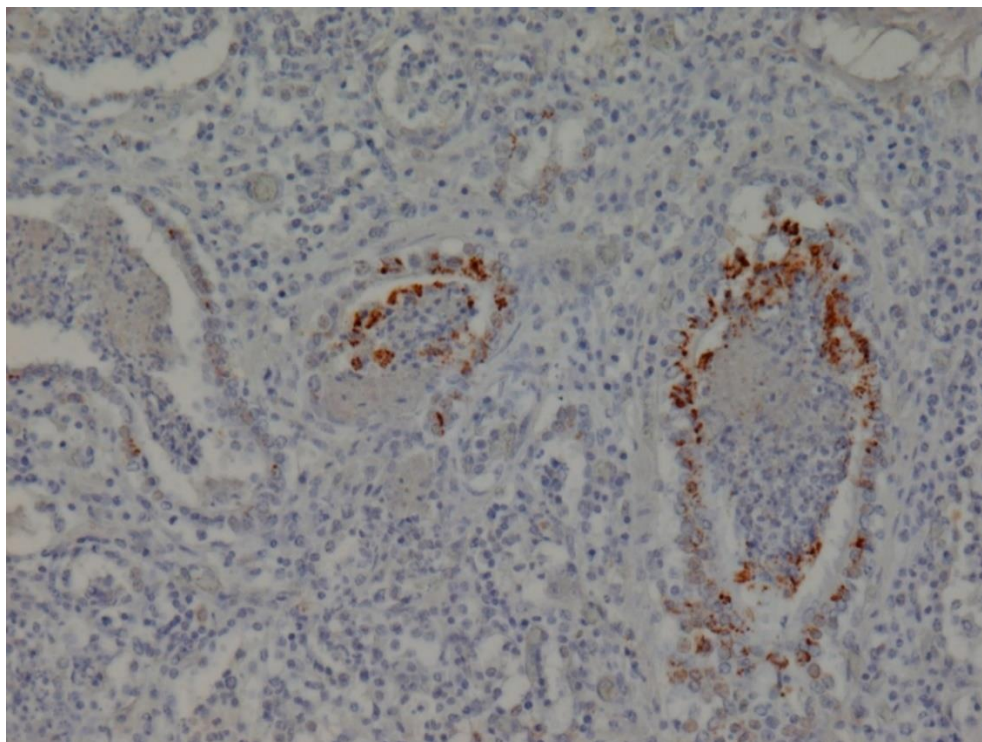
Slika 116: Intersticijska pljučnica - močna zadebelitev interalveolarnega intersticija, ki je infiltriran z vnetnimi celicami. *P. multocida*, BPI3 (P67), HE, 200x

Figure 116: Interstitial pneumonia - severe thickening of interalveolar interstitium which is infiltrated with inflammatory cells. *P. multocida*, BPI3 (P67), HE, 200x



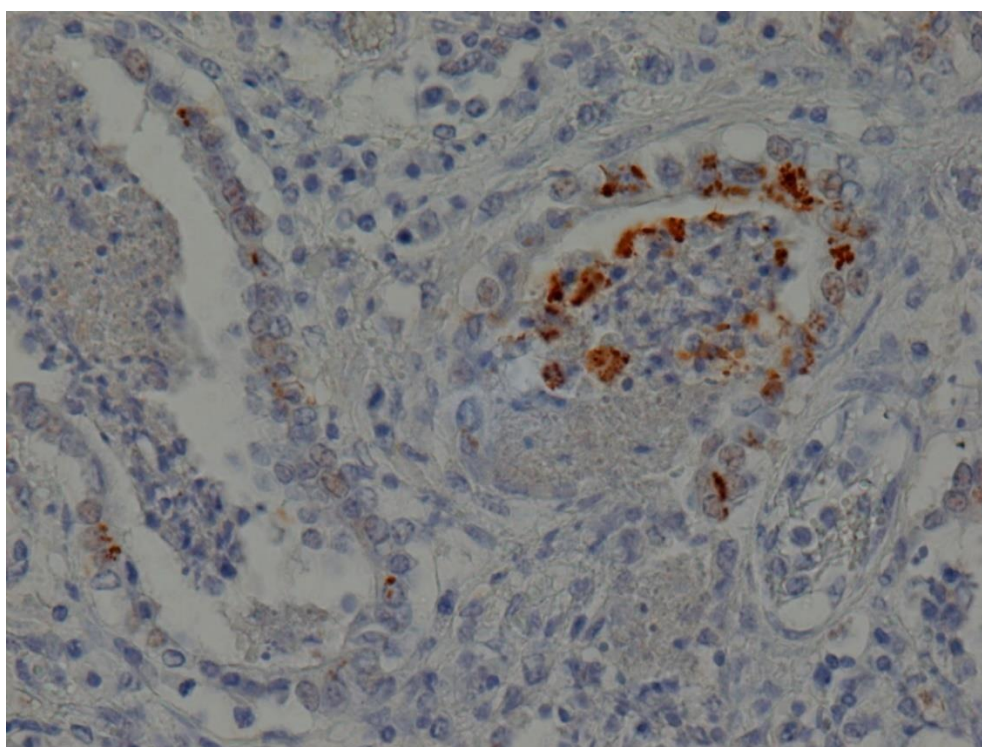
Slika 117: Hialine membrane so ena od značilnosti intersticijske pljučnice (P67), HE, x 200

Figure 117: Hyaline membranes are one of the characteristics of interstitial pneumonia (P67); x 200



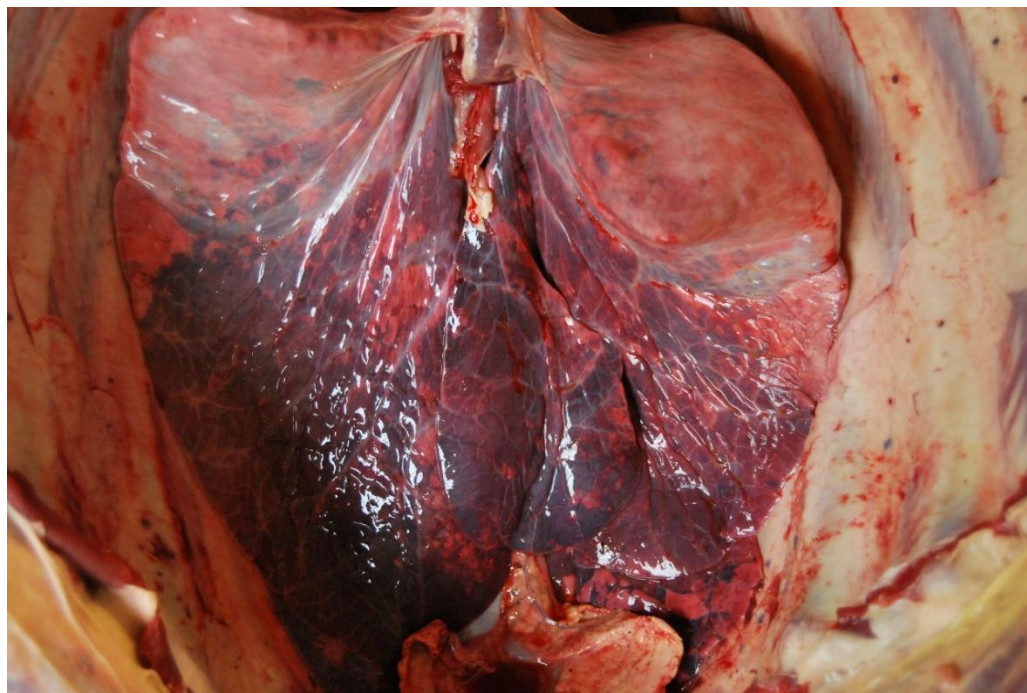
Slika 118: Pozitivna imunohistokemična reakcija na BAdV v epitelijskih celicah bronhiolov (P39); x 200

Figure 118: Positive immunohistochemical reaction to BAdV in epithelial cells of bronchioles (P39); x 200



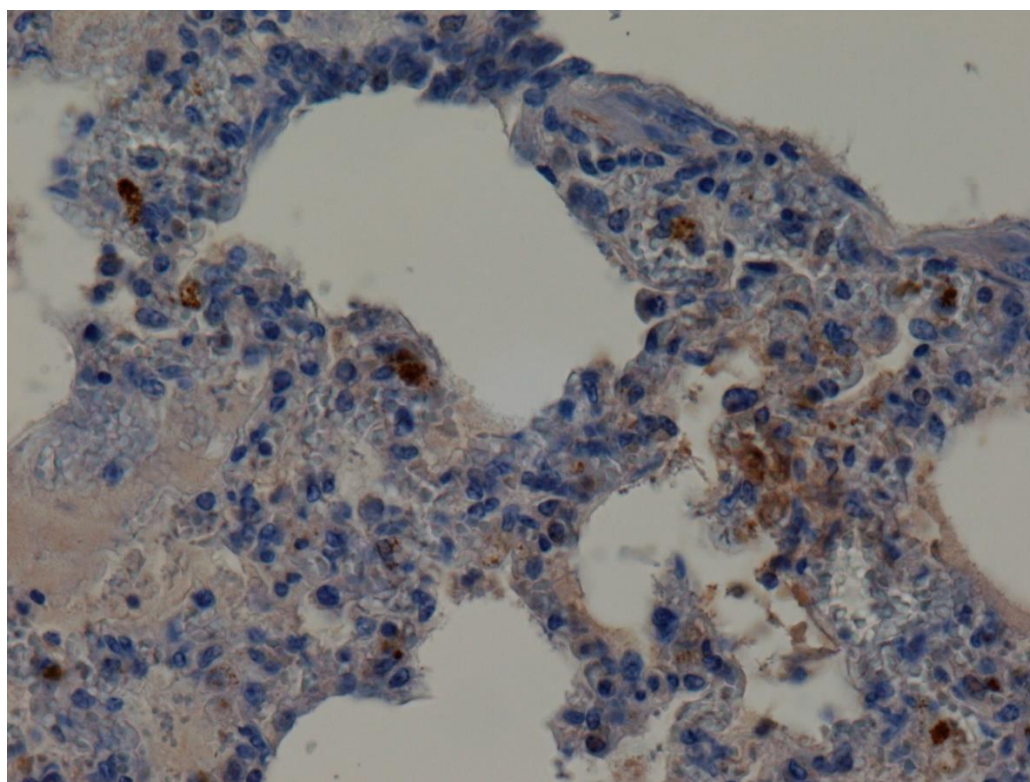
Slika 119: Pozitivna imunohistokemična reakcija na BAdV v epitelijskih celicah bronhiolov in v alveolarnih makrofagih (P39); x 400

Figure 119: Positive immunohistochemical reaction to BAdV in epithelial cells of bronchioles and alveolar macrophages (P39); x 400



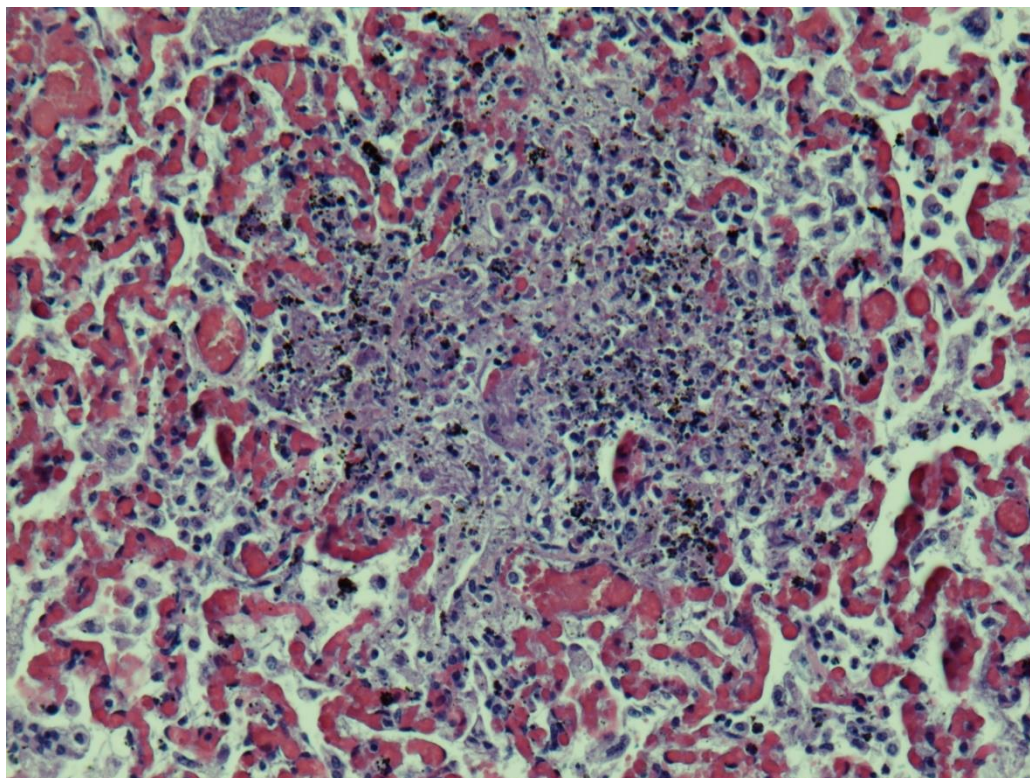
Slika 120: Pljučnica, ki so jo povzročili *P. multocida* in *M. haemolytica* ter BVDV (P83).

Figure 120: Pneumonia caused by *P. multocida*, *M. haemolytica* and BVDV (P83).

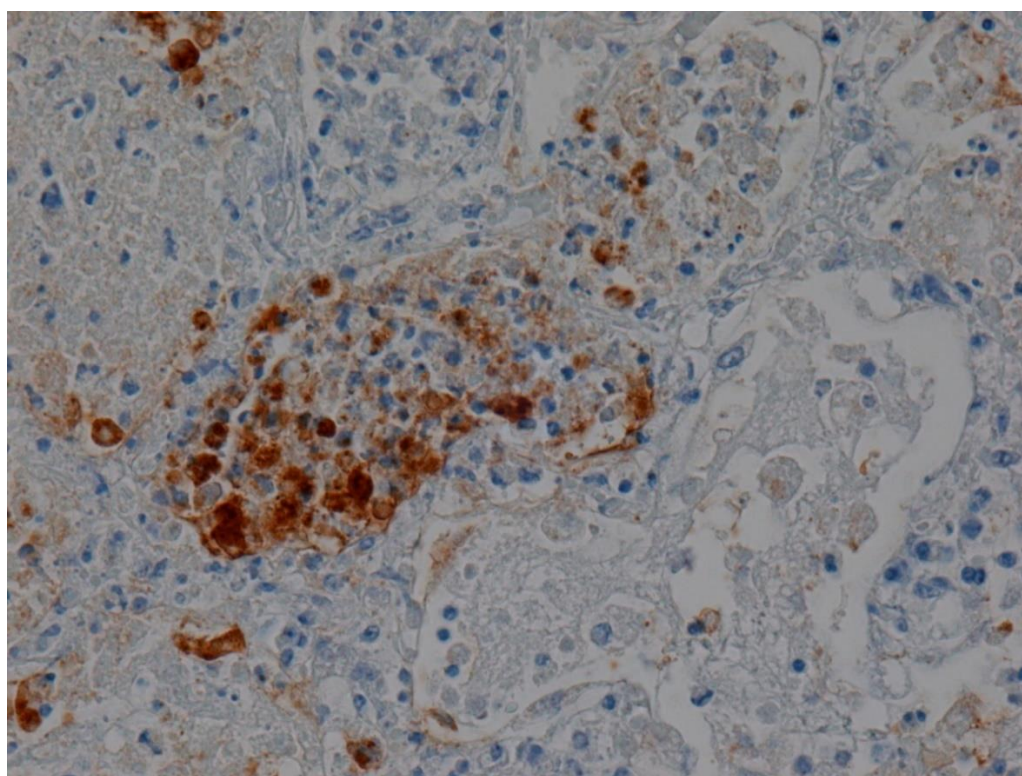


Slika 121: Pozitivna imunohistokemična reakcija na BVDV (P83); x 400

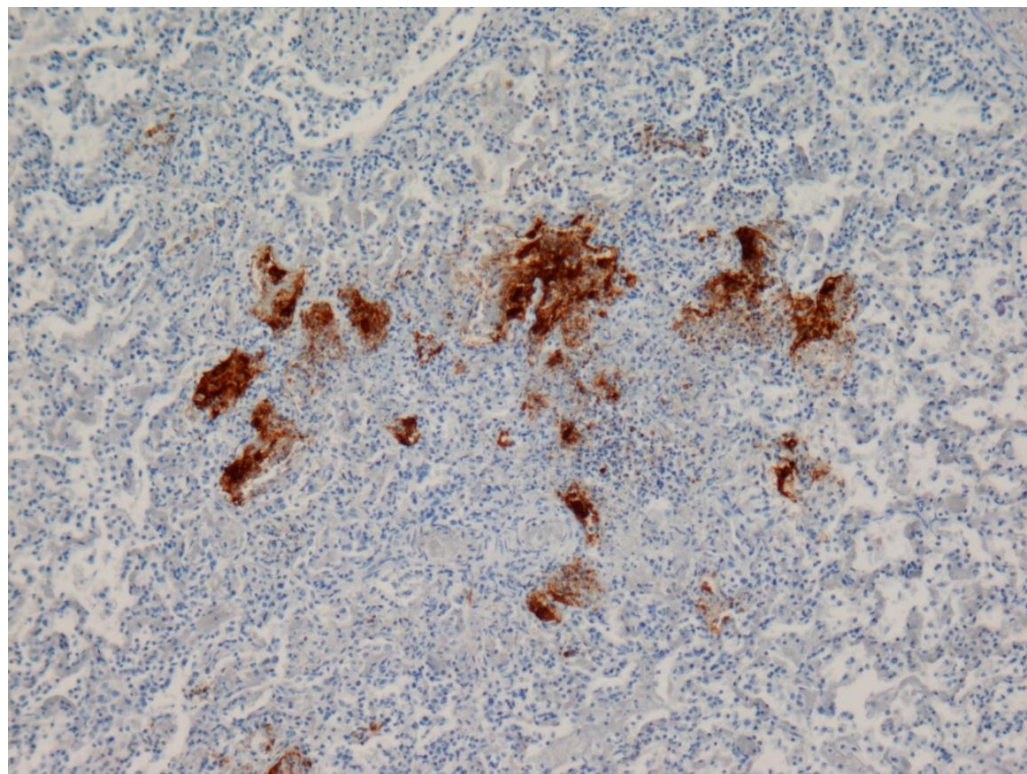
Figure 121: Positive immunohistochemical reaction to BVDV (P83); x 400



Slika 122: Nekrotično žarišče v pljučih goveda, ki je poginilo za posledicami okužbe z BoHV-1 (P3). HE, x 200
Figure 122: Necrotic focus in lung of the cattle that died of infection with BoHV-1 (P3); x 200

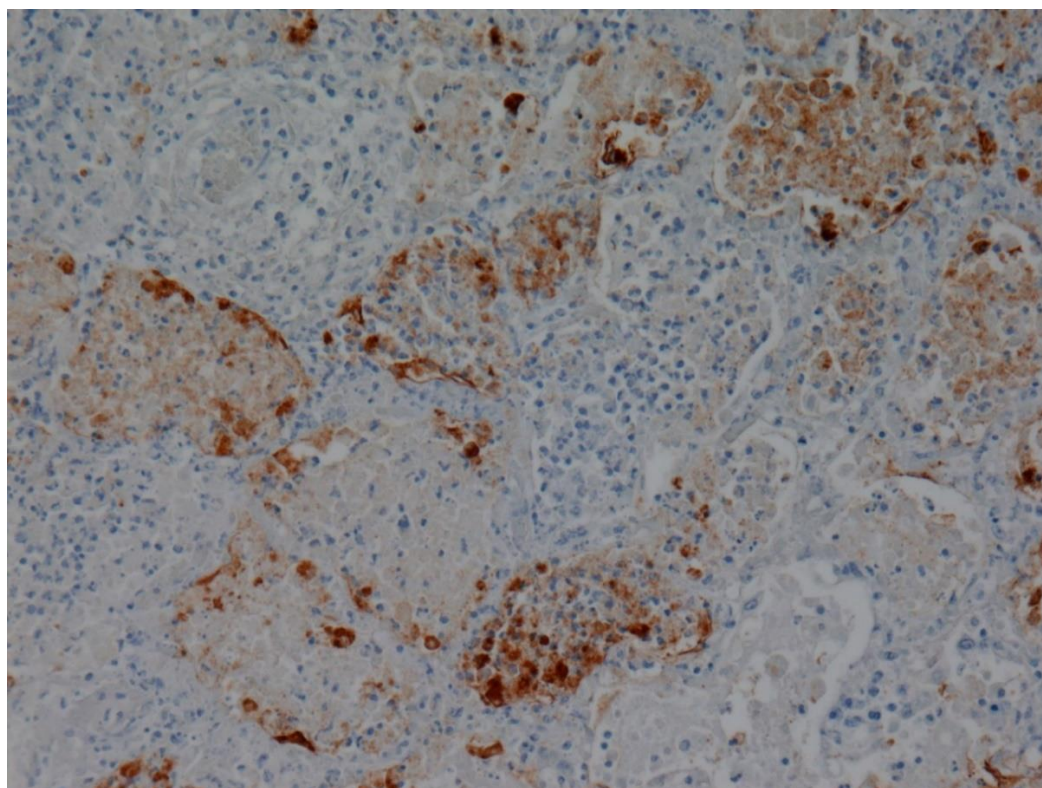


Slika 123: Izrazita pozitivna imunohistokemična reakcija na BoHV-1 (P3); x 400
Figure 123: Obvious positive immunohistochemical reaction to BoHV-1 (P3); x 400



Slika 124: Pozitivna imunohistokemična reakcija na BoHV-1; (P1); 100x.

Figure 124: Positive immunohistochemical reaction to BoHV-1; (P1); 100x.



Slika 125: Pozitivna imunohistokemična reakcija na BoHV-1 (P3); x 200

Figure 125: Positive immunohistochemical reaction to BoHV-1 (P3); x 200