

**KRVNA SLIKA I BROJ SOMATSKIH ĆELIJA U MLEKU  
KRAVA INFICIRANIH SA *COXIELLA BURNETII* \*  
*BLOOD COUNT AND NUMBER OF SOMATIC CELLS IN MILK  
OF COWS INFECTED WITH COXIELLA BURNETII***

**M. Radinović, S. Boboš, Marija Pajić, Branka Vidić, Z. Rašić,  
Ivana Davidov, R. Špegar\*\***

*Cilj rada je bio da se ispita intenzitet lokalnog imunskog odgovora mlečne žlezde i promena u diferencijalnoj krvnoj slici kod hronično inficiranih krava. Ogled je sproveden na grupi krava kod kojih je serološki dokazana Q groznica. Za serološku dijagnostiku bolesti korišćen je ELISA test (IDEXX). Na osnovu rezultata ELISA testa formirana je ogledna grupa od deset inficiranih krava. Od krava u ogledu uzimani su uzorci krvi i zbirni uzorci mleka. Određivanje broja eritrocita vršeno je spektrofotometrijski, a broja leukocita metodom po Bürker – Türk-u. Analizom uzoraka krvi ustanovljen je povećan broj eritocita, dok je broj leukocita bio u granicama fizioloških vrednosti.*

*Uzorci mleka korišćeni su za određivanje broja somatskih ćelija metodom protočne citometrije. Obradom uzoraka mleka određen je prosečan broj somatskih ćelija od 853.000 /mL mleka.*

*Ključne reči: Coxiella burnetii, krava, krvna slika, somatske ćelije*

#### **Uvod / Introduction**

Q groznica je zoonoza koju izaziva obligatni intracelularni mikroorganizam, *Coxiella burnetii*. Bolest se prvi put pojavila kod radnika na klanici u Australiji da bi danas bila prisutna u celom svetu izuzev Novog Zelanda (Kazar, 2005).

\* Rad primljen za štampu 07. 07. 2011. godine

\*\* Mr sci med. vet. Miodrag Radinović, asistent, dr sci med. vet. Stanko Boboš, redovni profesor, Marija Pajić, dr vet., asistent, Katedra za veterinarsku medicinu, Poljoprivredni fakultet Univerziteta u Novom Sadu; dr sci med. vet. Branka Vidić, naučni savetnik, Naučni institut za veterinarstvo „Novi Sad“; dr sci med. vet. Zoran Rašić, docent, mr sci med. vet. Ivana Davidov, asistent, Katedra za veterinarsku medicinu, Poljoprivredni fakultet Univerziteta u Novom Sadu; Rade Špegar, Matematička gimnazija Beograd

Kao najvažniji izvor infekcije ljudi su označene domaće životinje i to psi i mačke koji su odgovorni za pojavu bolesti pre svega u urbanim sredinama i preživari koji su i najznačajniji izvor infekcije za ljude (Arricau-Bouvery i Rodolakis, 2005; Vidić i sar., 2008).

Za nastajanje infekcije kod domaćih životinja značajan je primarni ciklus u prirodi te oboljevaju pre svih ovce, goveda i koze. Bolest kod njih često protiče asimptomatski a jedini simptom koji može da ukaže na ovu infekciju je pojava abortusa. Mada postoje izveštaji o pojavi respiratornih oboljenja uzrokovanih sa *C. burnetii* jedini simptom kod eksperimentalno inficiranih životinja i to pre svega ovaca i koza, a ređe kod goveda, jeste abortus. Kod životinja koje su imale pobačaj dolazi do retencije sekundina i smanjene plodnosti (Guatteo i sar., 2007).

Hronični tok bolesti se može dovesti u vezu sa izlučivanjem uzročnika putem mleka (Guatteo i sar., 2006), ali i sa postojanjem poremećaja sekrecije mleka. Na ovakvo stanje ukazuje dugoročno povećanje broja somatskih ćelija u mleku inficiranih krava (Barlow i sar., 2008).

Na vezu između prisustva infekcije sa *Coxiella burnetii* i povećanja broja somatskih ćelija u mleku ukazali su Sharma i sar. (2011). Oni ističu značaj pre svega zoonotskih agenasa na povećanje broja somatskih ćelija. Pored uzročnika Q groznice autori ukazuju i na uzročnike bruceloze, tuberkuloze i leptospiroze.

Povećanje broja somatskih ćelija u mleku inficiranih krava govori u prilog pojačanog lokalnog imunskog odgovora mlečne žlezde. U radu smo ispitali promene u lokalnom imunskom odgovoru i u sistemske cirkulaciji kod inficiranih krava.

#### **Materijal i metode rada / *Material and methods***

Na farmi muznih krava su uzeti uzorci krvi venepunkcijom vene jugularis. Nakon uzorkovanja, uzorci krvi su čuvani na sobnoj temperaturi da bi se izdvojio serum, a zatim su centrifugovani. Ukupno je pregledano 200 uzoraka krvnog seruma.

Serumi su pregledani primenom CHEKIT Q-fever ELISA test kita („IDEXX laboratories“) po uputstvu proizvođača. Od životinja koje su bile seropozitivne na Q groznicu, formirana je ogledna grupa krava sa deset životinja.

Prateći proizvodni ciklus oglednih životinja uzimani su uzorci mleka radi određivanja broja somatskih ćelija i uzorci krvi radi kontrole krvne slike. Uzorci mleka su uzimani za vreme jutarnje muže krava postavljanjem trutestera na muznu jedinicu prilikom muže inficiranih krava.

Uzorak mleka iz trutestera sa odlivao u obeležene plastične bočice sa predhodno dodatim konzervansom koga čini natrijum-azid. Nakon nalivanja uzoraka u bočice sa konzervansom oni su stavljeni u ručni frižider i tako se transportovali do laboratorije. Ispitivanje broja somatskih ćelija u uzorcima mleka obavljeno

je u Laboratoriji za kontrolu sirovog mleka na aparatu, fosomatic metodom protočne citometrije.

Za uzorkovanje krvi je korišten vakutajner (BD Vacutainer Systems, Preanalytical Solutions UK) sa dodatim antikoagulansom K3E u količini od 0,072 mL. U vakutajner se uzimala mala količina krvi, do 3 mL da bi se antikoagulans dobro rasporedio u uzorku. Nakon uzorkovanja svaki vakutajner se označavao sa ID brojem krave i ostavljao na sobnoj temperaturi. Ovako uzeti uzorci krvi sa antikoagulansom korišćeni su za pravljenje krvnih razmaza i za određivanje krvne slike i leukocitarne formule.

Brojanje eritrocita je vršeno spektrofotometrijski a leukocita metodom po Burker-Turk-u. Za određivanje leukocitarne formule rađeno je mikroskopiranje.

Nakon pravljenja krvnih razmaza rađeno je mikroskopiranje da bi se utvrdio procenat nezrelih eritrocita.

Radi jasnijeg prikazivanja rezultata definisane su faze laktacije.

Tabela 1. Faze laktacije /  
Table 1. Lactation phases

| Prva faza /<br><i>First phase</i> | Druga faza /<br><i>Second phase</i> | Treća faza /<br><i>Third phase</i>    |
|-----------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------------|
| 10-60 dana / <i>days</i>          | 60-180 dana / <i>days</i>           | preko 180 dana / <i>over 180 days</i> |

## Rezultati i diskusija / *Results and discussion*

Od ukupno 200 pregledanih uzoraka krvnih seruma krava ELISA testom nalaz specifičnih antitela za *Coxiella burnetii* utvrđen je u 10 seruma (5%).

Analizom rezultata za broj somatskih ćelija u zbirnim uzrocima mleka, ustanovili smo kod seropozitivnih krava povećan broj somatskih ćelija iznad standarda za higijensku ispravnost. U tabeli 2 su prikazani rezultati broja somatskih ćelija po fazama laktacije.

Statističkom obradom podataka primenom t-testa utvrđeno je da ne postoji statistički značajna razlika u broju somatskih ćelija između pojedinih faza laktacije.

Od ukupnog broja uzoraka u 40% broj somatskih ćelija je bio  $>10^6$ , što predstavlja veoma povećanu vrednost (Boboš i Vidić, 2005). U svega 25% uzoraka broj somatskih ćelija je bio u okviru standarda za higijensku ispravnost. U istom periodu broj somatskih ćelija u stadnom mleku svih krava na farmi nije prelazio 300.000/mL. Inficirane životinje su činile 5% zapata. Iz tabele 2 se vidi da postoji neznatan uticaj faze laktacije na kretanje broja somatskih ćelija, te je broj somatskih ćelija kod inficiranih krava povećan kroz sve faze laktacije. U prvoj fazi laktacije 30% uzoraka mleka su bili sa brojem somatskih ćelija preko milion, u drugoj 38%, a u trećoj fazi 55%. Infekcija krava sa *Coxiella burnetii* utiče na pojavu

poremećaja sekrecije (Barlov i sar., 2008). Kod hronično inficiranih krava mlečna žlezda i pripadajući limfni čvorovi su predilekciono mesto za *Coxiella burnetii* i ona može biti izolovana pre svega iz vimena i mleka (Vidić i sar., 2005). Ovo je posebno značajno zbog mogućnosti izlučivanja *C. burnetii* mlekom i uticaja na zdravlje ljudi (Rodolakis i sar., 2007). Broj somatskih ćelija u uzorcima mleka se kretao u intervalu od 103.000 do 2.000.000/mL (tabela 2). Prosečan broj somatskih ćelija u svim uzorcima je bio 853.000/mL. Na povezanost između prisustva infekcije sa *Coxiella burnetii* i povećanja broja somatskih ćelija ukazali su Guateo i sar. (2006) koji su ustanovili kod inficiranih životinja broj somatskih ćelija u mleku od 229.000 do 762.000/mL, što su nešto niže vrednosti od dobijenih rezultata naših ispitivanja.

Tabela 2. Broj somatskih ćelija u zbirnim uzorcima mleka po fazama laktacije /  
Table 2. Somatic cell count in cumulative milk samples in lactation phases

| Mleko /<br>Milk           | Prva faza /<br>First phase | Druga faza /<br>Second phase | Treća faza/<br>Third phase |
|---------------------------|----------------------------|------------------------------|----------------------------|
| SCC x 10 <sup>3</sup> /mL | 526                        | 147                          | 1024                       |
|                           | 1795                       | 778                          | 103                        |
|                           | 900                        | 2277                         | 2000                       |
|                           | 588                        | 1004                         | 1193                       |
|                           | 169                        | 419                          | 836                        |
|                           | 685                        | 1092                         | 236                        |
|                           | 743                        | 113                          | 1236                       |
|                           | 1485                       | 361                          | 1048                       |
|                           | 130                        |                              | 981                        |
|                           | 1240                       |                              |                            |
| Prosek<br>Average         | 826±171,25                 | 773±251,44                   | 961±186,27                 |

Analiza broja leukocita pokazala je da nema značajnih promena u broju leukocita. U nekim uzorcima broj ćelija je varirao od  $3,24 \times 10^9/L$  do  $11,08 \times 10^9/L$  (tabela 3). Prosečan broj leukocita u svim uzorcima je iznosio  $6,60 \times 10^9/L$ . Dobijene vrednosti za broj leukocita su u okviru referentnih vrednosti (Jain, 1993). Kod hronično inficiranih krava nije izražen sistemski imunološki odgovor kroz povećanje broja leukocita.

Analiza rezultata krvne slike za broj eritrocita pokazuje povećanje broja u tri od ukupno četiri uzorkovanja. Prosečan broj eritrocita je iznosio  $10,17 \times 10^{12}/L$ . Dobijeni prosečan broj eritrocita je nešto iznad referentne vrednosti (Jain, 1993). U pojedinim uzorcima prelazi vrednost od  $10 \times 10^{12}/L$  pa vrednost broja eritrocita iznosi i do  $15 \times 10^{12}/L$  (tabela 4). Procenat uzoraka sa povećanim brojem eritrocita izvan referentne vrednosti je bio 41,6%. Povećanje broja eritrocita se

može pripisati postojanju granuloma u koštanoj srži (Guateo i sar., 2007; Siegman-Igra i sar., 1997). Kako životinje sa povećanim brojem eritrocita nisu imale spoljnih znakova dehidracije pretpostavljamo da je povećan broj eritrocita isključivo posledica njihove povećane produkcije.

Tabela 3. Broj leukocita u krvi hronično inficiranih krava sa *Coxiella burnetii* /  
Table 3. Number of leucocytes in blood of chronically infected cows with *Coxiella burnetii*

|  | Prva faza /<br><i>First phase</i> | Druga faza /<br><i>Second phase</i> | Treća faza /<br><i>Third phase</i> |
|--|-----------------------------------|-------------------------------------|------------------------------------|
| Broj leukocita /<br><i>Number of leucocytes</i><br>$\times 10^9/L$ | 6,85                              | 8,85                                | 4,56                               |
|  | 5,41                              | 6,52                                | 6,57                               |
|  | 5,22                              | 5,37                                | 9,25                               |
|  | 6,52                              | 7,48                                | 5,42                               |
|  | 8,10                              | 5,92                                | 3,24                               |
|  | 5,43                              | 4,85                                | 8,84                               |
|  | 6,79                              | 3,38                                | 5,65                               |
|  | 6,94                              | 8,15                                | 9,15                               |
|  | 6,58                              | 4,76                                | 5,31                               |
|  | 4,38                              | 7,60                                | 5,52                               |
| Prosek / <i>Average</i>  | 6,22 $\pm$ 0,34                   | 6,28 $\pm$ 0,55                     | 6,35 $\pm$ 0,65                    |

Tabela 4. Broj eritrocita u krvi hronično inficiranih krava sa *Coxiella burnetii* /  
Table 4. Number of erythrocytes in blood of chronically infected cows with *Coxiella burnetii*

|  | Prva faza /<br><i>First phase</i> | Druga faza /<br><i>Second phase</i> | Treća faza /<br><i>Third phase</i> |
|--|-----------------------------------|-------------------------------------|------------------------------------|
| Broj eritrocita /<br><i>Number of erythrocytes</i><br>$\times 10^{12}/L$ | 8,10                              | 12,46                               | 9,13                               |
|  | 11,98                             | 7,12                                | 7,60                               |
|  | 10,90                             | 10,75                               | 11,6                               |
|  | 10,10                             | 9,94                                | 11,0                               |
|  | 9,18                              | 9,57                                | 14,60                              |
|  | 10,70                             | 9,69                                | 10,0                               |
|  | 11,10                             | 10,45                               | 9,24                               |
|  | 7,76                              | 9,36                                | 10,17                              |
|  | 10,20                             | 15,09                               | 10,99                              |
|  | Prosek / <i>Average</i>           | 10,0 $\pm$ 0,46                     | 10,05 $\pm$ 0,74                   |

Posmatranjem obojenih razmaza krvi ispitivanih životinja ustanovili smo povećan udeo nezrelih formi eritrocita-retikulocita. U tabeli 5 prikazani su rezultati brojanja eritrocita.

Tabela 5. Rezultati brojanja zrelih i nezrelih oblika eritrocita u bojenim razmazima krvi /  
Table 5. Results of counting mature and immature forms of erythrocytes in blood smears

| Bbroj eritrocita / Number of erythrocytes |     |     |     |     |    |     |     |     |     |     | Prosek /<br>Average |
|---|-----|-----|-----|-----|----|-----|-----|-----|-----|-----|---------------------|
| Zreli /<br>Mature                         | 65  | 72  | 68  | 40  | 38 | 73  | 35  | 133 | 62  | 82  | 66,8±28,41          |
| Nezreli /<br>Immature                     | 175 | 185 | 158 | 126 | 95 | 153 | 115 | 150 | 220 | 185 | 156,2±37,25         |

Prosečan udeo zrelih eritrocita u uzrocima krvi je iznosio 42,7% odnosno bilo je 57,3% nezrelih eritrocita.

#### Zaključak / Conclusion

Nalaz povećanog broja somatskih ćelija u mleku krava kod kojih izostaju klinički simptomi, a dokazana su antitela na *Coxiella burnetii* treba da ukaže na potrebu za dalja ispitivanja da bi se utvrdilo prisustvo *Coxiella burnetii* u mleku.

Promene u krvnoj slici kod inficiranih krava ne govore u prilog postojanja pojačanog imunskog odgovora. Povećan broj eritrocita je posledica prisustva nezrelih formi, tako je procenat retikulocita prelazio 50%.

Povećanje broja somatskih ćelija u mleku i nalaz nezrelih formi eritrocita u krvi kod krava seropozitivnih na *Coxiella burnetii* ukazuje na postojanje hronične infekcije.

#### Literatura / References

1. Arricau-Bouvery N, Rodolakis A. Is Q Fever an emerging or re-emerging zoonosis? Vet Res 2005; 36: (327-49).
2. Barlow J, Rauch B, Welcome F, Kim SG, Dubovi E, Schukken Y. Association between *Coxiella burnetii* shedding in milk and subclinical mastitis in dairy cattle. Vet Res 2008; 39: 23.
3. Boboš S, Vidić B. Mlečna žlezda preživara-morfologija-patologija-terapija. Novi Sad, 2005.
4. Guateo R, Beaudeau F, Beri M, Rodolakis A, Joly A, Seegers H. Shedding routes of *Coxiella burnetii* in dairy cows: implications for detection and control. Vet Res 2006; 37: 827-33.
5. Guateo R, Beaudeau F, Beri M, Rodolakis A, Joly A, Seegers H. *Coxiella burnetii* shedding by dairy cows. Vet Res 2007; 38: 849-60.
6. Jain NC. Essentials of Veterinary Hematology. Lea & Febiger, Philadelphia 1993; 1-18.
7. Kazar J. *Coxiella burnetii* infection. Ann N Y Acad Sci 2005; 1063: 10514.
8. Rodolakis A, Beri M, Hechard C, Caudron C, Souriau A, Bodier CC, Blanchard B, Camuset P, Devilechaise P, Natorp JC, Vadet JP, Arricau-Bouvery Y. N.: Compari-

- son of *Coxiella burnetii* shedding in milk of dairy bovine, caprine and ovine herds. J Dairy Sci 2007; 90: 5352-60.
9. Sharma N, Singh NK, Bhadwal MS. Relationship of Somatic Cell Count and Mastitis: An Overview. Asian-Aust J Anim Sci 2011; 24(3): 429-38.
  10. Siegman-Igra Y, Kaufman O, Keysary A, Rzotkiewicz S, Shalit I. Q fever endocarditis in Israel and a worldwide review. Scand J Infect Dis 1997; 29.
  11. Vidić B, Ašanin R, Boboš S, Bugarski D. Q-fever (*Coxiella burnetii*) investigations in dairy cows. Finalni program i knjiga sažetaka, Prvi Simpozijum o zoonozama sa međunarodnim učešćem, Sarajevo. Udruženje mikrobiologa BiH, 62, 2005.
  12. Vidić B, Boboš S, Grgić Ž, Orlić D, Bugarski D. Shedding of *Coxiella burnetii* through milk and its influence on the mammary gland. Proceedings, First Middle European Congress of buiatrics, Balatonfured, Hungary, 316-322, 1999.
  13. Vidić B, Boboš S, Savić S, Prica N. Nalaz *Coxiella burnetii* u mleku i njen značaj za nastanak infekcije kod ljudi. Savremena poljoprivreda 2008; 57(3-4): 208-15.

## ENGLISH

### BLOOD COUNT AND NUMBER OF SOMATIC CELLS IN MILK OF COWS INFECTED WITH *COXIELLA BURNETII*

**M. Radinović, S. Boboš, Marija Pajić, Branka Vidić, Z. Rašić, Ivana Davidov, R. Špegar**

The objective of the work was to examine the intensity of the local immune response of the mammary gland and the changes in the differential blood count of chronically infected cows. An experiment was performed on a group of cows with Q fever serologically proven using the ELISA test (IDEXX). Based on the ELISA test results, an experimental group of ten infected cows was formed. Blood was sampled from the experimental cows, and cumulative milk samples were taken. The number of erythrocytes was determined spectrophotometrically, and the number of leucocytes using the method according to Bürker – Türk. The blood analysis established an increased number of erythrocytes, while the number of leucocytes was within the limits of physiological values.

The milk samples were used for the determination of the number of somatic cells using flow cytometric measurements. The processing of the milk samples established an average number of somatic cells of 853.000 /mL milk.

Key words: cow, *Coxiella burnetii*, somatic cells, blood count

**КРОВЯНАЯ КАРТИНА И ЧИСЛО СОМАТИЧЕСКИХ КЛЕТОК В МОЛОКЕ КОРОВ,  
ИНФИЦИРОВАННЫХ С *COXIELLA BURNETII***

**М. Радинович, С. Бобош, Мария Паич, Бранка Видич, З. Рашич,  
Ивана Давидов, Р. Шпегар**

Цель работы была испытать интенсивность локального иммунного ответа молочной железы и изменение в дифференциальной кровяной картине у хронически инфицированных коров. Опыт проведён на группе коров у которых серологически доказана Q лихорада. Для доказывания Q лихорадки пользован *ELISA* тест (IDEXX). На основе результата *ELISA* теста формирована опытная группа из десяти инфицированных коров. Из коров в опыте браны образчики крови и собирательные образчики молока. Определение числа эритроцитов совершенно спектрофотометрически, а числа лейкоцитов методом по Bürker – Türk-u. Анализом образчиков крови установлено увеличенное число эритроцитов, пока число лейкоцитов было в границах физиологических стоимостей.

Образчики молока пользованы для определения числа методом протекающей цитометрии. Обработкой образчиков молока определено в среднем число соматических клеток от 853.000/мл молока.

Ключевые слова: корова, *Coxiella burnetii*, соматические клетки, кровяная картина