

Univerzitet u Beogradu  
Fakultet veterinarske medicine

Nataša O. Stević

Ispitivanje pouzdanosti seroloških,  
bakterioloških i molekularnih metoda u  
dijagnostici bruceloze pasa izazvane vrstom  
*Brucella canis*

Doktorska disertacija

Beograd, 2018

University of Belgrade  
Faculty of veterinary medicine

Nataša O. Stević

Examination of the reliability of serological,  
bacteriological and molecular methods in the  
diagnosis of canine brucellosis caused by  
*Brucella canis*

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2018

MENTOR:

dr Sonja Radojičić, redovni profesor

Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu

ČLANOVI KOMISIJE:

dr Miroslav Valčić, redovni profesor

Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu

dr Dušan Mišić, vanredni profesor

Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu

dr Kazimir Matović, naučni saradnik

Veterinarski specijalistički institut „Kraljevo“ u Kraljevu

dr Lazar Ranin, redovni profesor

Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

Datum odbrane: \_\_\_\_\_

*Doktorska disertacija pod nazivom: „Ispitivanje pouzdanosti seroloških, bakterioloških i molekularnih metoda u dijagnostici bruceloze pasa izazvane vrstom Brucella canis” realizovana je u okviru projekta „Razvoj i standardizacija molekularnih i imunskih metoda u dijagnostici bakterijskih zoonoza“ (ev. br. TR 31088), čiji je rukovodilac prof. dr Sonja Radojičić, a koji je finansiran od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.*

*Najveću zahvalnost dugujem svojoj mentorki prof. dr Sonji Radojičić koja je svojim kritičkim pristupom i požrtvovanošću, kao i uložnim trudom i izdvojenim vremenom doprinela da se ova disertacija uspešno završi. Hvala na strpljenju i dragocenim savetima.*

*Zahvaljujem se prof. dr Dušanu Mišiću koji mi je nesebično preneo svoja znanja i iskustvo iz oblasti molekularnih istraživanja.*

*Veliko hvala dr Kazimiru Matoviću iz Veterinarskog specijalističkog instituta „Kraljevo“ na pažljivom čitanju ove disertacije i konstruktivnim i dobronamernim sugestijama.*

*Veliku zahvalnost dugujem prof. dr Miroslavu Valčiću i prof. dr Lazaru Raninu što su mi pružili priliku da saradujem sa njima i što su uvek bili otvoreni za svaku vrstu pomoći.*

*Profesorki dr Sunčici Borozan dugujem veliku zahvalnost za uloženi trud i pomoć oko hemijskog dela ispitivanja i elektroforetske analize antigena.*

*Zahvaljujem se kolegama sa Katedre za hirurgiju, ortopediju i oftalmologiju i docentu dr Vladimiru Magašu sa Katedre za porodiljstvo, sterilitet i veštačko osemenjavanje na nesebičnoj pomoći pri sakupljanju uzoraka.*

*Posebno želim da se zahvalim mojoj koleginici, a prvenstveno prijatelju, dipl. vet. Danici Bogunović koja je uložila mnogo truda i vremena i pomagala mi i tokom eksperimentalnog dela istraživanja i tokom pisanja doktorske disertacije.*

*Hvala mojim roditeljima i bratu na moralnoj i finansijskoj podršci i na svemu što čine za mene.*

ISPITIVANJE POUZDANOSTI SEROLOŠKIH, BAKTERIOLOŠKIH I  
MOLEKULARNIH METODA U DIJAGNOSTICI BRUCELOZE PASA IZAZVANE  
VRSTOM *BRUCELLA CANIS*

Rezime

Bruceloza pasa je bolest poznata preko četiri decenije, ali i pored toga ne postoje standardizovani dijagnostički protokoli, kao ni generalni dogovor o najprikladnijem dijagnostičkom testu. Svaka laboratorija definiše sopstvene kriterijume. Ovakva raznovrsnost testova i nedostatak jasno definisanih protokola dovodi do teškoća u interpretaciji rezultata seroloških testova u različitim laboratorijama. Iz tog razloga, cilj ove doktorske disertacije obuhvatio je unapređenje dijagnostike primenom preporučenih i novih, sopstveno pripremljenih testova. Jedan od zadataka ove disertacije je bilo i ispitivanje upotrebljivosti Bruce-ladder multiplex PCR metode za ispitivanje kliničkih uzoraka odnosno tkiva uterusa i testisa pasa.

Sakupljen je materijal (krv, testisi i materice) od 225 nevlasničkih pasa i to 145 ženki i 80 mužjaka. Dobijeni rezultati su pokazali da je od ukupno 225 ispitanih uzoraka, 33 ili 14,67% krvnih seruma imalo merljiv titar antitela u 2-ME TAT. Najniži ispitivani titar od 1/50 imalo je 13 krvnih seruma ili 5,78%, kod 8 krvnih seruma ustanovljen je titar od 1/100 ili 3,55%, dok je titar od 1/200 imalo 12 uzoraka seruma ili 5,33%. Primenom klasičnih bakterioloških metoda, *B. canis* je izolovana iz tri uzorka homogenizata tkiva reproduktivnih organa (1,33%) i to iz 2 uzorka poreklom od mužjaka i jednog uzorka poreklom od ženke. Jedan izolat je poticao od serološki negativnog psa. Od 225 uzoraka ispitanih Bruce-ladder multiplex PCR metodom, pozitivna reakcija je ustanovljena kod dva (0,88%). Pre formulacije indirektnog ELISA testa, određivane su koncentracije proteina. Elektroforetska analiza antigena dobijenih toplotom i ultrazvukom kao i denzitometrijska kvantifikacija su pokazale da je u antigenu dobijenom toplotom, najzastupljenija frakcija molekulske mase 10,95 kDa sa učešćem od čak 43,12% koja odgovara R-LPS-u brucela. Ista frakcija je u antigenu dobijenom ultrazvukom bila zastupljena sa 11,56%, odnosno u količini koja je bila 3,7x

manja. Proteinski sastav antigena dobijenog primenom ultrazvuka bio je značajno bogatiji, a po kvantitativnom sastavu su dominirali proteini molekulskih masa od 30,5, 24,5, 38 i 22 kDa koji pripadaju proteinima spoljašnje membrane. Šah titracijom je ustanovljena optimalna koncentracija antigena za oba ELISA testa od 1 µg/ml, optimalno razređenje pozitivnog seruma 1/200, a optimalno razređenje konjugovanog antitela iznosilo je 1/25000. U ELISA testu koji je formulisan sa antigenom dobijenim toplotom, od 225 ispitanih seruma, 44 odnosno 19,55% je bilo pozitivno, dok je u ELISA testu sa antigenom dobijenim ultrazvukom 37 (16,44%) bilo pozitivno.

Za određivanje saglasnosti između testova korišćena je *Kappa* statistička analiza za interval pouzdanosti od 95%. Osetljivost bakteriološke izolacije u odnosu na referentni test iznosila je 16,7%, a specifičnost 99,5%. Izračunata *Kappa* vrednost iznosila je 0,251, što je u rangu srednje saglasnosti. Primenom McNemar testa ustanovljena je statistički značajna razlika između ova dva testa ( $p < 0,05$ ), odnosno broj pozitivnih uzoraka je bio statistički značajno viši u 2-ME TAT. Osetljivost Bruce-ladder PCR iznosila je 8,3%, a specifičnost 99,5%. Izračunata *Kappa* vrednost iznosila je 0,130 što je u rangu beznačajne saglasnosti. Primenom McNemar testa ustanovljena je statistički značajna razlika između ova dva testa ( $p < 0,05$ ), odnosno broj pozitivnih uzoraka je bio statistički značajno viši u 2-ME TAT u odnosu na Bruce-ladder PCR. Osetljivost indirektnog ELISA testa sa antigenom dobijenim toplotom iznosila je 66,7%, a specifičnost 83,1%. Izračunata *Kappa* vrednost iznosila je 0,220 i bila je u rangu srednje saglasnosti. Primenom McNemar testa ustanovljena je statistički značajna razlika između ova dva testa ( $p < 0,05$ ), odnosno broj pozitivnih uzoraka je bio statistički značajno viši u indirektnom ELISA testu u odnosu na 2-ME TAT. Osetljivost indirektnog ELISA testa sa antigenom dobijenim ultrazvukom iznosila je 66,7%, a specifičnost 86,4%. Izračunata *Kappa* vrednost iznosila je 0,268 i bila je u rangu srednje saglasnosti. Primenom McNemar testa ustanovljena je statistički značajna razlika između ova dva testa ( $p < 0,05$ ), odnosno broj pozitivnih uzoraka je bio statistički značajno viši u indirektnom ELISA testu u odnosu na 2-ME TAT. Analizom dijagrama ROC krive uočava se da je ELISA test sa antigenom dobijenim ultrazvukom bolji diskriminatorni test zato što se kriva nalazi bliže levoj i gornjoj liniji dijagrama u odnosu na ELISA test formulisan sa antigenom dobijenim toplotom. Vrednost površine ispod krive za ELISA test u kome je korišćen antigen dobijen ultrazvukom je veća od

vrednosti površine ispod krive za ELISA test u kome je korišćen antigen dobijen toplotom. Vrednost površine ispod krive (AUC) iznosi 0,820 što ELISA test sa antigenom dobijenim ultrazvukom svrstava u dobre dijagnostičke testove.

U cilju postavljanja tačne dijagnoze, za serološko ispitivanje, pored 2-ME TAT, preporučuje se i upotreba indirektnog ELISA testa formulisanog sa antigenom dobijenim ultrazvukom zbog boljih karakteristika. Kod postojanja sumnjivih rezultata seroloških testova, obavezno je testiranje parnih seruma i bakteriološko ispitivanje dostupnih kliničkih uzoraka, zbog dokazanog postojanja lažno negativnih rezultata.

Ključne reči: Bruce-ladder multiplex PCR, *Brucella canis*, ELISA, izolacija, 2-ME TAT

Naučna oblast: Veterinarska medicina

Uža naučna oblast: Epizootiologija, zarazne bolesti životinja i bolesti pčela i sviloprelja

UDK broj: 619:616.981.42:636.7

EXAMINATION OF THE RELIABILITY OF SEROLOGICAL,  
BACTERIOLOGICAL AND MOLECULAR METHODS IN THE DIAGNOSIS OF  
CANINE BRUCELLOSIS CAUSED BY *BRUCELLA CANIS*

Summary

The scientific community has known about canine brucellosis for over four decades, even so, there are no standardized diagnostic protocols, nor a general agreement on the most appropriate diagnostic test. Each laboratory defines its own criteria. This variety of tests and the lack of clearly defined protocols lead to difficulties in interpreting the results of serological tests in different laboratories. For this reason, the goal of this doctoral dissertation has been to improve diagnostics using recommended and new, self-prepared tests. One of the tasks of this dissertation was to examine the usability of the Bruce-ladder multiplex PCR method for testing clinical samples, i.e. dog uterine and testicular tissues.

The material (blood, testicles and uteruses) was collected from 225 dogs without owners, 145 female and 80 male dogs. The results obtained showed that from a total of 225 tested samples, 33 or 14,67% of blood sera had measurable antibody titer in 2-ME TAT. 13 or 5,78% blood sera had the lowest tested titer of 1/50, in 8 or 3,55% blood sera a titer of 1/100 was determined, while 12 serum samples or 5,33% had the titer of 1/200. By applying classic bacteriological methods, *B. canis* was isolated from three samples of homogenized reproductive organ tissue (1,33%), 2 from samples originating from males and one specimen originating from a female. One isolate originated from a serologically negative dog. Of the 225 samples assayed using the Bruce-ladder multiplex PCR method, a positive reaction was established in two (0,88%). Protein concentrations were determined prior to the formulation of the indirect ELISA test. The electrophoretic analysis of antigens retrieved using heat and ultrasound, as well as the densitometric quantification, showed that the antigen retrieved using heat had the most prevalent molecular weight fraction of 10,95 kDa with a participation of as much as 43,12% that corresponds to *Brucella* R LPS. The same fraction was represented in the antigen retrieved using ultrasound with 11,56%, or in a quantity that was 3,7 times lower. The protein composition of the antigen retrieved using ultrasound was



considerably richer, and proteins with the molecular weight of 30,5, 24,5, 38 and 22 kDa belonging to the external membrane proteins dominated in quantitative composition. By using chessboard titration optimal antigen concentration was established for both ELISA tests – 1 µg / ml, optimal dilution of positive serum - 1/200, and optimal dilution of the conjugated antibody was 1/25000. In the ELISA test that was formulated with antigen retrieved using heat, out of 225 sera tested, 44 or 19,55% were positive, while in the ELISA test using antigen retrieved using ultrasound 37 (16,44%) sera were positive.

To determine the agreement between the tests, *Kappa* statistical analysis was used with reliability interval of 95%. The sensitivity of bacteriological isolation compared to the reference test was 16,7% and the specificity was 99,5%. The calculated *Kappa* value was 0,251, which is rated as fair agreement. Using the McNemar test, a statistically significant difference was found between these two tests ( $p < 0,05$ ), i.e. the number of positive samples was statistically significantly higher in the 2-ME TAT. The sensitivity of the Bruce-ladder PCR was 8,3% and the specificity was 99,5%. The calculated *Kappa* value was 0,130, which is rated as slight agreement. Using the McNemar test, a statistically significant difference was found between these two tests ( $p < 0,05$ ), i.e. the number of positive samples was statistically significantly higher in 2-ME TAT compared to the Bruce-ladder PCR. The sensitivity of the indirect ELISA test with antigen retrieved using heat was 66,7%, and the specificity was 83,1%. The calculated *Kappa* value was 0,220 and it is rated as fair agreement. Using the McNemar test, a statistically significant difference was found between these two tests ( $p < 0,05$ ), i.e. the number of positive samples was statistically significantly higher in the indirect ELISA test compared to the 2-ME TAT. The sensitivity of the indirect ELISA test with antigen retrieved using ultrasound was 66,7%, and the specificity was 86,4%. The calculated *Kappa* value was 0,268 and was rated as fair agreement. Using the McNemar test, a statistically significant difference was found between these two tests ( $p < 0,05$ ), i.e. the number of positive samples was statistically significantly higher in the indirect ELISA test compared to the 2-ME TAT. An analysis of the ROC curve diagram shows that the ELISA test with an antigen retrieved using the ultrasound is a better discriminatory test because the curve is closer to the left and upper diagram lines compared to the ELISA test formulated with antigen retrieved using heat. The surface area below the curve for

the ELISA test in which an antigen retrieved using ultrasound is greater than the surface area below the curve for the ELISA test in which the antigen retrieved using heat was used. The value of the area under the curve (AUC) is 0,820, which classifies the ELISA test with antigen retrieved using ultrasound as a good diagnostic test.

In order to determine the exact diagnosis, for serological testing, in addition to 2-ME TAT, the use of indirect ELISA test formulated with antigen retrieved using ultrasound is recommended due to better characteristics. When there are suspicious results of serological tests, it is mandatory to test the paired serum and complete bacteriological examination of the available clinical samples, due to the proven existence of false negative results.

Key words: Bruce-ladder multiplex PCR, *Brucella canis*, ELISA, isolation, 2-ME TAT

Major Field of Study: Veterinary Medicine

Special Field of Study: Epizootiology, infectious diseases of animals and diseases of bees and silkworms

UDC Number: 619:616.981.42:636.7

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
2. PREGLED LITERATURE .....	5
2.1. Rod <i>Brucella</i> .....	5
2.2. Istorijat bruceloze pasa.....	6
2.3. Opšte karakteristike bruceloze pasa .....	6
2.4. Izlučivanje <i>B. canis</i> iz inficiranog organizma i putevi prenošenja.....	7
2.5. Imunološki odgovor na infekciju vrstom <i>B.canis</i> .....	9
2.6. Patogeneza i klinička slika bruceloze pasa.....	9
2.7. Patomorfološke promene.....	12
2.8. Patohistološki nalaz.....	12
2.9. Lečenje bruceloze pasa.....	13
2.10. Rasprostranjenost bruceloze pasa.....	14
2.10.1. Rasprostranjenost bruceloze pasa u svetu .....	14
2.10.2. Rasprostranjenost bruceloze pasa u Republici Srbiji .....	15
2.11. Laboratorijska dijagnostika bruceloze pasa .....	15
2.11.1. Serološke metode .....	16
2.11.2. Klasične metode bakteriologije – izolacija i identifikacija <i>B. canis</i> .....	18
2.11.3. Molekularne metode u detekciji <i>B.canis</i> .....	19
3. CILJ I ZADACI ISPITIVANJA .....	21
4. MATERIJAL I METODE RADA .....	23
4.1. Uzorci.....	23
4.2. Pozitivna i negativna kontrola.....	24
4.3. Priprema antigena.....	24
4.5. Izolacija i identifikacija <i>B.canis</i> .....	26
4.6. Ekstrakcija DNK <i>B. canis</i> iz reproduktivnih organa pasa i izolovanih <i>B. canis</i> .....	27
4.7. Bruce-ladder multiplex PCR .....	29
4.8. Priprema antigena za izvođenje ELISA testa .....	32
4.8.1. Određivanje koncentracije proteina.....	32
4.8.2. Elektroforetska analiza antigena .....	33
4.8.3. Priprema uzoraka za elektroforezu .....	33
4.9. ELISA .....	34
4.10. Statistička obrada rezultata.....	35

5. REZULTATI.....	36
5.1. Rezultati dobijeni metodom spore serumske aglutinacije sa 2-merkaptetanolom .....	36
5.2. Rezultati dobijeni primenom klasičnih bakterioloških metoda .....	37
5.3. Rezultati dobijeni primenom Bruce-ladder multiplex PCR metode.....	40
5.5. Rezultati dobijeni primenom ELISA testa .....	46
5.5.1. Rezultati primene “šah titracije” u cilju optimizovanja ELISA testa: određivanja optimalne koncentracije antigena, optimalnih razblaženja ispitujućih seruma i optimalne koncentracije sekundarnog antitela konjugovanog peroksidazom .....	46
5.5.2. Rezultati ELISA testa sa antigenom dobijenim toplotnom ekstrakcijom.....	50
5.5.3. Rezultati ELISA testa sa antigenom dobijenim ultrazvučnom dezintegracijom <i>B. canis</i> .....	51
5.6. Usporedni prikaz rezultata dobijenih svim primenjenim metodama .....	51
5.7. Rezultati statističke obrade podataka - <i>Kappa</i> statistička analiza, McNemar test i ROC analiza .....	53
6. DISKUSIJA.....	63
7. ZAKLJUČCI.....	76
8. LITERATURA.....	78

## 1. UVOD

Bruceloza pasa je oboljenje mesojeda, sporadično i ljudi, izazvano Gram negativnom bakterijom *Brucella canis* (*B. canis*). Uzročnik je sitna bakterija kokoidnog oblika koja formira R (*rough*) tip kolonija. Primarno patogena u R fazi rasta je i *Brucella ovis* (*B. ovis*), koja je antigenski slična *B. canis*; obe vrste imaju antigeno izmenjen lipopolisaharidni omotač R-LPS za razliku od ostalih pripadnika roda *Brucella* koji su punovirulentni u S (*smooth*) fazi rasta kolonija. Još jedna jedinstvena karakteristika vrste *B. canis* je izrazita mukoidnost kolonija. Bakterija je prvi put opisana 1966. godine u jednoj odgajivačnici pasa u Sjedinjenim Američkim Državama (SAD).

Bruceloza pasa je registrovana u velikom broju zemalja širom sveta. Opisani su slučajevi bruceloze pasa u SAD, u zemljama Centralne i Južne Amerike, zatim u Kini, Japanu, Kanadi, Španiji, Švedskoj, Italiji, Mađarskoj, Austriji. Bruceloza pasa je prisutna i u Srbiji. Za sada, zemlje koje se deklarišu kao slobodne od infekcije izazvane bakterijom *B. canis* su Australija i Novi Zeland.

Uzročnik bruceloze pasa, kao i ostali članovi roda, ima tropizam za monocitno-makrofagni sistem i posebno za reproduktivne organe primarnih domaćina, pasa. U slučaju infekcije gravidnih životinja *B. canis* odlazi u uterus i placentu koje predstavljaju tropno tkivo za ove bakterije. Iz tog razloga, inficirane životinje su serološki negativne sve do pred pobačaj jer izostaje stvaranje antitela, s obzirom na to da se uzročnik ne zadržava u krvotoku. Do pobačaja dolazi najčešće pred kraj graviditeta između 45. i 55. dana. Kod mužjaka glavne kliničke manifestacije su epididimitis i orhitis. Kod pasa oba pola može biti prisutan limfadenitis, kao i promene na koštano zglobovnom sistemu, očima i centralnom nervnom sistemu. Veoma je važno

istaći da mnogi inficirani psi ne pokazuju vidljive simptome bolesti, pa čak ni značajnije povišenje telesne temperature.

Inficirane ženke izlučuju gotovo čistu kulturu brucela u spoljašnju sredinu vaginalnim iscetkom tokom estrusa, nakon pobačaja i porođaja, a mušjaci izlučuju bakterije spermom i urinom. Uzimajući u obzir karakteristike socijalnog ponašanja pasa, izlučivanje bakterija urinom predstavlja mnogo važniji epizootiološki faktor za širenje i održavanje bolesti na nekom području. Lečenjem i sterilizacijom obolelih životinja sprečava se izlučivanje uzročnika, posledična kontaminacija spoljašnje sredine i prenošenje infekcije na zdrave pse. Terapija obolelih pasa može da se sprovodi tetraciklinima i tuberkulostaticima, ali efikasnost navedenih antibiotika, u velikoj meri zavisi od primenjene doze kao i dužine trajanja lečenja. Sa ekonomskog aspekta posledice izbijanja bruceloze pasa u odgajivačnicama su velike. Iz ugla veterinarske i humane medicine, mnogo su važniji nedijagnostikovani slučajevi koji dovode do širenja i održavanja bolesti kod pasa i predstavljaju dodatni rizik za zdravlje ljudi. Naime, iako klasična antropozoonoza, vrsta *B. canis* nema takav značaj za humanu medicinu kao što ga imaju klasične S vrste brucela. Kod ljudi, ova vrsta se dijagnostikuje tek sporadično, a broj zvanično prijavljenih slučajeva je mali. Ipak, s obzirom na to da su najugroženije kategorije za infekciju bakterijom *B. canis* deca i imunosuprimirane osobe, ne može se zanemariti njen značaj i potencijalno učešće u febrilnim stanjima nepoznate etiologije. Za razliku od kategorija pasa koje su pod kontrolom vlasnika i veterinara, suštinski veći problem predstavljaju psi lutalice, o čemu govore brojna istraživanja sprovedena u zemljama Latinske Amerike i Indije u kojima je broj pasa lutalica stalno narastajuća i teško rešiva prepreka. Generalno se može reći da ovaj problem imaju sve nerazvijene zemlje u kojima, sa druge strane, živi većina svetskog stanovništva. Posmatrano iz tog ugla, ova vrsta brucela ima nesumnjivo mnogo veći značaj s obzirom na to da se zbog loših uslova života, nedostatka zdravstvene zaštite i prirodnog preboljenja, većina obolelih ljudi i ne registruje. Mere koje se preduzimaju za kontrolu i eventualno eradikaciju ove bolesti kod pasa variraju od zemlje do zemlje. U mnogim razvijenim državama, u slučaju pojave bruceloze pasa obavezna je eutanazija obolelih jedinki pre svega zbog velikih troškova i neizvesnog ishoda samog lečenja. U Republici Srbiji, prema članu 9. Pravilnika o načinu sprovođenja mera za suzbijanje i iskorenjivanje bruceloze goveda, ovaca, koza, svinja i pasa („Sl. glasnik RS“, br. 36 od 22. aprila

2005), „ukoliko se kod pasa primenom brzih metoda i sporog aglutinacionog testa sa 2-merkaptetanolom ili izolacijom uzročnika utvrdi bruceloza (*Brucella canis*), obavezna je kastracija odnosno ovariohisterektomija i lečenje obolelih životinja“.

Pored izabranog načina kontrole i suzbijanja bolesti, veliki problem predstavljaju i dostupne metode dijagnostike. Kao jedini pouzdan metod, izdvaja se bakteriološka izolacija vrste *B. canis*, koja se ne sprovodi u rutinskoj dijagnostici. Pored male osetljivosti metode izolacije na koju utiče kvalitet i vrsta uzorka, opremljenost laboratorija, ali i iskustvo i obučenosť osoblja, jedan od eliminacionih kriterijuma je i veliki rizik koji postoji tokom rada sa čistim kulturama brucela. Iz tog razloga, za dijagnostiku se najčešće koriste serološke metode. Važno je znati i da je zbog antigene specifičnosti *B. canis*, neophodno koristiti homotipski antigen jer klasičnim testovima za detekciju antitela protiv ostalih S vrsta brucela nije moguće ustanoviti serološki pozitivne životinje na *B. canis*. Uz to, *B. canis* ima slične ili identične antigene determinante kao i brojne druge Gram negativne bakterije. Ovaj fenomen vezan za antigensku strukturu *B. canis* dovodi do pojave unakrsne reaktivnosti i dobijanja lažno pozitivnih rezultata. Mali „komercijalni“ značaj ove bolesti uslovljava da na tržištu dijagnostičkih testova nema onih koji su u dovoljnoj meri validovani i pouzdani. Uz to, priprema antigena za dijagnostičke testove povezana je sa problemima zato što je *B. canis* ekstremno mukoidna posle nekoliko dana inkubiranja, pokazuje svojstvo autoaglutinacije u fiziološkom rastvoru, po svojoj prirodi je hidrofobna i čvrsto adherira za agar ili stvara mukoidni talog u tečnim podlogama čiji je pH niži od 7,0.

Kod procene statusa inficiranosti, treba znati da su svi serološki testovi nepouzđani tokom prve četiri nedelje. Nakon toga u serumu se održava visok titar antitela koji po prestanku bakterijemije opada u periodu od četiri do šest meseci, a zatim životinja postaje seronegativna. Lečene životinje mogu duže vreme da imaju niske aglutinacione titre.

Napredak nauke i razvoj molekularnih metoda, promenili su dijagnostiku većine zaraznih bolesti. Lančana reakcije polimeraze (PCR - *polymerase chain reaction*) je napravila revoluciju u dijagnostici brojnih patogena, skraćujući vreme i povećavajući šansu za otkrivanje životinja u ranim fazama infekcije. Iz tog razloga, u okviru ove

doktorske disertacije ispitana je i mogućnost primene Bruce-ladder multiplex PCR metode u ispitivanju kliničkog materijala.

Kako pogrešno postavljena dijagnoza, bilo lažno negativni ili lažno pozitivni rezultat, ima velike posledice za pse pa i ljude, unapređenje dijagnostike ove bolesti je bio glavni imperativ sprovedenog ispitivanja.



## 2. PREGLED LITERATURE

### 2.1. Rod *Brucella*

Na osnovu poređenja sekvenci 16S rRNA rod *Brucella* je svrstan u familiju Brucellaceae, red *Rhizobiales* i klasu *Alphaproteobacteria* (Moreno, 1990). Prema patogenosti, primarnim domaćinima i fenotipskim karakteristikama rod je dugo obuhvatao šest vrsta (Corbel, 1984) :

1. *B. melitensis* u okviru koje se nalaze tri biotipa, a primarni domaćini su ovce i koze;
2. *B. abortus* sa sedam biotipova, čiji su domaćini goveda i druge bovide;
3. *B. suis* sa pet biotipova, od kojih su za biotipove 1, 2 i 3 primarni domaćini svinje, a za biotip 2 i zečevi; biotip 4 koji se javlja kod irvasa i biotip 5 prisutan kod malih glodara;
4. *B. canis* čiji su primarni domaćini psi;
5. *B. ovis* čiji su primarni domaćini ovce;
6. *B. neotomae* čiji je primarni domaćin vrsta glodara *Neotoma lepida*

U poslednjih deset godina otkriveno je šest novih vrsta roda *Brucella*. Dve vrste poreklom iz morskih sisara su *B. pinnipedialis* iz foka i *B. ceti* iz delfina i kitova (Foster, 2007). Scholz i sar. 2008. godine su opisali vrstu izolovanu iz poljske voluharice (*Microtus arvalis*) koja je označena kao *B. microti*, a koja je potom izolovana i iz kontaminiranog zemljišta (Scholz, 2008b) i iz crvene lisice (*Vulpes vulpes*) (Scholz, 2009). Kod jedne pacijentkinje je iz inficiranog grudnog implanta

izolovana vrsta koja je označena kao *B. innopinata* (Scholz, 2010). Whatmore i sar. (2014) su opisali vrstu *B. papionis* poreklom iz dva babuna sa reproduktivnim poremećajima. Poslednja vrsta izolovana je iz limfnog čvora crvene lisice (*Vulpes vulpes*) i označena je kao *B. vulpis* (Scholz i sar., 2016).

Vrste u okviru roda se međusobno razlikuju prema potrebama za ugljen-dioksidom (CO<sub>2</sub>), proizvodnji vodonik-sulfida (H<sub>2</sub>S), aktivnosti ureaze, osetljivosti na tionin i bazni fuksin, osetljivosti na određene bakteriofage, aglutinaciji sa A i M specifičnim antiserumima i oksidativnim metaboličkim profilom (Alton, 1988).

## 2.2. Istorijat bruceloze pasa

Prvi podaci o pojavi bruceloze pasa datiraju iz 1963. godine, kada je u SAD opisana epizootija abortusa u odgajivačnicama pasa. Etiološki, bolest je rasvetljena izolacijom uzročnika 1966. godine. Profesor Leland Carmichael sa Cornell Univerziteta u SAD je prvi izvršio izolaciju *B. canis* iz tkiva pasa i vaginalnog iscetka (Carmichael, 1966). Sve do sredine sedamdesetih godina prošlog veka, zarazni pobačaj pasa je povezivan sa rasom bigl (*beagle*) kod koje je bolest prvi put i ustanovljena (Yamauchi i sar., 1974; Pollock, 1979). Razlog tome je bila učestalost korišćenja pasa ove rase za naučna istraživanja, a kasnije je dokazano da rasna predispozicija ne postoji. Rezervoari *B. canis* su domaći i divlji pripadnici porodice *Canidae*. U prirodnom okruženju, psi litalice ostaju značajni rezervoari *B. canis* (Flores-Castro i sar., 1976, 1977; Carmichael, 1979).

## 2.3. Opšte karakteristike bruceloze pasa

Bruceloza pasa je zarazna bolest mesojeda koju izaziva bakterija *B. canis*, Gram negativan fakultativno intracelularni kokobacilus, virulentna u R formi rasta kolonija što je razlikuje od većine drugih vrsta roda *Brucella* (Carmichael i Bruner, 1968; Carmichael i Green, 1990; Berthelot i Garin-Bastuji, 1993). *B. canis* dobro raste na

obogaćenim hranljivim podlogama bez dodatka seruma, kao što je triptozni agar i ne pripada karbofilnim vrstama brucela.

U prijemčiv organizam bakterije najčešće ulaze *per os* ili preko sluzokoža genitalnog trakta. Kliničke manifestacije bruceloze pasa podrazumevaju nastanak pobačaja, zapaljenje tkiva reproduktivnog trakta i pojavu metritisa, orhitisa i epididimitisa što u krajnjoj liniji može da dovede do steriliteta kod oba pola. Od kliničkih simptoma zabeležena je pojava limfadenitisa i diskospondilitisa (Carmichael i Kenney, 1968; Carmichael, 1976; Barton, 1977; Johnson i Walker, 1992; Berthelot i Garin-Bastuji, 1993; Carmichael, 1999). Kod većine inficiranih životinja bolest protiče inaparentno, što dodatno otežava postavljanje kliničke dijagnoze. Serološka dijagnostika takođe može da bude nepouzdana, a posebno u prvih mesec dana bolesti kada je titar antitela u serumu varijabilan. Na rezultate ispitivanja umnogome utiče i upotrebljena dijagnostička metoda.

#### **2.4. Izlučivanje *B. canis* iz inficiranog organizma i putevi prenošenja**

Po ulasku u organizam i nakon lokalnog umnožavanja u regionalnim limfnim čvorovima bakterije dospevaju u krv. Nakon perioda bakterijemije koji može da traje različito vreme, a nekada i godinama, *B. canis* se lokalizuje u tkivima reproduktivnog trakta odakle se kontinuirano ili povremeno izlučuje u spoljašnju sredinu, mesecima, a nekada i godinama.

Brucele se izlučuju vaginalnim iscedkom za vreme estrusa, prilikom pobačaja i posle porođaja. U odgajivačnicama pasa ženke koje su pobacile predstavljaju značajan izvor infekcije. Kod kuja se javlja vaginalni iscedak koji može biti prisutan 4-6 nedelja nakon pobačaja. U pobačenim tkivima posteljice i plodovim tečnostima prisutan je veliki broj uzročnika, koji se mogu naći u koncentracijama do  $10^{10}$  CFU/ml (CFU-*colony forming unit*) (Carmichael i Green, 1990).

Dugo nakon prestanka bakterijemije, u organizmu zaraženih mužjaka brucele se nalaze u prostati i pasemenicima i izlučuju se spermom (Carmichael i Shin, 1996). Ako

se mužjak aktivno koristi za reprodukciju ovi organi predstavljaju glavna mesta umnožavanja i diseminacije *B. canis*. Uzorci sperme imaju visoku koncentraciju bakterija u prva dva meseca posle infekcije, a izlučivanje može sporadično da se nastavi godinama, pri čemu domaćin ne mora da ispolji bilo kakve simptome, uključujući povišenje telesne temperature i pojavu orhitis.

Bakterije se takođe izlučuju i urinom, a izlučivanje počinje od 4-8 nedelja posle nastanka infekcije. Iako oba pola izlučuju bakterije urinom, njihov broj u urinu mužjaka je veći nego kod ženki i iznosi i do  $10^3$ - $10^6$  CFU/ml urina (Serikawa i sar., 1981; Carmichael i Joubert, 1988). Smatra se da urin može biti manje važan put prenošenja infekcije (Serikawa i sar., 1978; Serikawa i Muraguchi, 1979), iako sadrži značajan broj bakterija tokom prvih nedelja do tri meseca nakon infekcije. Sa druge strane, činjenica da socijalni život pasa podrazumeva obeležavanje teritorije urinom, nameće pitanje korišćenja javnih zelenih površina u kojima se nalazi potencijalni izvor bolesti. Pojava bruceloze kod vlasničkih pasa koji se nikada nisu parili ukazuje na to da se ne može zanemariti uloga urina u prenošenju bolesti (Živojinović i sar., 2006).

Značajan put izlučivanja *B. canis* je i mleko u kome se nalazi veliki broj bakterija, što može dovesti do infekcije mladunaca (Pollock, 1979). Neki autori navode da mleko nije značajan izvor infekcije za potomstvo jer do inficiranja dolazi još u materici (Carmichael i Green, 1990). Bakterije su izolovane i iz pljuvačke, iscetka iz nosa i oka, kao i fecesa (Weber i Christoph, 1982). Postoje navodi da su i oprema, prostor u kome se drže inficirane životinje i ljudi u kontaktu bili izvor infekcije (Johnson i Walker, 1992).

Kod polno zrelih pasa oboljenje se prenosi parenjem, ali i oronazalno i peroralno, unošenjem kontaminiranih tkiva ili tečnosti. Glavni put prenošenja bruceloze pasa je polni put gde je verovatnoća za širenje visoka zbog velikog broja brucela koje se izlučuju vaginalnim sekretom i spermom. Psi koji ne ispoljavaju simptome mogu biti nosioci *B. canis* tokom dužeg vremenskog perioda. Vreme od početnog izlaganja uzročniku do pojave bakterijemije iznosi oko tri nedelje.

Jatrogeno, infekcija se može prenositi kontaminiranim vaginoskopima, veštačkim osemenjavanjem i upotrebom kontaminiranih špriceva, a u retkim slučajevima i transfuzijom inficirane krvi (Pollock, 1979).

## **2.5. Imunološki odgovor na infekciju vrstom *B.canis***

Važna osobina *B. canis* je sposobnost razmnožavanja i preživljavanja u ćelijama monocitno-makrofagnog sistema, epitelnim ćelijama i trofoblastima placente (Pizarro-Cerdá i sar., 2000; Celli, 2006) što omogućava nastanak hronične infekcije kod inficiranih jedinki. Brucele, a posebno *B. canis*, izazivaju zapaljensku reakciju niskog intenziteta. Kisela sredina unutar fagozoma ne oštećuje bakterije, ali izaziva ekspresiju bakterijskih gena koji su bitni za intracelularno preživljavanje tokom ranih faza infekcije vrstom *B. canis* (Porte i sar., 1999; Boschioli i sar., 2002).

Uzročnici poseduju sposobnost preživljavanja i razmnožavanja u dendritičnim ćelijama i za njih imaju veći tropizam nego za makrofage. Prisustvo uzročnika u ovim ćelijama zaustavlja njihovo sazrevanje što ometa prezentaciju antigena i sekreciju odgovarajućih citokina (Billard i sar., 2007; Cirl i sar., 2008; Salcedo i sar., 2008).

## **2.6. Patogeneza i klinička slika bruceloze pasa**

Vrata infekcije za *B. canis* su prvenstveno sluzokože genitalnog trakta, ali i sluzokože nosne i usne duplje ili konjunktive. Nakon ulaska *B. canis* u organizam domaćina, brucele bivaju fagocitovane i transportovane do limfatičnih tkiva (limfnih čvorova, slezine) i genitalnih organa gde dolazi do njihovog umnožavanja. Bakterijemija se javlja sporadično, a epizode bakterijemije se mogu javljati i pet godina nakon infekcije (Carmichael i Green, 1990).

Bruceloza pasa je oboljenje koje nema patognomonične simptome i koje često protiče asimptomatski. Kod pasa najčešći su simptomi vezani za promene na

reproduktivnim organima. Klinički simptomi mogu varirati od blagih do teških reproduktivnih poremećaja. Na brucelozi uvek treba prvo posumnjati kod pasa kod kojih se javljaju reproduktivni poremećaji - pobačaji i zapaljenje semenika i pasemenika. Morbiditet može biti visok, a mortaliteta kao direktne posledice infekcije ovim uzročnikom kod odraslih životinja nema.

Najčešći vidljivi klinički znak je pobačaj naizgled zdrave životinje bez prethodno ispoljenih simptoma. Za pse je karakteristično i da nakon pobačaja pojedu mladunčad pa se u ovakvim slučajevima pobačaj i ne primeti.

Pobačaji, kao najčešći simptom bruceloze pasa kod ženki, javljaju se u periodu između 30. i 57. dana graviditeta, a najčešće između 45. i 55. dana. Nakon pobačaja, javlja se viskoznan, serohemoragičan vaginalni iscedak, braon do sivozelene boje, koji može biti prisutan 1-6 nedelja (Carmichael i Kenney, 1968). U ovom iscetku se nalazi veliki broj bakterija koje su značajan izvor infekcije za druge pse, ali i držaoce životinja.

Takođe, može doći do uginuća i resorpcije embriona, uginuća fetusa ili rađanja slabo vitalnih štenaca koji žive nekoliko sati ili dana. Resorpcija embriona u ranim fazama graviditeta, koja prolazi nezapaženo od strane vlasnika, može navesti na pogrešan zaključak da se radi o neuspešnom začecu ili se ženka može proglasiti neplodnom. Mogu se roditi i naizgled zdravi mladunci kod kojih se sa ulaskom u pubertet može ispoljiti oboljenje (Lewis i sar., 1973; Nicoletti, 1989). Preživeli mladunci mogu da budu bakterijemični nekoliko meseci.

Naredni graviditet može da protekne normalno, (Serikawa i sar., 1978), a prisustvo uzročnika kod kuja ne utiče na normalnu pojavu estrusa (Pickerill i Carmichael, 1972).

Kod mužjaka se najčešće javljaju zapaljenske promene na pasemenicima i prostati. Tokom akutne faze oboljenja prisutna je bolnost usled uvećanja pasemenika i nakupljanja serohemoragične tečnosti u omotačima semenika (Moore i Kakuk, 1969; Schoeb i Morton, 1978; George i sar., 1979). Zapaljenje pasemenika nastaje oko pet nedelja nakon početka infekcije.

U hroničnoj fazi, intenzitet zapaljenja pasemenika se smanjuje, ali dolazi do induracije tkiva pa često nastaje jednostrana ili obostrana atrofija testisa (Greene i Carmichael, 2006). Zbog prisutnog bola kod životinja dolazi do smanjenja libida i odbijanja parenja.

Kao posledica zapaljenja dolazi do prestanka spermatogeneze, smanjenja količine ejakulata i generalno lošeg kvaliteta sperme, a na spermatozoidima su vidljive promene u morfologiji i broju (Shin i Carmichael, 1999). Promene na spermatozoidima se javljaju 16 nedelja posle infekcije (Serikawa i sar., 1984).

Oštećenje testisa pokreće autoimunski odgovor koji dovodi do nastanka antitela protiv spermatozoida (Serikawa i sar., 1984b) od 11 do 14 nedelja nakon infekcije (Serikawa i sar., 1981). Aglutinacija spermatozoida je vidljiva od 18. do 27. nedelje posle infekcije (Serikawa i sar., 1984).

Autoimunski fenomen koji nastaje kao posledica zapaljenja, oštećenja tkiva testisa i pojavljivanja sopstvenih antigena u cirkulaciji, povezan je sa nastankom steriliteta kod nekih pasa. Bez obzira da li postanu sterilni ili ne, psi mogu nastaviti da izlučuju *B. canis* spermom (Nicoletti, 1989) iz koje se uzročnici izoluju i tri meseca nakon infekcije (Carmichael, 1976).

Povišenje telesne temperature je neuobičajeno jer *B. canis* poseduje drugačiji LPS u odnosu na druge pripadnike roda *Brucella* (Serikawa i sar., 1978).

Limfadenitis, posebno onaj koji uključuje retrofaringealne i ingvinalne limfne čvorove, prisutan je kod oba pola. Kod polno nezrelih pasa najčešći klinički simptom je generalizovani limfadenitis (Carmichael i Green, 1990).

U literaturi su opisani slučajevi diskospondilitisa torakalnih i lumbalnih pršljenova, praćenih akutnim bolom koji je lokalizovan u predelu kičmenog stuba, sa posledičnom hromošću, parezama i ataksijama (Kerwin i sar., 1992).

Usled taloženja imunskih kompleksa u tkivima oka, mogu se javiti i endoftalmitis i rekurentni uveitis (Saegusa i sar., 1977; Gwin i sar., 1980). U literaturi je opisan i negnojni meningitis i meningoencefalitis (Serikawa i sar., 1978; Purvis, 1981) kao i endokarditis kod obolelih pasa (Ying i sar., 1999).

## **2.7. Patomorfološke promene**

Na obdukciji se najčešće zapaža uvećanje retrofaringealnih i ingvinalnih limfnih čvorova, ali se može javiti i generalizovani limfadenitis, zatim hepatomegalija i splenomegalija.

Kod mužjaka dolazi do pojave skrotalnog edema, skrotalnog dermatitisa, epididimitisa, orhitisa i prostatitisa. Kod hroničnih slučajeva uočava se atrofija i fibroza testisa.

Kod ženki se nalazi metritis i vaginalni iscedak. Na posteljici dolazi do nastanka fokalne koagulacione nekroze horionskih resica i nekrotičnog arteritisa, a brojne bakterije su prisutne u trofoblastima.

Na pobačenim plodovima se uočava autoliza koja je posledica generalizovane bakterijske infekcije. Može biti prisutan supkutani edem, supkutana kongestija i krvarenje u trbušnoj regiji, serohemoragična peritonealna tečnost i degenerativne promene u jetri, slezini, bubrezima i crevima.

Drugi organski sistemi su ređe zahvaćeni promenama, a najčešće se javljaju diskospondilitis, promene na intervertebralnim diskovima, osteomijelitis, meningitis, fokalni negnojni encefalitis i apscesi u različitim unutrašnjim organima. U uvei oka dolazi do formiranja antigen-antitelo kompleksa što prouzrokuje anteriorni uveitis (Saegusa i sar., 1977; Gwin i sar., 1980).

## **2.8. Patohistološki nalaz**

Patohistološki, prisutna je hiperplazija retikularnih ćelija u limfnim čvorovima i granulomatozne promene u koži, testisima i drugim organima (Serikawa i sar., 1978).

Oštećenje ćelija usled upale epididimisa dovodi do izlaska antigenskog materijala u okolne omotače testisa što stimuliše stvaranje antitela protiv spermatozoida. S obzirom na to da su tkiva testisa tokom ontogeneze imunološki zaštićena tkiva i kao



takva nepoznata imunskom sistemu domaćina, to zapravo znači da će bilo kakva mehanička trauma ili zapaljenje tokom koga dolazi do izlaska antigena tkiva testisa biti okidač za nastanak autoimunske reakcije. Kao posledica toga u spermiji se mogu naći spermatozoidi abnormalne morfologije, aglutinovani spermatozoidi ili isti mogu da nedostaju (Serikawa i sar., 1981; George i sar., 1984). Sintetisana antitela koja nastaju kao posledica autoimunske reakcije organizma su usmerena protiv spermatozoida, a ne protiv *B. canis*.

## **2.9. Lečenje bruceloze pasa**

Bruceloza pasa zbog intracelularnog opstanka i razmnožavanja uzročnika, zahteva dugotrajno lečenje visokim dozama antibiotika. U literaturi je opisano više terapijskih protokola koji se sa manje ili više uspeha koriste u terapiji ove bolesti. Peroralna aplikacija tetraciklin-hidrohlorida u dozi od 30 mg/kg dva puta dnevno tokom 28 dana, pri čemu je psima prvih 14 dana terapije jednom dnevno intravenski aplikovan i streptomycin u dozi od 20 mg/kg dovela je do eliminacije infekcije kod 81 od 86 seropozitivnih pasa (Nicoletti, 1991). U drugom istraživanju, ženke obolele od bruceloze, tretirane su kombinovanom antibiotskom terapijom koja se sastojala od tetraciklina, dihidrostreptomocina i trimetoprim sulfadijazina. Nakon šest nedelja lečenja, došlo je do eliminacije bakterija iz krvi i pada titra antitela kod svih lečenih životinja izuzev jedne (Johnson i sar., 1982). Jedan od uspešnijih i najčešće primenjivanih terapijskih protokola je peroralna aplikacija tetraciklina u dozi od 30 mg/kg tokom mesec dana uz intramuskularnu aplikaciju streptomocina u dozi od 20 mg/kg tokom prve i poslednje nedelje tretmana (Nicoletti i Chase, 1987). Ispitana je i efikasnost enrofloksacina u terapiji bruceloze pasa, pri čemu su postignuti veoma dobri rezultati. U ovaj eksperiment su uključene ženke koje su parene sa inficiranim mužjacima. Inficiranim ženkama je dva puta dnevno aplikovan enrofloksacin u dozi od 5 mg/kg tokom 30 dana. Nakon završetka eksperimenta, psi su ispitivani serološkim testovima narednih 38 meseci, a takođe su pored seroloških praćeni i rezultati kliničkog pregleda i bakteriološke izolacije. Četrnaest meseci od početka istraživanja svi psi su bili negativni primenom brzog aglutinacionog testa. Sve ženke uključene u eksperiment

su imale normalan graviditet i oštenile zdravu štenad. Bakteriološkim ispitivanjima vaginalnog iscetka nakon porođaja nije izolovana *B. canis* (Wanke i sar., 2006). U literaturi su opisane i pojave recidiva i pored relativno uspešne terapije; naime *B. canis* može da preživi u tkivima kao što su limfni čvorovi, prostata, materica i slezina (Lewis i sar., 1973).

U Republici Srbiji se prema Pravilniku o načinu sprovođenja mera za suzbijanje i iskorenjivanje bruceloze goveda, ovaca, koza, svinja i pasa donesenom 2005. godine („Službeni glasnik RS“) sprovodi antibiotski tretman inficiranih pasa uz obaveznu histerektomiju, odnosno orhidektomiju.

## **2.10. Rasprostranjenost bruceloze pasa**

### **2.10.1. Rasprostranjenost bruceloze pasa u svetu**

Bruceloza pasa je prisutna širom sveta, sa izuzetkom Australije i Novog Zelanda (Wanke, 2004). Oboljenje je opisano u Španiji (Mateau de Antonio i sar., 1994), Austriji (Hofer i sar., 2012), Mađarskoj (Gyuranecz i sar., 2011), Italiji (Ebani i sar., 2003; Corrente i sar., 2010), Iranu (Mosallanejad i sar., 2009), Švedskoj (Holst i sar., 2012). Bruceloza pasa je enzootsko oboljenje u Severnoj Americi kao i zemljama Centralne i Južne Amerike (Carmichael, 1990), a opisano je i u Kanadi gde je zabeležena prevalencija od 0,3% (Bosu i Prescott, 1980). U Italiji je primenom AGID testa (AGID - agar gel imunodifuzioni test) zabeležena prevalencija od 1,07% (Ebani i sar., 2003). U Iranu u populaciji vlasničkih pasa prevalencija antitela protiv *B. canis* iznosi 4,90% (5 pozitivnih pasa od ukupno 102 testirana) (Mosallanejad i sar., 2009). Švedska je do 2012. godine bila zemlja slobodna od *B. canis* kada je opisan prvi slučaj kod psa uvezenog iz Poljske (Holst i sar., 2012). Prvi slučaj pojave oboljenja u odgajivačnici u Mađarskoj opisan je 2011. godine (Gyuranecz i sar., 2011), a u Austriji su Hofer i sar., prvi slučaj u odgajivačnici pasa opisali 2012. godine.

## 2.10.2. Rasprostranjenost bruceloze pasa u Republici Srbiji

Radojičić i sar. su opisali prvi slučaj infekcije pasa vrstom *B. canis* u Srbiji 1999. godine. Kasnije je oboljenje dijagnostikovano i na području Beograda i Požarevca (Radojičić i sar., 2000; Živojinović i sar., 2006). Za sada nema podataka o rasprostranjenosti oboljenja u drugim delovima naše zemlje.

## 2.11. Laboratorijska dijagnostika bruceloze pasa

Različite dijagnostičke metode koje se koriste u dijagnostici bruceloze pasa variraju u osetljivosti i specifičnosti. Česte su pojave lažno pozitivnih i lažno negativnih rezultata.

Klasične metode koje se koriste za otkrivanje antitela protiv *S Brucella* spp. ne mogu se koristiti za ispitivanje seroprevalencije infekcija izazvanih *B. canis*. Osobine po kojima se *B. canis* i *B. ovis* razlikuju od ostalih članova roda *Brucella* je prisustvo R-LPS-a koji čini ove bakterije manje patogenim od ostalih vrsta brucela. Ovakva struktura LPS-a uslovljava upotrebu homotipskog antigena u serološkoj dijagnostici bruceloze pasa.

Jedina metoda uz pomoć koje se sa sigurnošću može postaviti dijagnoza je izolacija *B. canis*. Izolacija *B. canis* nije uvek uspešna, naročito u slučajevima kada prestane bakterijemija, a *B. canis* se lokalizuje u unutrašnjim organima. Kod određenog broja serološki negativnih mužjaka otkriveno je prisustvo *B. canis* u epididimisu i prostati (Moore i Kakuk, 1969; Flores-Castro i sar., 1977).

Tri do četiri meseca nakon infekcije, dolazi do postepenog prestanka bakterijemije, a titar specifičnih antitela protiv *B. canis* u serumu obolelih pasa raste (Carmichael i Kenney, 1968). Specifična antitela protiv *B. canis* se duži vremenski period mogu održavati u titru od 1/25 do 1/50 (Flores-Castro i sar., 1977; Serikawa i sar., 1978).

### 2.11.1. Serološke metode

U dijagnostici bruceloze pasa ne postoje standardizovane serološke metode. Serološke metode zasnivaju se na korišćenju antigena dobijenih različitim postupcima.

Prilikom izvođenja seroloških reakcija javlja se veliki broj lažno pozitivnih rezultata koji nastaju kao posledica postojanja površinskih antigenskih determinanti (R-LPS) koje su zajedničke *B. canis* i drugim bakterijama kao što su *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp. i *Pseudomonas* spp. (Zoha i Carmichael, 1982a, 1982b; Carmichael i sar., 1984; Carmichael i Joubert, 1987). Testovi u kojima se koriste antigeni dobijeni od manje mukoidnog (M-) soja *B. canis* daju manje lažno pozitivnih rezultata od onih u kojima se kao antigeni koriste *B. ovis* i referentni soj *B. canis* (RM 6/66). Iz tog razloga za dijagnostiku se preporučuje korišćenje testova pripremljenih od manje mukoidne varijante *B. canis*. Za razliku od sojeva *B. canis* koji imaju osobinu da dovode do autoaglutinacije, manje mukoidni soj (M-) *B. canis* ne dovodi do autoaglutinacije i to je razlog što je ovaj soj bolje koristiti u serološkoj dijagnostici bruceloze pasa (Carmichael i sar., 1984b; Carmichael i sar., 1989).

Bez obzira na izbor upotrebljenog soja odnosno antigena, u literaturi su navedeni podaci koji pokazuju da, iako se specifična antitela protiv *B. canis* mogu otkriti dve nedelje posle infekcije, serološke metode nisu pouzdane u prvih 12 nedelja po inficiranju (Zoha i Carmichael, 1982b).

Od seroloških dijagnostičkih metoda koje su danas u upotrebi najčešće se koriste:

1. brzi aglutinacioni test sa i bez dodavanja 2-merkaptetanola (2-ME),
2. test aglutinacije u epruveti sa i bez dodavanja 2-merkaptetanola (2-ME),
3. agar gel imunodifuzija,
4. ELISA testovi u kojima se koriste antigeni ćelijskog zida ili citoplazmatski proteini,
5. indirektna imunofluorescencija.

#### *2.11.1.1. Test brze aglutinacije na pločici – (RSAT - Rapid slide agglutination test)*

Brzi test aglutinacije na pločici je najjednostavniji metod koji se koristi u praksi. Dovoljno je osjetljiv da se može koristiti kao trijažni test, ne samo u ranim fazama infekcije, a pojava lažno negativnih rezultata je retka. Dodatkom 2-merkaptetanola specifičnost ovog testa se povećava. Uzorke pozitivne na *B. canis* potrebno je ispitati testovima koji imaju veću specifičnost.

#### *2.11.1.2. Test spore aglutinacije u epruveti (TAT - Tube agglutination test)*

Testom spore aglutinacije u epruveti mogu se otkriti inficirane životinje u periodu od dve do četiri nedelje nakon infekcije vrstom *B. canis*. Kada se ustanovi visina titra specifičnih antitela od 1/200, rezultat se smatra pozitivnim, dok titri od 1/50 i 1/100 ukazuju na sumnju na oboljenje. Kod ovakvih, sumnjivih slučajeva preporučuje se ponovljeno ispitivanje parnih seruma nakon dve nedelje (Carmichael i Kenney, 1968; Alton i sar., 1975). Specifičnost ovog testa je niska, ali se može povećati dodavanjem 2-merkaptetanola (Moore i Kakuk, 1969). Upotrebom 2-merkaptetanola razaraju se pentameri imunoglobulina klase M koji su uglavnom zaduženi za pojavu nespecifičnih reakcija. U slučaju ispitivanja hemolizovanih seruma očitavanje reakcije je otežano ili nemoguće (Carmichael i Kenney, 1970; Carmichael i Green, 1990).

#### *2.11.1.3. Agar gel imunodifuzioni test (AGID) i imunoenzimski testovi (ELISA - Enzyme linked immunosorbent assay)*

Agar gel imunodifuzioni test za dijagnostiku bruceloze pasa su prvi opisali Zoha i Carmichael 1982 (b) godine. Dizajnirano je i procenjeno više ELISA testova, a dobijeni rezultati su različiti u zavisnosti od načina pripreme upotrebljenog antigena. Za sada ne postoje komercijalni imunoenzimski testovi za dijagnostiku bruceloze pasa. Metode AGID i ELISA se mogu izvoditi primenom citoplazmatskih ili antigena ćelijskog zida odnosno LPS-a. Antigeni mogu biti poreklom iz soja *B. canis* RM 6/66, manje mukoidnog soja (M-) *B. canis* koji su opisali Carmichael i Kenney (1968), zatim LPS bakterijskog ćelijskog zida *B. ovis*, kao i citoplazmatski proteini iz *B. abortus* i *B. canis* (Baldi i sar., 1994, 1997; Wanke i sar., 2000, 2002).

Upotrebom antigena ćelijskog zida *B. canis* javljaju se lažno pozitivni rezultati kao posledica unakrsne reaktivnosti sa drugim vrstama bakterija. Specifična antitela koja nastaju protiv ovih antigena javljaju se na početku infekcije i nestaju ubrzo nakon što je bakterijemija prestala (Moon i sar., 1994). U literaturi su opisane metode kojima je moguće razlikovati specifične precipitinske linije koje nastaju reakcijom specifičnih antitela i antigena *B. canis* od onih koje su posledica lažno pozitivnih rezultata (Zoha i Carmichael, 1982b). ELISA testovi napravljeni od antigena ćelijskog zida M- *B. canis* poseduju visoku specifičnost i nešto nižu osetljivost, za razliku od testova sa antigenom poreklom iz referentnog soja RM 6/66 koji često daje visok procenat lažno pozitivnih rezultata (Serikawa i sar., 1989; Mateau de Antonio i sar., 1993).

Upotrebom citoplazmatskih antigena, povećava se specifičnost AGID testa, a broj lažno pozitivnih rezultata se smanjuje. Rezultati dobijeni upotrebom citoplazmatskih antigena na početku infekcije nisu pouzdani, jer specifična antitela protiv takvih antigena nastaju u kasnijem toku infekcije (Zoha i Carmichael, 1982b; Carmichael i sar., 1984, 1989; Mateau de Antonio i sar., 1994).

#### 2.11.2. Klasične metode bakteriologije – izolacija i identifikacija *B. canis*

Izolacija *B. canis* iz uzoraka poreklom od obolelih životinja je najsigurniji metod za konačnu potvrdu infekcije kod pasa. Izolacija se vrši na obogaćenim hranljivim podlogama, sa ili bez dodatka seruma ili na selektivnim podlogama kao što

je Farrell-ova podloga ili Thayer-Martin modifikovana podloga. Izolacija je otežana u slučajevima kontaminiranih uzoraka ili primene antibiotika u lečenju, a pre postavljanja egzaktno dijagnoze, pa u tom slučaju rast može biti spor. Na podlogama *B. canis* rastu u obliku kolonija koje su prirodno hrapave (R) i mukoidne (M).

Pogodan materijal za izolaciju je sterilno uzorkovana krv sa antikoagulansom, jer kontaminanti prisutni u drugim vrstama uzoraka mogu ometati izolaciju *B. canis*. Bakterijemija kod pasa može biti povremena, a broj bakterija mali što je jedan od razloga dobijanja lažno negativnih rezultata.

Za izolaciju su pogodni i uzorci poreklom iz genitalnog trakta (npr. sperma, vaginalni iscedak, placenta), posebno kod životinja sa znacima reproduktivnih poremećaja. Zbog česte kontaminacije uzoraka sperme pasa saprofitnim vrstama bakterija, izolacija *B. canis* je relativno otežana i hranljive podloge koje se koriste za izolaciju moraju da sadrže selektivne dodatke (antibiotike i slično). Slično tome, uzorci vaginalnog iscetka tokom estrusa i posle pobačaja kod inficiranih kuja mogu biti kontaminirani enterobakterijama i drugim vrstama koje pripadaju brzorastućim bakterijama pa je u takvim slučajevima izolacija otežana, čak i onemogućena. *B. canis* se u ogromnom broju može naći i u placenti, mada njeno prisustvo u pobačenim fetusima nije obavezan i stalan nalaz.

*B. canis* se takođe može izolovati iz mleka, urina i pobačenih fetusa (želudačni sadržaj, jetra, slezina), limfnih čvorova, slezine, prostate, epididimisa, testisa, uterusa, jetre, kostne srži i zahvaćenih pršljenova (Nicoletti, 1989). Izolacija *B. canis* iz uzoraka urina inficiranih mužjaka je pouzdanija i lakša nego kod ženki jer je urin ženskih životinja mnogo češće kontaminiran drugim vrstama mikroorganizama (Serikawa i sar., 1978).

### 2.11.3. Molekularne metode u detekciji *B. canis*

Garcia-Yoldi i sar. su dizajnirali Bruce-ladder multiplex PCR metodu koja je namenjena za brzu i jednostavnu identifikaciju više vrsta brucela i njihovih vakcinalnih

sojeva. Navedeni autori su na osnovu genetičkih razlika između vrsta brucela dizajnirali osam parova prajmera za Bruce-ladder multipleks PCR metodu.

Za *B. canis* je specifična delecija 976 bp u hromozomu I. U Bruce-ladder multiplex PCR protokolu ukupno se može pojaviti sedam amplikona: 1682, 1071, 794, 587, 450, 272 i 152 bp. *B. canis* se od ostalih brucela razlikuje po odsustvu fragmenta 794 bp (Garcia-Yoldi i sar., 2006).

Nedostatak Bruce-ladder multiplex PCR metode je to što neke sojeve *B. canis* identifikuje kao *B. suis* (López-Goñi i sar., 2008). Ovaj nedostatak prevaziđen je novom multipleks PCR metodom nazvanom Suis-ladder koja razlikuje sve biotipove u okviru vrste *B. suis*, a pravi razliku i između *B. suis* i *B. canis*. Primenom ovog protokola na referentni soj *B. canis* dobijen je specifičan profil sa samo dva fragmenta, 614 i 197 bp, a nedostajao je fragment 774 bp koji je zajednički za sve biotipove *B. suis*. Takođe su i svi ispitani izolovani sojevi *B. canis* pokazali odsustvo ovog fragmenta (774 bp) potvrđujući da je delecija ovog dela genoma karakteristična za *B. canis*.

López-Goñi i sar. preporučuju zamenu para prajmera BMEI1436f i BMEI1435r u originalnoj Bruce-ladder multiplex PCR metodi prajmerima BMEI1426 i BMEI1427 (Tabela 1). Bruce-ladder multiplex PCR metoda modifikovana na ovaj način nazvana je Bruce-ladder multiplex PCR v2.0 (López-Goñi i sar., 2011).

Tabela 1. Prajmeri upotrebljeni u Bruce-ladder multiplex v2.0 metodi

Prajmeri	Sekvenca	Ciljni gen DNK
BMEI1426	TCG TCG GTG GAC TGG ATG AC	Delecija 351 bp u BMEI1426-BMEI1427 u <i>B. canis</i>
BMEI1427	ATG GTC CGC AAG GTG CTT TT	



### 3. CILJ I ZADACI ISPITIVANJA

Cilj istraživanja ove doktorske disertacije je bilo poređenje rezultata dobijenih primenom sopstveno pripremljenih seroloških testova sporog aglutinacionog i ELISA testa sa rezultatima klasičnog bakteriološkog i molekularnog ispitivanja metodom lančane reakcije polimeraze (Bruce-ladder multiplex PCR) u cilju procene osetljivosti i specifičnosti, odnosno pouzdanosti tri dijagnostička protokola koje je moguće koristiti u rutinskoj dijagnostici bruceloze pasa.

Za ostvarivanje postavljenih ciljeva definisani su i zadaci istraživanja:

1. Prikupljanje materijala poreklom od životinja, krv i reproduktivni organi uzeti nakon sterilizacije ne vlasničkih pasa.
2. Obrada prikupljenog materijala – odvajanje krvnih seruma i homogenizacija tkiva u aparatu Bag Mixer 400 P (*Interscience, France*).
3. Umnožavanje referentnog soja *B. canis* RM 6/66 u cilju pripreme antigena za izvođenje seroloških reakcija.
4. Priprema i validacija sporog aglutinacionog testa u epruveti (TAT).
5. Priprema i validacija indirektnog imunoenzimskog testa – ELISA.
6. Serološko ispitivanje prikupljenih krvnih seruma pripremljenim testovima – TAT i indirektna ELISA.
7. Bakteriološko ispitivanje homogenizata tkiva na specijalnom selektivnom bifaznom Kastaneda medijumu u cilju eventualne izolacije *B. canis*.

8. Ispitivanje izolata klasičnim bakteriološkim tehnikama do dostupnog nivoa identifikacije uz izvođenje testa rezistencije na tisonin i bazni fuksin po opisanoj proceduri.
9. Ekstrakcija molekula DNK iz dobijenih izolata kao i suspenzije tkiva reproduktivnih organa.
10. Izvođenje Bruce-ladder multiplex PCR metode po opisanoj proceduri sa odgovarajućim prajmerima.
11. Statistička obrada dobijenih rezultata - poređenje rezultata dobijenih testiranjem uzoraka krvnih seruma i tkiva serološkim, bakteriološkim i molekularnim metodama.

## 4. MATERIJAL I METODE RADA

### 4.1. Uzorci

Uzorci su prikupljeni na Fakultetu veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu prilikom sprovođenja sterilizacije pasa u okviru Strategije za rešavanje problema nevlasničkih pasa i mačaka na teritoriji grada Beograda („Službeni list grada Beograda“ br. 37/11). Nakon hirurškog zahvata - sterilizacije pasa, a tokom trajanja anestezije uzeti su uzorci testisa, uterusa i krvi. Istraživanje je odobrila Uprava za veterinu pri Ministarstvu poljoprivrede i zaštite životne sredine Republike Srbije rešenjem broj 323-07-03455/2015-05/1.

Sakupljen je materijal od 225 pasa lualica – 145 ženki i 80 mužjaka.

Za serološka ispitivanja, uzorci krvi pasa dobijeni su punkcijom *venae cephalicae antebrachii*. Uz poštovanje principa asepse krv je uzimana u sterilne staklene epruvete u količini od oko 6 ml. Nakon spontane koagulacije krv je centrifugovana na 2000xg 15 minuta. Krvni serum su zatim odvajani u Eppendorf mikrotube i do dalje obrade čuvani na temperaturi od -20 °C.

Reproduktivni organi (testisi i uterus) su obrađivani u stomaheru kako bi se smanjio rizik od laboratorijskih infekcija. Reproductivni organi su prethodno usitnjeni uz pomoć sterilnih makazica i pincete. Organi su homogenizovani u aparatu Bag Mixer 400 P (*Interscience, France*), jačine 8 udaraca/s. Korišćena su razređenja organa sa fiziološkim rastvorom u razmeri 1:2. Uzorci su homogenizovani u kesama sa filterom poroznosti <250 µm (Bag Filter P) zapremine 400 ml (*Interscience, France*). Tako homogenizovan materijal je deljen na dva dela, jedan deo je korišćen za izolaciju, a

drugi za ekstrakciju DNK, a zatim je materijal pakovan u Eppendorf mikrotube i čuvan na temperaturi od -20 °C do upotrebe.

Krvni serumi su testirani metodom spore serumske aglutinacije u epruveti sa dodatkom 2-merkaptetanola i ELISA testom, a homogenizovani reproduktivni organi klasičnim bakteriološkim metodama i PCR testom.

#### **4.2. Pozitivna i negativna kontrola**

U sve izvedene dijagnostičke metode uključene su i pozitivna i negativna kontrola.

Kao pozitivna kontrola u serološkim testovima (spora serumska aglutinacija u epruveti sa dodatkom 2-merkaptetanola i ELISA) korišćen je serum sigurno pozitivnog psa iz koga je izolovana *B. canis* što je potvrđeno u referentnoj OIE (*World Organisation for Animal Health*) laboratoriji u Francuskoj 2004. godine (AFSSA - *Agence Française de sécurité sanitaire des aliments*). Titar antitela protiv *B. canis* iznosio je 1/3200 (2-ME TAT). Kao negativne kontrole uzeti su serumi sigurno zdravih vlasničkih pasa pre polne zrelosti, starosti šest meseci.

Kao pozitivne kontrole prilikom klasične bakteriološke izolacije i Bruce-ladder multiplex PCR metode korišćeni su referentni soj *B. canis* RM 6/66, izolat *B. canis* SR-1 i izolat *B. suis* WS 1 (potvrđeni u referentnoj laboratoriji, AFSSA, Francuska 2004).

#### **4.3. Priprema antigena**

Za pripremu antigena korišćen je referentni soj *B. canis* RM 6/66.

Antigen potreban za izvođenje testa spore serumske aglutinacije u epruveti sa dodatkom 2-merkaptetanola pravljen je po opisanoj proceduri (Alton i sar., 1988). Pripremljene su podloge u epruvetama i Roux bocama čija je sterilnost proverena inkubiranjem 48 h na 37 °C. *B. canis* je zasejavana na triptozni kosi agar u

bakteriološkim epruvetama i posle 24 h inkubacije na 37 °C dobijena kultura je spirana sa 5 ml sterilnog fiziološkog rastvora. Zatim je suspenzija bakterija u fiziološkom rastvoru zasejavana na triptozni agar u Roux bocama. Nakon inkubiranja bakterija 24 h na 37 °C kolonije su spirane formalin-fiziološkim rastvorom u koji su dodate staklene perle da bi se dobio što veći prinos bakterija. Bakterijska suspenzija je inaktivisana zagrevanjem u vodenom kupatilu na temperaturi od 70 °C tokom jednog časa, a nakon hlađenja filtrirana kroz nekoliko slojeva sterilne gaze da bi se otklonili delovi agara. Uspešnost inaktivacije je proverena zasejavanjem suspenzije na triptozni agar i inkubacijom na 37 °C tokom 48h. Nakon provere uspešnosti inaktivacije suspenzija je centrifugovana na 1000xg 30 minuta, supernatant je odbacivan, a istaložene bakterije resuspendovane u formalin-fosfatnom slanom puferu. Nakon podešavanja vrednosti pakovane ćelijske zapremine, antigen je čuvan na temperaturi od 4 °C do upotrebe. Čistoća dobijene kulture bakterija je proverena bojenjem po Gramu.

#### **4.4. Spora serumska aglutinacija u epruveti sa dodatkom 2-merkaptetanola (2-ME TAT)**

Krvni serumi pasa su ispitani metodom spore serumske aglutinacije u epruveti sa dodatkom 2-merkaptetanola. Spora serumska aglutinacija u epruveti sa dodatkom 2-merkaptetanola je izvođena u serološkim epruvetama na temperaturi od 37 °C. Svaki uzorak krvnog seruma je testiran u tri razređenja: 1/50, 1/100 i 1/200 u skladu sa preporukama. Razređenja seruma su pravljena u 3,5% rastvoru NaCl uz dodatak formalin-fiziološkog rastvora i 2-merkaptetanola koji je kao disulfid-redukujući agens imao ulogu u razaranju antitela IgM klase. Reakcija je izvođena na temperaturi od 37 °C i očitavana dvokratno, posle 24 i 48 časova.

Kao pozitivan rezultat označavano je svako razređenje seruma u kome je nastalo potpuno razbistravanje tečnosti u epruveti. Sledeći preporuke u literaturi za ovaj tip testova, titri 1/50 i 1/100 su označavani kao sumnjivi, dok je razređenje 1/200 označavano kao znak aktivne infekcije (Alton i sar., 1988).

#### 4.5. Izolacija i identifikacija *B. canis*

Za izolaciju *B. canis* iz reproduktivnih organa korišćene su Demetrove boce sa bifaznim Kastaneda medijumom. Homogenizovani uzorci reproduktivnih organa pasa su zasejavani na triptozni agar i bujon (*Torlak, Srbija*) sa dodatkom selektivnog *Brucella* dodatka (*Brucella Selective Supplement, Oxoid*). Bifazni Kastaneda medijum pravljen je tako što je u Demetrove boce sipano po 20 ml triptoznog agara sa selektivnim dodatkom, a nakon hlađenja podloge u boce je dodato 15 ml triptoznog bujona sa selektivnim dodatkom. Nakon toga proverena je sterilnost podloga inkubacijom na 37 °C tokom 48 h. Nanošenje homogenizovanih organa u Demetrove boce sa podlogom vršeno je pomoću automatske pipete Socorex Acura Manual 810 (*Socorex, Švajcarska*) sa nastavcima za jednokratnu upotrebu. Na podloge je nanošen po 1 ml suspenzije homogenizovanih organa. Inkubacija je vršena na temperaturi od 37 °C u aerobnim uslovima u trajanju od 10 dana. Ukoliko posle tog perioda nije došlo do pojave rasta kolonija inkubiranje je prekidano.

Izolovane bakterije su identifikovane na osnovu svojih morfoloških, biohemijskih i seroloških osobina. Da bi se potvrdila pripadnost dobijenih izolata rodu *Brucella*, primenjena je brza aglutinacija kolonija na pločici sa sigurno pozitivnim serumom na *B. canis*, test produkcije katalaze, ureaza test na Christensen urea medijumu (*Torlak, Srbija*), aglutinacija sa akriflavinom (*Sigma-Aldrich, USA*), test rezistencije na tionin (*Sigma-Aldrich, USA*) i bazni fuksin (*Sigma-Aldrich, USA*), test produkcije H<sub>2</sub>S. Korišćen je i API 20 NE (*bioMerieux, France*).

Za izvođenje testa rezistencije na boje pripremljene su podloge sa dodatkom boja - bazni fuksin i tionin (*Sigma-Aldrich, USA*) u koncentracijama boja u podlozi 1/50000 i 1/100000 (Alton i sar., 1988). Koncentracija izolovanih bakterija je pre zasejavanja na ove podloge podešena na 4 po McFarland standardu.

#### **4.6. Ekstrakcija DNK *B. canis* iz reproduktivnih organa pasa i izolovanih *B. canis***

DNK iz homogenizovanih organa ekstrahovana je pomoću komercijalnog kita za ekstrakciju GeneJET Genomic DNA Purification Kit (*Thermo Scientific, USA*) po uputstvu proizvođača. Ekstrahovana DNK je pakovana u Eppendorf mikrotube i čuvana na -20 °C do upotrebe.

Postupak ekstrakcije DNK iz homogenizovanih organa:

1. U mikroeprevetu zapremine 1,5 ml sipano je 200 µl prethodno homogenizovanog tkiva reproduktivnih organa pasa i resuspendovano u 180 µl rastvora za digestiju. Dodato je 20 µl proteinaze K i dobro izmešano na vibracionoj mešalici (*Thermo Scientific, USA*).
2. Mešavina je inkubirana tokom 3 h na 56 °C uz mešanje, odnosno do potpunog nestanka partikula. Inkubacija je izvedena u aparatu Thermo-Shaker TS-100 (*Biosan, Latvia*).
3. Dodato je 20 µl RNaze, promešano na vibracionoj mešalici, i inkubirano 10 minuta na sobnoj temperaturi.
4. U mešavinu je dodato 200 µl lizirajućeg rastvora, a potom dobro izmešano na vibracionoj mešalici tokom 15 s do potpune homogenizacije mešavine.
5. Zatim je dodato 400 µl 50% etil-alkohola i homogenizovano.
6. U sledećem koraku mešavina je prenetu u GeneJET Genomic DNA Purification kolonu (*Thermo Fisher, USA*) postavljenu u sabirnu tubu. Kolona je centrifugirana 1 minut na 6000xg. Sabirna tuba sa sadržajem je odbačena, a kolona postavljena u novu sabirnu tubu zapremine 2 ml.

7. Dodato je 500  $\mu$ l pufera za ispiranje sa dodatim etil-alkoholom i centrifugirano 1 minut na 8000xg. Filtrat je odbačen, a kolona vraćena u istu sabirnu tubu.
8. Dodato je 500  $\mu$ l pufera za ispiranje II sa dodatim etil-alkoholom i centrifugirano 3 minuta na 13000xg. Sabirna tuba sa sadržajem je odbačena, a kolona prenetu u sterilnu mikrotubu zapremine 1,5 ml.
9. U završnom koraku u centar kolone je dodato 200  $\mu$ l pufera za eluciju i nakon 2 minuta inkubacije na sobnoj temperaturi centrifugirana je 1 minut na 8000xg.
10. Kolone su odbačene, a ekstrahovana DNK zamrznuta na -20 °C i čuvana do upotrebe.

DNK iz izolovanih bakterija ekstrahovana je pomoću komercijalnog kita za ekstrakciju GeneJET Genomic DNA Purification Kit (*Thermo Scientific, USA*) po uputstvu proizvođača. Ekstrahovana DNK je pakovana u Eppendorf mikrotube i čuvana na -20 °C do upotrebe.

Postupak ekstrakcije DNK iz izolovanih bakterija:

1. U mikrotubu zapremine 1,5 ml sakupljeno je  $2 \times 10^9$  bakterija u sterilnoj destilovanoj vodi i centrifugovano 10 minuta na 5000xg. Supernatant je odbačen.
2. Peleta je resuspendovana u 180  $\mu$ l rastvora za digestiju. Dodato je 20  $\mu$ l proteinaze K i dobro izmešano na vibracionoj mešalici (*Thermo Scientific, USA*).
3. Mešavina je inkubirana tokom 30 minuta na 56 °C uz mešanje. Inkubacija je izvedena u aparatu Thermo-Shaker TS-100 (*Biosan, Latvia*).
4. Dodato je 20  $\mu$ l RNaze, promešano na vibracionoj mešalici, a onda inkubirano 10 minuta na sobnoj temperaturi.



5. U mešavinu je dodato 200  $\mu$ l lizirajućeg rastvora, a potom dobro izmešano na vibracionoj mešalici tokom 15 s do potpune homogenizacije mešavine.
6. Zatim je dodato 400  $\mu$ l 50% etil-alkohola i homogenizovano.
7. U sledećem koraku mešavina je prenetu u GeneJET Genomic DNA Purification kolonu postavljenu u sabirnu tubu. Kolona je centrifugirana 1 min na 6000xg. Sabirna tuba sa sadržajem je odbačena, a kolona postavljena u novu sabirnu tubu zapremine 2 ml.
8. Dodato je 500  $\mu$ l pufera za ispiranje sa dodatim etil-alkoholom, centrifugirano 1 min na 8000xg. Filtrat je odbačen, a kolona vraćena u istu sabirnu tubu.
9. Dodato je 500  $\mu$ l pufera za ispiranje II sa dodatim etil-alkoholom i centrifugirano 3 minuta na 13000xg. Sabirna tuba sa sadržajem je odbačena, a kolona prenetu u sterilnu mikrotubu zapremine 1,5 ml.
10. U završnom koraku u centar kolone je dodato 200  $\mu$ l pufera za eluciju i nakon 2 minuta inkubacije na sobnoj temperaturi centrifugirano 1 minut na 8000xg.
11. Kolone su odbačene, a ekstrahovana DNK zamrznuta na  $-20^{\circ}\text{C}$  i čuvana do upotrebe.

#### **4.7. Bruce-ladder multiplex PCR**

Uzorci ekstrahovane DNK iz homogenizovanih organa i iz izolovanih bakterija su testirani Bruce-ladder multiplex PCR metodom koju su opisali García-Yoldi i sar., 2006. godine. Nakon preliminarnih ispitivanja, protokol je modifikovan tako što je u PCR mešavinu umesto 1  $\mu$ l DNK dodavano 10  $\mu$ l ekstrahovane DNK, a količina ukupne PCR mešavine je iznosila 50  $\mu$ l. Prajmeri su korišćeni u konačnoj koncentraciji u PCR smeši od 0,25 pmol/ $\mu$ l. Konačna koncentracija dNTP (*Thermo Scientific, USA*) iznosila

je 0,4 mM. *Taq* polimeraza (*Thermo Scientific, USA*) je dodavana u količini od 0,5 µl. Program na kom je izvođena PCR reakcija je obuhvatao: inicijalnu denaturaciju na temperaturi od 95 °C, 7 minuta praćenu sa 25 ciklusa denaturacije templata na temperaturama 95 °C, 35 sekundi, annealing na 64 °C, 45 sekundi i ekstenzija prajmera na 72 °C, 180 sekundi, a zatim finalna ekstenzija na 72 °C, 6 minuta. Vizuelizacija dobijenih PCR produkata, vršena je primenom metode horizontalne elektroforeze u agaroznom gelu koncentracije 1% (*Serva, Germany*) sa dodatkom boje Midori Green DNA Stain (*NIPPON Genetics EUROPE GmbH*) u finalnoj koncentraciji od 1%.

Kao pozitivne kontrole korišćene su DNK ekstrahovane iz referentnog soja *B. canis* RM 6/66, izolata *B. canis* SR-1 i *B. suis* WS 1 potvrđene u referentnoj laboratoriji (AFFSA, France), a kao marker DNK primenjen je Mass ruler DNK 100 bp ladder (*Thermo Scientific, USA*). Pozitivnim je smatrana pojava šest (odsustvo trake dužine 794 bp), odnosno sedam traka sledećih dužina: 1682, 1071, 794, 587, 450, 272 i 152 bp. U Tabeli 2. navedeni su prajmeri korišćeni u Bruce-ladder multipleks PCR metodi.

Tabela 2. Prajmeri korišćeni u Bruce-ladder multiplex PCR metodi

Prajmeri	Sekvenca	Ciljni gen DNK
BMEI0998f BMEI0997r	ATC CTA TTG CCC CGA TAA GG GCT TCG CAT TTT CAC TGT AGC	Glikoziltransferaza, gen <i>wbo A</i>
BMEI0535f BMEI0536r	GCG CAT TCT TCG GTT ATG AA CGC AGG CGA AAA CAG CTA TAA	Imunodominantni antigen, gen <i>bp26</i>
BMEII0843f BMEII0844r	TTT ACA CAG GCA ATC CAG CA GCG TCC AGT TGT TGT TGA TG	Protein spoljašnje membrane, gen <i>omp31</i>
BMEI1436f BMEI1435r	ACG CAG ACG ACC TTC GGT AT TTT ATC CAT CGC CCT GTC AC	Polisaharidna deacetilaza
BMEII0428f BMEII0428r	GCC GCT ATT ATG TGG ACT GG AAT GAC TTC ACG GTC GTT CG	Gen za katabolizam eritritola gen <i>ery C</i> (Deritruuloza-1- fosfatdehidrogenaza)
BR0953f BR0953r	GGA ACA CTA CGC CAC CTT GT GAT GGA GCA AAC GCT GAA G	Protein koji se vezuje za ABC nosač
BMEI0752f BMEI0752r	CAG GCA AAC CCT CAG AAG C GAT GTG GTA ACG CAC ACC AA	Ribozomalni protein S12, gen <i>rps L</i>
BMEII0987f BMEII0987r	CGC AGA CAG TGA CCA TCA AA GTA TTC AGC CCC CGT TAC CT	Regulator transkripcije, CRP familija

#### 4.8. Priprema antigena za izvođenje ELISA testa

Za pripremu antigena korišćen je referentni soj *B.canis* RM 6/66. Bakterije su uzgajane na triptoznom agaru koji je razlivan u bakteriološke epruvete (kosi agar) i Roux boce koje su inkubirane 48 h na 37 °C radi provere sterilnosti. Posle 24 h inkubacije na kosom agaru, bakterije su spirane sterilnim fiziološkim rastvorom i zatim presejavane u Roux boce; nakon 24 h inkubiranja na 37 °C bakterijski porast spiran je sterilnim fiziološkim rastvorom. Nakon spiranja bakterijska suspenzija je tri puta isprana sterilnim fiziološkim rastvorom centrifugovanjem na 2000xg u trajanju 30 minuta.

Jedan deo tako dobijenog bakterijskog taloga je resuspendovan u sterilnoj destilovanoj vodi (2,1 g *B. canis* u 10 ml sterilne destilovane vode) i autoklaviran na temperaturi od 121 °C u trajanju 30 minuta pod pritiskom jedne atmosfere i na ovaj način dobijen je antigen ekstrahovan toplotom (T Ag).

Drugi deo bakterijskog taloga je resuspendovan u sterilnoj destilovanoj vodi (6,91 g *B. canis* u 21 ml sterilne destilovane vode), a zatim dezintegrisan ultrazvukom uz pomoć aparata Bandelin Sonoplus HD 2070 u trajanju 30 minuta (snaga 70 w, kapacitet 70 %). Na opisani način dobijen je antigen ekstrahovan ultrazvukom (UZ Ag). Oba antigena su zatim centrifugirana 30 minuta na 10000xg, a potom je supernatant odvojen i dijalizovan u destilovanoj vodi 48 časova na 4 °C uz stalno mešanje na magnetnoj mešalici. Za ovaj proces korišćena su celulozna creva veličine pora 6000 do 8000 Da (*ZelluTrans, Roth, Germany*).

##### 4.8.1. Određivanje koncentracije proteina

Koncentracija proteina u antigenima dobijenim toplotnom ekstrakcijom i ultrazvučnom dezintegracijom *B. canis* određena je spektrofotometrijskom metodom po Lowry-u ([www.ruf.rice.edu](http://www.ruf.rice.edu)) (CECIL CE 2021). Za konstruisanje kalibracione krive korišćen je standard BSA (*Bovine serum albumine*) koncentracije 1 mg/ml.

Koncentracija proteina u uzorcima antigena određena je iz jednačine prave:  $y=0,07527+0,46485x$ .

#### 4.8.2. Elektroforetska analiza antigena

Elektroforetsko razdvajanje proteina izvedeno je u reduktivnim uslovima na 12,5% poliakrilamidnom gelu u TRIS-glicinskom puferu u prisustvu SDS (Laemmli, 1970) (MINI VE HOEFFER, LKB, 2117, *Bromma, Uppsala Sweden*). Elektroforeza je izvođena u trajanju od 30 minuta pri naponu struje od 80 V, a zatim 60 minuta na 200 V.

Nakon elektroforeze, proteinske trake su fiksirane trihlorsirćetnom i sulfosalicilnom kiselinom, a zatim su gelovi obojeni bojom *Coomassie Brilliant blue R250* (*Sigma-Aldrich, USA*) (Simon, 2001). Denzitometrija proteinskih traka izvršena je upotrebom programskih paketa *TotalLab Tl 120* i *Sci Image 7.0, Origin 6.0*. Rezultati su prikazani u procentima u odnosu na ukupnu koncentraciju proteina određenu po *Lowry-u*.

U cilju određivanja molekulskih masa pojedinih proteinskih frakcija konstruisan je baždarni dijagram zavisnosti logaritma molekulskih masa ( $\log Mr$ ) markera proteina (standard, 10 do 250 kDa) (*Thermo Scientific, USA*) i njihove pokretljivosti na poliakrilamidnom gelu. Izračunavanje je izvršeno na osnovu jednačine prave:  $y=2,11747-1,15413x$ ,  $r=-0,99304$ .

#### 4.8.3. Priprema uzoraka za elektroforezu

Uzorci antigena dobijenih toplotnom ekstrakcijom i ultrazvučnom dezintegracijom *B. canis* pripremljeni su dodatkom pufera za uzorke u odnosu 1:1 v/v i zagrevani na temperaturi od 100 °C u trajanju od 3 minuta.

#### 4.9. ELISA

Optimalna koncentracija antigena, optimalno razređenje seruma i antipsećih antitela konjugovanih enzimom peroksidazom (*Anti-dog IgG whole molecule - Peroxidase antibody produces in rabbit, Sigma Aldrich, USA*) određeni su šah titracijom. Testirane su koncentracije antigena od 10 µg/ml, 1 µg/ml, 0,1 µg/ml i 0,01 µg/ml, razređenja pozitivnog seruma od 1/200, 1/400, 1/800 i 1/1600, a razređenja konjugovanih antitela 1/20000 i 1/25000. Kao konačne vrednosti uzete su one kod kojih je očitana najviša vrednost optičke gustine (OD). Kao pozitivna kontrola korišćen je serum sigurno pozitivnog psa iz koga je izolovana *B. canis*.

Kao negativna kontrola korišćeni su serumi zdravih pasa starosti četiri do šest meseci, odnosno pre polne zrelosti. Antigen je nanošen na NUNC (*Nunc-Immuno Plate MaxiSorp Surface, Denmark*) polistirenske ploče sa 96 bunarčića i ravnim dnom. Antigen je razređivan u karbonatnom-bikarbonatnom puferu pH 9,6 (*Sigma-Aldrich, USA*) i nanošen na ploču u količini od 100 µl po bunarčiću.

Ploče sa nanetim antigenom su inkubirane na 4 °C preko noći. Po isteku vremena predviđenog za inkubaciju, ploče su ispirane fosfatnim slanim puferom pH 7,2 sa dodatkom 0,05% Tween 20 (PBS-T). Količina pufera za ispiranje iznosila je 300 µl po bunarčiću, a postupak ispiranja ponovljen je pet puta. Zatim su nevezana mesta u bunarčićima blokirana sa 5% BSA (*Bovine serum albumin, Sigma Aldrich, USA*) u PBS-T u količini od 300 µl po bunarčiću tokom noći na 4 °C. Posle 5 ispiranja PBS-T-om nanošeni su ispitujući serumi. Pre ispitivanja, serumi su tretirani 2-merkaptetanom preko noći na temperaturi frižidera. 2-merkaptetanol je dodavan u količini od 0,7%. U bunarčiće ploča dodavana su razređenja ispitujućih seruma od 1/200 u 1% BSA u PBS-T i u količini od 100 µl. Svi serumi su ispitani u triplikatu. Ploče sa nanetim serumima su inkubirane 1 h na 37 °C. Zatim su ispirane pet puta PBS-T. Nanesena su antipseća antitela obeležena peroksidazom u razređenju 1/25000 u PBS-T i količini od 100 µl po bunarčiću. Posle inkubacije 1 h na 37 °C i ispiranja, u bunarčiće ploče je nanošen supstrat TMB u količini od 50 µl po bunarčiću. Nakon inkubacije od 15 minuta na sobnoj temperaturi, zaštićena od svetla, reakcija je blokirana dodavanjem 2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> u količini od 50 µl po bunarčiću.

Reakcija, odnosno optička gustina je očitavana na aparatu Multiskan Thermo Scientific na 450 nm (*Thermo Fisher Scientific, USA*).

Granična vrednost-*cut off* određivana je na osnovu formule :

$cut\ off = \bar{X} + 3SD$ , pri čemu je:

$\bar{X}$  - srednja vrednost optičke gustine 30 negativnih seruma

SD – standardna devijacija

Koeficijent varijacije (CV) izračunat je na sledeći način:

$CV = \frac{SD}{\bar{X}} \times 100$ , pri čemu je:

$\bar{X}$  - srednja vrednost negativnog seruma koji je testiran u triplikatu u sedam ELISA testova, tj. sedam ponavljanja

Svi uzorci koji su imali vrednost optičke gustine u intervalu vrednosti  $cut\ off \pm CV$  su ponovo testirani.

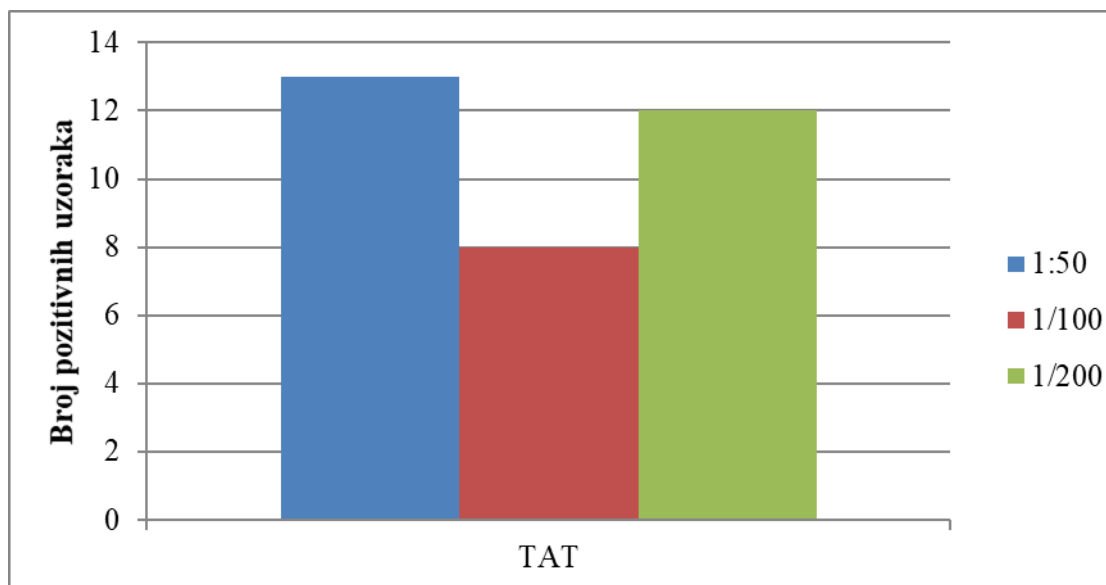
#### **4.10. Statistička obrada rezultata**

Rezultati su statistički obrađeni u programu IBM SPSS Statistics 21. Za analizu dobijenih rezultata upotrebljene su deskriptivne statističke metode (srednja vrednost, standardna devijacija, koeficijent varijacije). Za ispitivanje usaglašenosti primenjenih dijagnostičkih testova, kao i određivanje specifičnosti i osetljivosti testova korišćena je *Kappa* statistička analiza i McNemar test za interval pouzdanosti od 95%. Analiza sopstveno pripremljenih indirektnih ELISA testova sa dva različito pripremljena antigena izvršena je pomoću ROC (*Receiver operating characteristic curve*) analize i određivanjem površine ispod krive AUC (*Area Under the Curve*).

## 5. REZULTATI

### 5.1. Rezultati dobijeni metodom spore serumske aglutinacije sa 2-merkaptetanolom

Metodom spore serumske aglutinacije sa 2-merkaptetanolom ispitano je 225 krvnih seruma pasa. Krvni serumi su testirani u razređenjima od 1/50, 1/100 i 1/200. Rezultati spore serumske aglutinacije prikazani su na grafikonu 1 i u tabeli 3.



Grafikon 1. Rezultati testa spore serumske aglutinacije sa 2-merkaptetanolom



Tabela 3. Prikaz dobijenih rezultata metodom spore serumske aglutinacije sa 2-merkaptotoetanolum

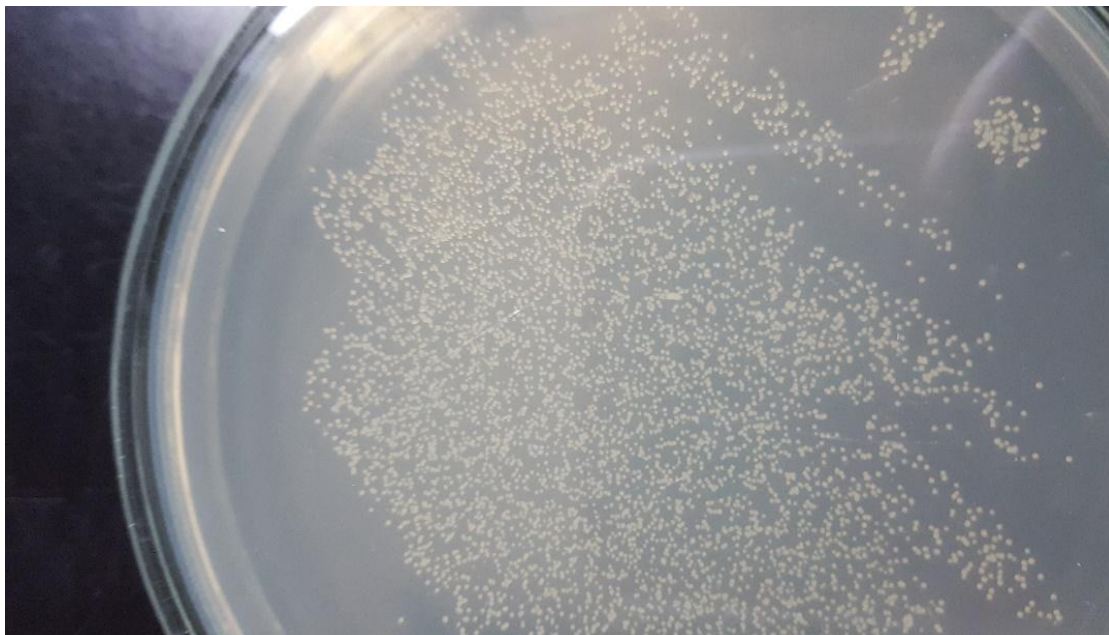
2-ME TAT	
Titar 1/50	13 (5,78%)
Titar 1/100	8 (3,55%)
Titar 1/200	12 (5,33%)
Negativni	192 (85,33%)
Ukupan broj ispitanih seruma	225 (100%)

Od ukupno 225 uzoraka, 33 ili 14,67% krvnih seruma je bilo pozitivno u testu spore serumske aglutinacije sa 2-merkaptotoetanolum. Titar antitela protiv *B. canis* 1/200 je ustanovljen kod 12 krvnih seruma, odnosno 5,33%. Osam krvnih seruma (3,55%) imalo je titar 1/100, a 13 krvnih seruma (5,78%) titar 1/50.

## 5.2. Rezultati dobijeni primenom klasičnih bakterioloških metoda

*B. canis* izolovana je iz tri uzorka (1,33%) homogenizovanih reproduktivnih organa pasa, i to iz dva uzorka poreklom od mužjaka (testisa) i jednog uzorka ženke (uterus). Na slici 1 prikazana je izolovana kultura *B. canis* na triptoznom agaru.

Izolacija je vršena na bifaznom Kastaneda medijumu u Demetrovim bocama. Kulture su inkubirane u aerobnim uslovima na 37 °C tokom 10 dana. Kolonije su se pojavljivale u proseku trećeg dana. Nakon toga, odgovarajuće kolonije su pikirane i presejavane na triptozni agar i inkubirane u aerobnim uslovima na 37 °C do porasta kolonija. Verovatna pripadnost rodu i vrsti je vršena uz pomoć standardnih biohemijskih testova.

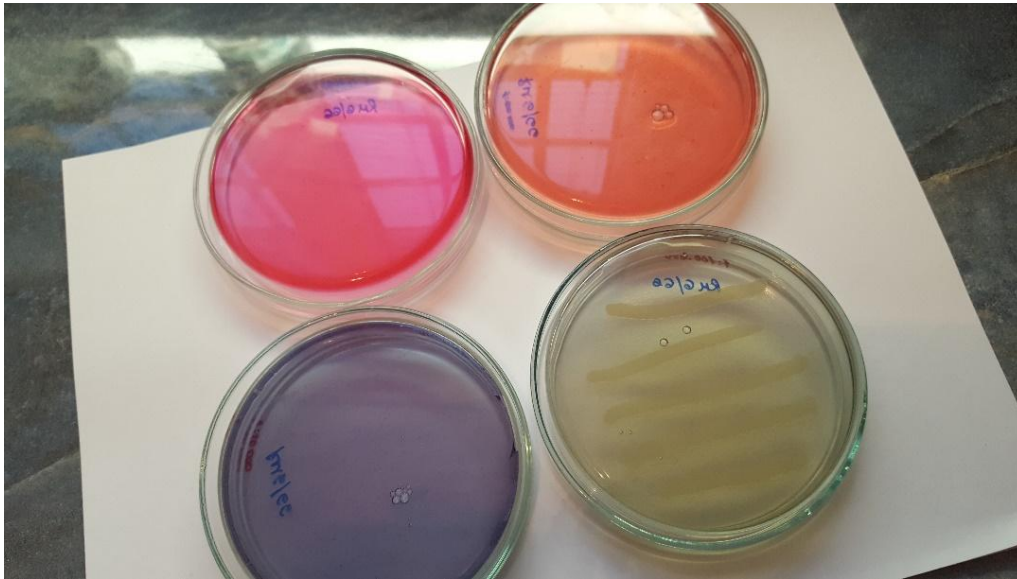


Slika 1. Izolovana kultura *B. canis* na triptoznom agaru

Izolovane kolonije morfološki su odgovarale kolonijama *Brucella* spp.: sitne, konveksne, sjajne, boje meda. Mikroskopskim pregledom ustanovljeni su Gram negativni sitni kokobacili. Izolovane bakterije su se aglutinovale u rastvoru akriflavina, pokazivale su pozitivni katalaza test, hidrolizovale su ureu za 15 minuta i nisu stvarale H<sub>2</sub>S. Suspenzija izolovanih kolonija davala je potpunu sitnozrnastu aglutinaciju sa sigurno pozitivnim serumom na *B. canis*.

Kako je za sigurnu identifikaciju brucela neophodno primeniti testove koji nisu dostupni u klasičnim mikrobiološkim laboratorijama (ispitivanje oksidativnog profila, npr.) primenjen je standardni sistem za identifikaciju vrsta bakterija API 20 NE (*bioMerieux, France*), a sva tri izolata su dala profil bakterije *Moraxella phenylpyruvica* što upućuje na *Brucella* spp.

Sve izolovane bakterije su u testu rezistencije na boje (Slika 2) bile osetljive na tionin i bazni fuksin u koncentraciji od 1:50000, i rezistentne na tionin i bazni fuksin u koncentraciji od 1:100000 (Tabela 4).



Slika 2. Test rezistencije na boje

Kao pozitivne kontrole tokom izolacije i tipizacije, paralelno su ispitivani referentni soj *B. canis* RM 6/66 i izolat *B. canis* SR-1. *B. canis* SR-1 je Gram negativan, oksidaza i ureaza pozitivan, H<sub>2</sub>S negativan kokobacil sa R tipom kolonija, osetljiv na tionin u koncentraciji 1:50000 i rezistentan na bazni fuksin u obe koncentracije. Referentni soj *B. canis* RM 6/66 je pokazao osetljivost i na tionin i na bazni fuksin u koncentraciji od 1:50000, dok je u koncentraciji od 1:100000 osetljiv na bazni fuksin i rezistentan na tionin; dobijeni rezultati su prikazani u tabeli 4.

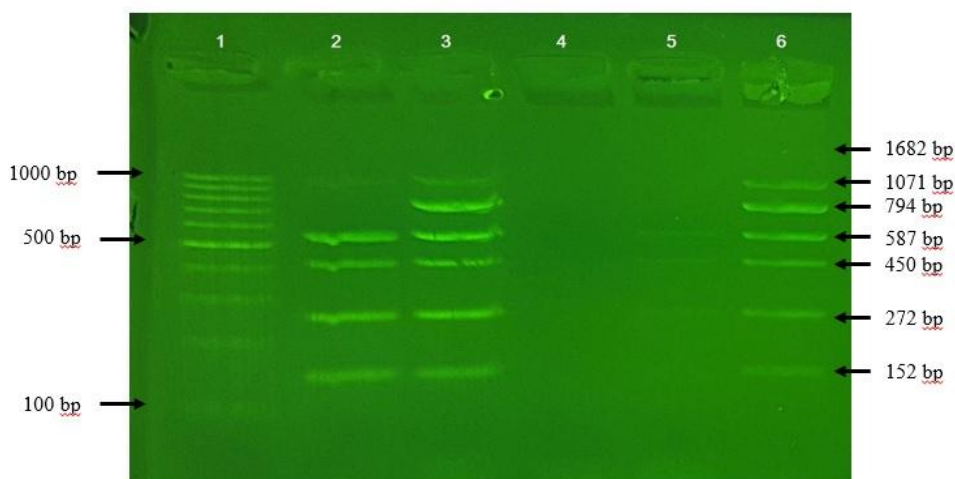
Tabela 4. Prikaz rezultata testa rezistencije na boje

<i>B. canis</i>	Bazni fuksin		Tionin	
	1/50000	1/100000	1/50000	1/100000
Izolat 1	–	+	–	+
Izolat 2	–	+	–	+
Izolat 3	–	+	–	+
RM 6/66	–	–	–	+
<i>B. canis</i> SR-1	+	+	–	+

Dobijeni rezultati testa rezistencije na boje pokazuju da se izolovani sojevi *B. canis* razlikuju u odnosu na referentni soj RM 6/66 i ranije izolovani soj SR-1 što može da bude važan epizootiološki marker na osnovu koga je moguće ustanoviti poreklo, odnosno izvor infekcije.

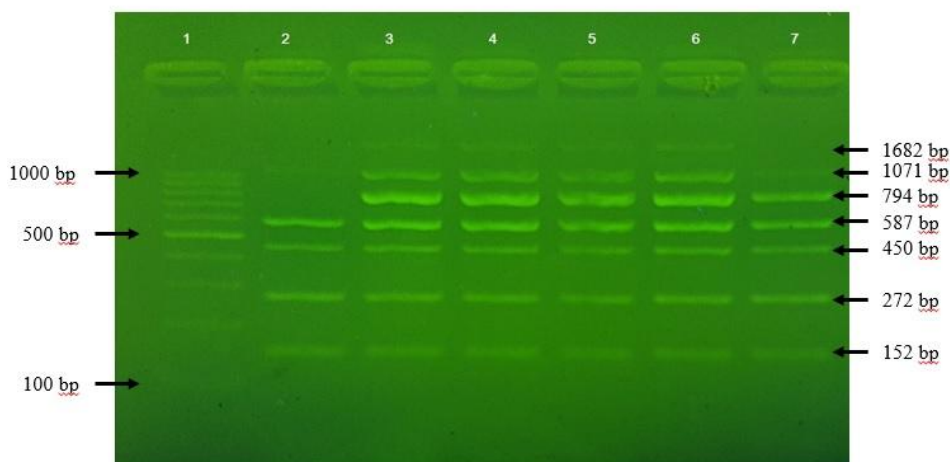
### 5.3. Rezultati dobijeni primenom Bruce-ladder multiplex PCR metode

Svih 225 uzoraka homogenizovanih organa ispitano je Bruce-ladder multiplex PCR metodom. Dobijena su dva PCR pozitivna uzorka (0,88%). I kod pozitivnih uzoraka i kod pozitivnih kontrola (*B. suis* i *B. canis* SR-1) pojavilo se sedam amplikona 1682, 1071, 794, 587, 450, 272 i 152 bp (Slika 3). Ovakav profil odgovara *B. suis* što autori López-Goñi i sar. (2008) navode kao nedostatak metode, imajući u vidu da se neki izolati *B. canis* deklarišu kao *B. suis*. Referentni soj *B. canis* RM 6/66 pokazao je odsustvo fragmenta veličine 794 bp i njegov profil se na osnovu Bruce-ladder multiplex PCR metode uklapa u profil *B. canis*. Na slici 3. prikazan je izgled gela obojenog midori green bojom na trans iluminatoru (*Vilber Lourmat, Nemačka*).



Slika 3. Multipleks PCR amplikoni *B. canis* poreklom iz homogenizovanih organa: 1- DNK marker 100 bp, 2-referentni soj *B. canis* RM 6/66, 3-*B. suis* WS 1 izolovana iz svinje, 4-negativna kontrola, 5 i 6-DNK *B. canis* ekstrahovana iz reproduktivnih organa pasa.

Ispitana je i DNK izolovanih sojeva *B. canis*. Sva tri uzorka su dala pozitivnu PCR reakciju sa vidljivih sedam amplikona 1682, 1071, 794, 587, 450, 272 i 152 bp (Slika 4), odnosno prisutan je fragment od 794 bp što odgovara profilu *B. suis*.

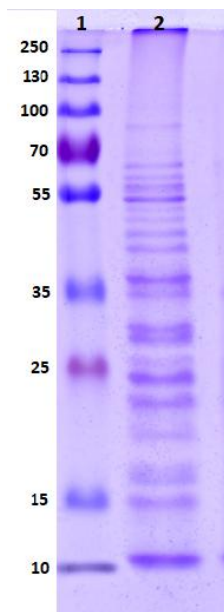


Slika 4. Multipleks PCR amplikoni izolovanih sojeva *B. canis*: 1-DNK marker 100 bp, 2-referentni soj *B. canis* RM 6/66, traka 3-*B. suis* WS 1 izolovana iz svinje, 4-*B. canis* SR-1, 5, 6 i 7-*B. canis* izolovani sojevi iz reproduktivnih organa pasa.

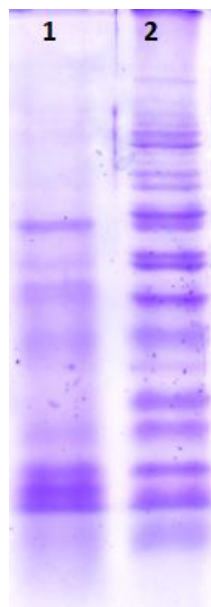
#### 5.4. Elektroforetska analiza antigena korišćenih za formulaciju indirektnog ELISA testa

Koncentracija proteina određena spektrofotometrijski metodom po *Lowry*-u u antigenu dobijenom toplotom iznosila je 0,606 mg/ml, a u antigenu dobijenom ultrazvukom 0,561 mg/ml.

Antigeni dobijeni toplotnom ekstrakcijom i ultrazvučnom dezintegracijom *B. canis* analizirani su metodom SDS-PAGE (SDS-PAGE - sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) na 12,5% akrilamidnom gelu, a dobijeni rezultati prikazani su na slikama 5 i 6.

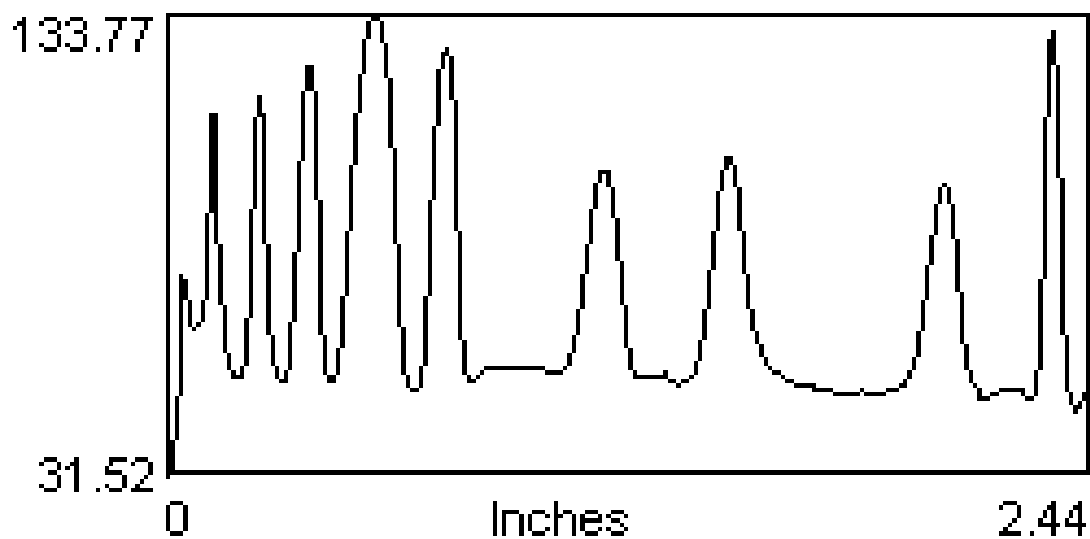


Slika 5. SDS-PAGE na 12,5% poliakrilamidnom gelu, obojen *Coomassie Brilliant blue*; 1-standard molekulskih masa izražen u kDa, 2-antigen dobijen ultrazvučnom dezintegracijom *B. canis*

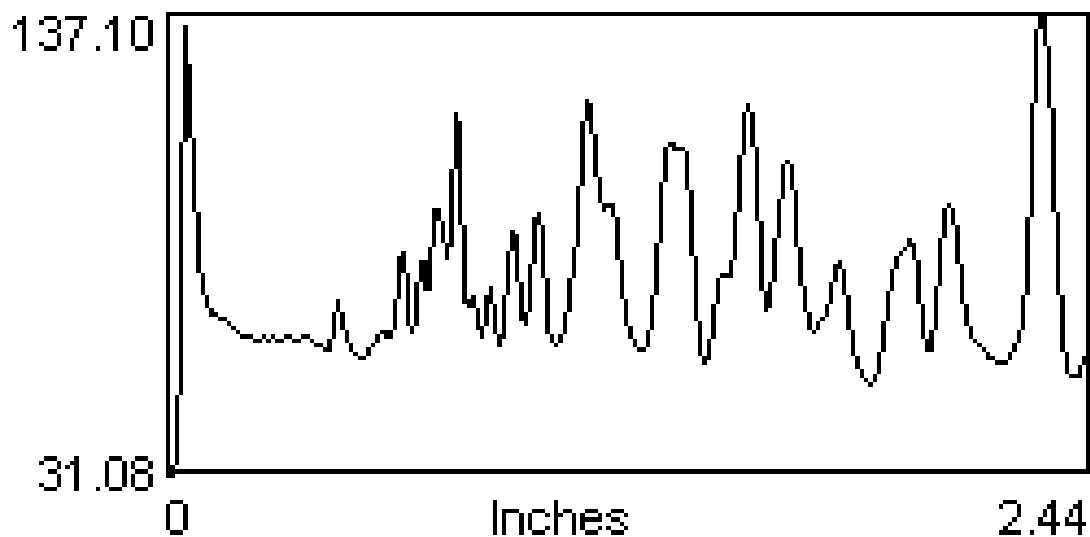


Slika 6. SDS-PAGE na 12,5% poliakrilamidnom gelu, obojen *Coomassie Brillant blue*; 1-antigen dobijen toplotnom ekstrakcijom, 2-antigen dobijen ultrazvučnom dezintegracijom *B. canis*.

Denzitometrijska analiza pojedinih proteinskih traka prikazana je grafički i tabelarno (Grafikoni 2, 3 i 4; Tabele 5 i 6).



Grafikon 2. Denzitogram proteinskih traka- standard

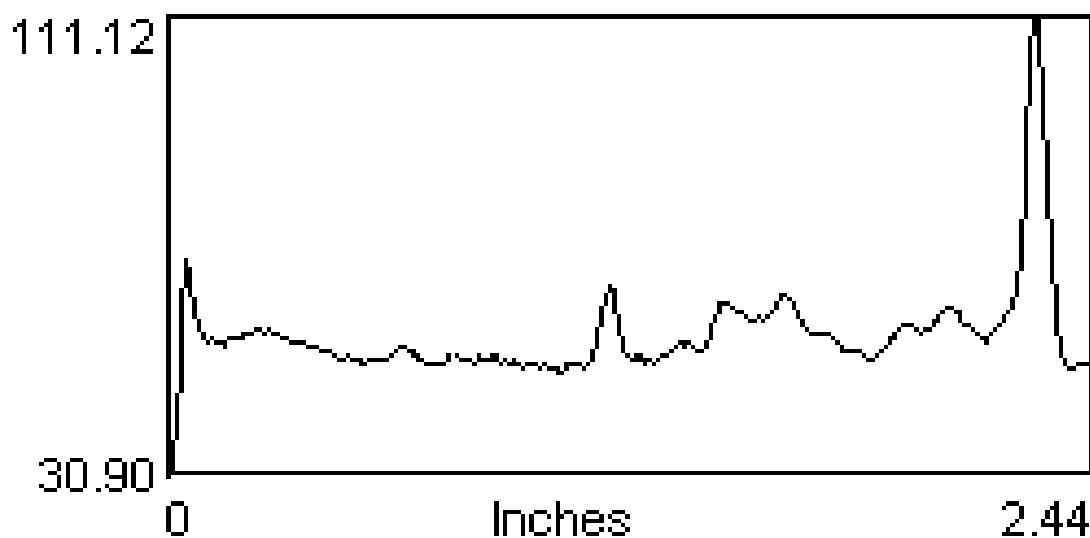


Grafikon 3. Denzitogram proteinskih traka - antigen dobijen ultrazvučnom dezintegracijom

Tabela 5. Denzitometrijska analiza proteinskih traka antigena dobijenog ultrazvučnom dezintegracijom

Molekulske mase proteinskih traka i njihova procentualna zastupljenost u antigenu dobijenom ultrazvučnom dezintegracijom <i>B. canis</i>		
	Molekulska masa (kDa)	Zastupljenost (%)
1.	9,41	0,17
2.	<b>10,95</b>	<b>11,56</b>
3.	14,1	6,28
4.	15,59	5,55
5.	19,03	3,60
6.	<b>21,97</b>	<b>7,85</b>
7.	<b>24,5</b>	<b>9,20</b>
8.	26,39	1,53
9.	<b>30,47</b>	<b>10,62</b>
10.	35,74	4,20
11.	<b>38,19</b>	<b>7,97</b>
12.	43,73	2,75
13.	47,11	2,02
14.	49,95	0,79
15.	52,53	0,82
16.	54,82	4,10
17.	58,12	3,39
18.	60,64	1,23
19.	63,78	1,71
20.	67,62	0,49
21.	76,01	0,86
22.	83,42	0,54
23.	93,77	0,79
24.	>250	12,00





Grafikon 4. Densitogram proteinskih traka - antigen dobijen toplotnom ekstrakcijom

Tabela 6. Densitometrijska analiza proteinskih traka antigena dobijenog toplotnom ekstrakcijom

Molekulske mase proteinskih traka i njihova procentualna zastupljenost u antigenu dobijenom toplotnom ekstrakcijom		
	Molekulska masa (kDa)	Zastupljenost (%)
1.	<b>10,95</b>	<b>43,12</b>
2.	<b>14,1</b>	<b>6,45</b>
3.	<b>15,59</b>	<b>6,46</b>
4.	21,97	6,00
5.	24,5	6,12
6.	38,19	6,20
7.	35,74	4,46
8.	54,82	4,18
9.	<b>76,01</b>	<b>7,41</b>
10.	>250	10

Iz prikazanih tabela 5 i 6 se vidi da je u antigenu dobijenom toplotnom ekstrakcijom najzastupljenija frakcija molekulske mase 10,95 kDa sa učešćem od čak 43,12% koja po navodima u literaturi odgovara R-LPS-u. Ista frakcija je u antigenu dobijenom ultrazvučnom dezintegracijom zastupljena sa 11,56%, što je 3,7 puta manje u odnosu na antigen dobijen toplotnom ekstrakcijom. Proteinski sastav antigena dobijenog ultrazvučnom dezintegracijom je značajno bogatiji, a po kvantitetu dominiraju proteini molekulske mase od 30,5, 24,5, 38 i 22 kDa.

## 5.5. Rezultati dobijeni primenom ELISA testa

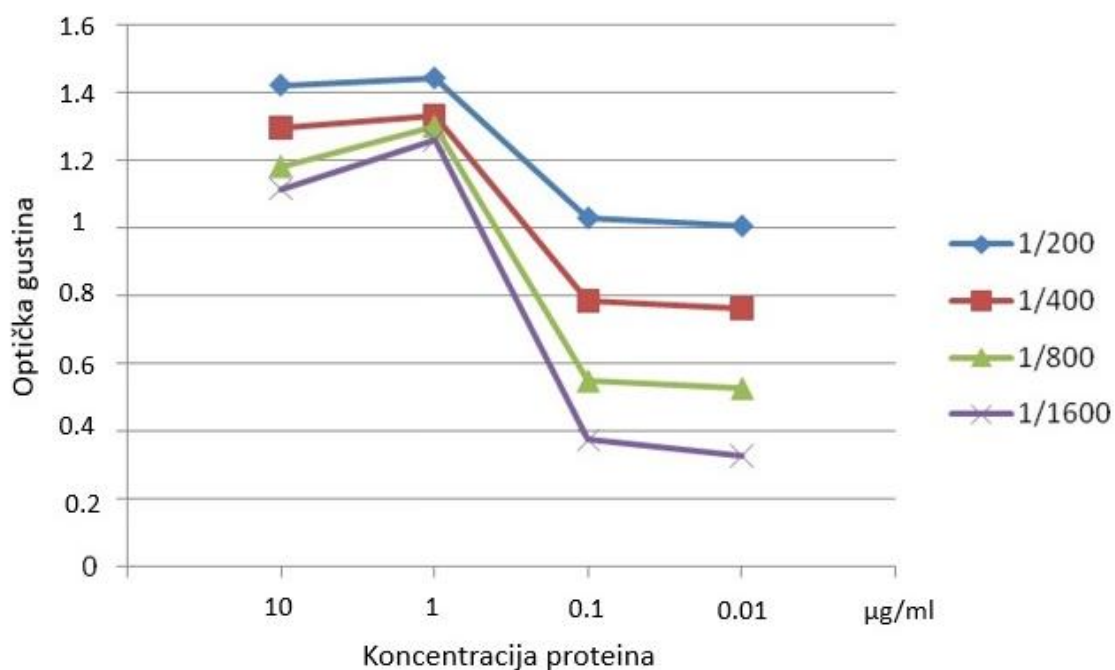
5.5.1. Rezultati primene “šah titracije” u cilju optimizovanja ELISA testa: određivanja optimalne koncentracije antigena, optimalnih razblaženja ispitujućih seruma i optimalne koncentracije sekundarnog antitela konjugovanog peroksidazom

Šah titracijom određena je optimalna koncentracija antigena, a ispitane su četiri različite koncentracije: 10 µg/ml, 1 µg/ml, 0,1 µg/ml i 0,01 µg/ml. Šah titracija je rađena sa sigurno pozitivnim serumom dobijenim od psa iz koga je izolovana *B. canis*. Ispitana razređenja seruma iznosila su 1/200, 1/400, 1/800 i 1/1600, a razređenja konjugovanih antitela 1/20000 i 1/25000.

Kao konačne vrednosti uzete su one kod kojih je očitana najviša vrednost optičke gustine (OD). Referentni serum je za svako razređenje i koncentraciju antigena ispitan u tri ponavljanja. Šah titracijom je utvrđeno da je za upotrebu ELISA testa optimalna koncentracija antigena dobijenih primenom obe metode (toplotna ekstrakcija i ultrazvučna dezintegracija *B. canis*) iznosila 1 µg/ml (Tabele 7 i 8).

Optimalno razređenje pozitivnog seruma iznosilo je 1/200, a optimalno razređenje konjugovanih antitela iznosilo je 1/25000.

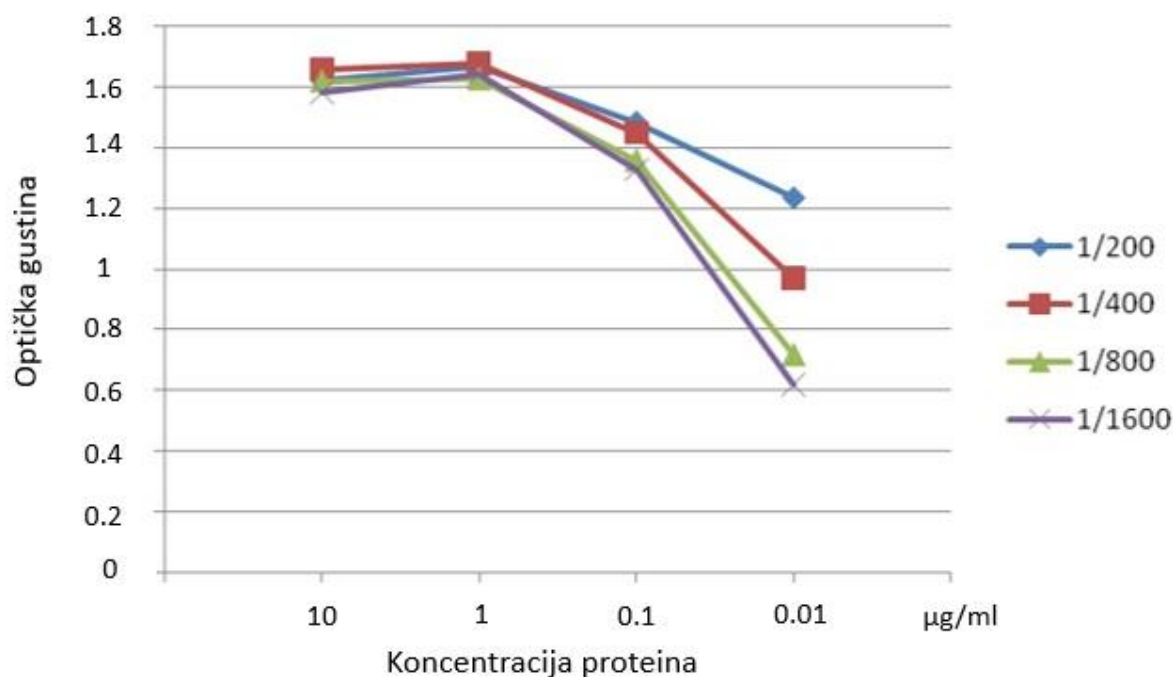
Rezultati šah titracije za ELISA test formulisan sa antigenom dobijenim toplotnom ekstrakcijom i ultrazvučnom dezintegracijom *B. canis* kao i vrednosti osnovnih statističkih parametara prikazani su u grafikonima 5 i 6 i tabelama 7 i 8. .



Grafikon 5. Rezultati određivanja koncentracije antigena dobijenog toplotnom ekstrakcijom

Tabela 7. Vrednosti statističkih parametara za različite koncentracije proteina korišćenih u šah titraciji - antigen dobijen toplotnom ekstrakcijom

	Minimalna vrednost	Maksimalna vrednost	Srednja vrednost	Standardna devijacija
10 µg/ml	0,95	1,54	1,2524	0,17838
1 µg/ml	1,14	1,54	1,3329	0,13373
0,1 µg/ml	0,29	1,18	0,6847	0,28568
0,01 µg/ml	0,26	1,18	0,6558	0,29060



Grafikon 6. Rezultati određivanja koncentracije antigena dobijenog ultrazvučnom dezintegracijom

Tabela 8. Vrednosti statističkih parametara za različite koncentracije proteina korišćenih u šah titraciji -antigen dobijen ultrazvučnom dezintegracijom

	Minimalna vrednost	Maksimalna vrednost	Srednja vrednost	Standardna devijacija
10 µg/ml	1,43	1,76	1,6203	0,07803
1 µg/ml	1,56	1,78	1,6528	0,07778
0,1 µg/ml	1,21	1,57	1,4037	0,12225
0,01 µg/ml	0,43	1,40	0,8856	0,30333

Granične vrednosti (*cut off*) za indirektni ELISA test formulisan sa dva različito pripremljena antigena, određene su na osnovu optičke gustine 30 negativnih seruma od zdravih pasa koji su ispitani u tri ponavljanja (Tabele 9 i 11). Granična vrednost izračunavana je po formuli opisanoj u poglavlju Materijal i metode i predstavlja zbir srednje vrednosti optičke gustine negativnih seruma i vrednosti tri standardne devijacije. Koeficijent varijacije izračunat je na osnovu sigurno negativnog seruma koji je ponovljen kroz sedam ELISA testova, svaki put u tri ponavljanja (Tabela 10 i 12).

Tabela 9. Vrednosti statističkih parametara optičke gustine 30 negativnih seruma - antigen dobijen toplotnom ekstrakcijom (T Ag)

T Ag (negativni serumi)	Opseg	Minimalna vrednost	Maksimalna vrednost	Srednja vrednost	Standardna greška	Standardna devijacija	Varijansa
Optička gustina	0,27	0,08	0,35	0,1987	0,01117	0,06119	0,004

Tabela 10. Vrednosti statističkih parametara negativnog seruma - antigen dobijen toplotnom ekstrakcijom

T Ag negativan	Broj proba	Minimalna vrednost	Maksimalna vrednost	Srednja vrednost	Standardna greška
	7	0,09	0,17	0,1286	0,03671

Tabela 11. Vrednosti statističkih parametara optičke gustine 30 negativnih seruma – antigen dobijen ultrazvučnom dezintegracijom (UZ Ag)

UZ Ag (negativni serumi)	Opseg	Minimalna vrednost	Maksimalna vrednost	Srednja vrednost	Standardna greška	Standardna devijacija	Varijansa
Optička gustina	0,38	0,11	0,49	0,3070	0,01871	0,10245	0,010

Tabela 12. Vrednosti statističkih parametara negativnog seruma - antigen dobijen ultrazvučnom dezintegracijom

UZ Ag	Broj proba	Minimalna vrednost	Maksimalna vrednost	Srednja vrednost	Standardna devijacija
negativan	7	0,14	0,30	0,1884	0,05389

#### 5.5.2. Rezultati ELISA testa sa antigenom dobijenim toplotnom ekstrakcijom

Srednja vrednost optičke gustine negativnih seruma iznosila je 0,1987, standardna devijacija 0,06119, a koeficijent varijacije 28,5%. Dobijena granična vrednost je iznosila  $0,382 \pm 0,18$ , odnosno kretala se u intervalu od 0,202 do 0,562. Serumi sa vrednostima optičke gustine u ovom intervalu su ponovo testirani. Oni serumi čija je vrednost optičke gustine bila viša od 0,382 označavani su kao pozitivni. Od 225 ispitanih seruma, 44 (19,55%) je bilo pozitivno.

5.5.3. Rezultati ELISA testa sa antigenom dobijenim ultrazvučnom dezintegracijom *B. canis*

Srednja vrednost optičke gustine negativnih seruma iznosila je 0,307, standardna devijacija 0,10245, a koeficijent varijacije 28,6%. Dobijena granična vrednost bila je  $0,614 \pm 0,30$ , odnosno u intervalu 0,314 do 0,914. Serumi sa vrednostima optičke gustine u ovom intervalu su ponovo testirani. Oni serumi čija je vrednost optičke gustine bila viša od 0,614 označavani su kao pozitivni. Od 225 ispitanih seruma, 37 (16,44%) je bilo pozitivno.

## 5.6. Uporedni prikaz rezultata dobijenih svim primenjenim metodama

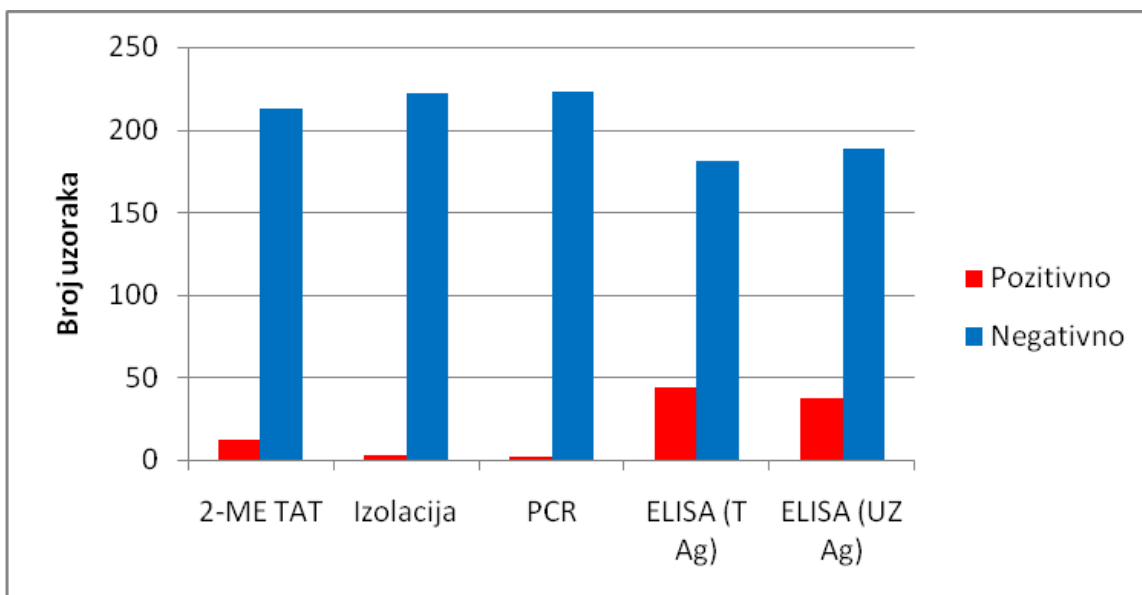
Uporedni prikaz rezultata dobijenih primenom različitih testova prikazan je u Tabeli 13 i Grafikonu 7.

Tabela 13. – Uporedni prikaz rezultata

Rezultat	2-ME TAT	Izolacija	PCR	ELISA (T Ag)	ELISA (UZ Ag)
Pozitivno broj/%	12/5,33	3/1,33	2/0,88	44/19,55	37/16,44
Negativno broj/%	213/94,67	222/98,67	223/99,12	181/80,45	188/83,56

Iz tabele 13 može se uočiti da je najveći broj pozitivnih uzoraka bio otkriven primenom metode ELISA uz korišćenje antigena dobijenog toplotnom ekstrakcijom. Ukupno su detektovana 44 pozitivna uzorka tj. 19,55%. Slično tome, primenom ELISA testa uz korišćenje antigena dobijenog ultrazvučnom dezintegracijom, detektovano je 37 pozitivnih uzoraka, odnosno 16,44%.

Najmanji broj pozitivnih uzoraka reproduktivnih organa detektovan je primenom metode PCR, samo dva uzorka, tj. 0,88%. Slično tome, izolacija i identifikacija *B. canis* pokazala se kao relativno neadekvatna metoda jer je *B. canis* uspešno izolovana iz samo tri uzorka reproduktivnih organa (1,33%).



Grafikon 7. Uporedni prikaz rezultata dobijenih primenom različitih testova



## 5.7. Rezultati statističke obrade podataka - *Kappa* statistička analiza, McNemar test i ROC analiza

*Kappa* statistička analiza koristi se u slučajevima kada dijagnostički protokoli nisu određeni, a nedostaje i saglasnost o najboljem testu. Zbog različite pouzdanosti, *Kappa* statistička analiza se koristi i kada se ne može objektivno oceniti osetljivost i specifičnost testova. Saglasnost se ocenjuje po sledećem ključu:

$K > 0.81$  - idealna podudarnost

$K 0.81-0.60$  - skoro idealna podudarnost

$K 0.41-0.60$  – prilična podudarnost

$K 0.21-0.40$  - srednja ili umerena podudarnost

$K < 0.20$  - beznačajna podudarnost

*Kappa* statističkom analizom određena je podudarnost, odnosno usaglašenost između primenjenih dijagnostičkih testova (Tabele 14, 17 i 20). Spora serumska aglutinacija sa 2-merkaptetanolom (titar 1/200) je služila kao referentni test.

Tabela 14. Prikaz rezultata 2-ME TAT i izolacije

		2-ME TAT (1/200) i izolacija			
		2-ME TAT		Ukupno	
		Negativni	Pozitivni		
Izolacija	Negativni	Zbir	212	10	222
		% Izolacija	95,5	4,5	100,0
		% 2-ME TAT	99,5	83,3	98,7
	Pozitivni	Zbir	1	2	3
		% Izolacija	33,3	66,7	100,0
		% 2-ME TAT	0,5	16,7	1,3
Ukupno		Zbir	213	12	225
		% Izolacija	94,7	5,3	100,0
		% 2-ME TAT	100,0	100,0	100,0

Iz priložene tabele 14 se vidi da osetljivost bakteriološke izolacije iznosi 16,7%, a specifičnost 99,5%.

Tabela 15. Vrednost *Kappa* saglasnosti između 2-ME TAT i izolacije

	Vrednost	Standardna greška	<i>p</i> vrednost
<i>Kappa</i> saglasnost	0,251	0,149	0,000
Broj uzoraka	225		

U priloženoj tabeli 15 može se videti da je dobijena *Kappa* vrednost 2-ME TAT i bakterijske izolacije 0,251, što prema podacima koje su objavili Viera i Garret (2005) ukazuje na „dovoljnu“ saglasnost, odnosno srednju ili umerenu podudarnost.

Tabela 16. *Chi*-kvadrat test – 2-ME TAT i izolacija

	Vrednost	<i>p</i> vrednost
<i>McNemar</i> test		0,012
Broj uzoraka	225	

Primenom *McNemar* testa ustanovljena je statistički značajna razlika između dva dijagnostička testa ( $p < 0,05$ ) (Tabela 16).

Tabela 17. Prikaz rezultata 2-ME TAT i PCR

2-ME TAT (1/200) i PCR					
		2-ME TAT		Ukupno	
		Negativni	Pozitivni		
PCR	Negativni	Zbir	212	11	223
		% PCR	95,1	4,9	100,0
		% 2-ME TAT	99,5	91,7	99,1
	Pozitivni	Zbir	1	1	2
		% PCR	50,0	50,0	100,0
		% 2-ME TAT	0,5	8,3	0,9%
Ukupno	Zbir	213	12	225	
	% PCR	94,7	5,3	100,0	
	% 2-ME TAT	100,0	100,0	100,0	

Iz priložene tabele 17 se vidi da osetljivost PCR metode iznosi 8,3%, a specifičnost 99,5%.

Tabela 18. Vrednost *Kappa* saglasnosti između 2-ME TAT i PCR

	Vrednost	Standardna greška	<i>p</i> vrednost
<i>Kappa</i> saglasnost	0,130	0,124	0,005
Broj uzoraka	225		

*Kappa* vrednost između 2-ME TAT i PCR je 0,130, što prema podacima koje su objavili Viera i Garret (2005) ukazuje na „blagu“ saglasnost, odnosno beznačajnu podudarnost (Tabela 18).

Tabela 19. *Chi* – kvadrat test – 2-ME TAT i PCR

	Vrednost	<i>P</i> vrednost
<i>McNemar</i> test		0,006
Broj uzoraka	225	

Primenom McNemar testa utvrđena je statistički značajna razlika između dva dijagnostička testa ( $p < 0,05$ ) (Tabela 19).

Tabela 20. Prikaz rezultata 2-ME TAT i ELISA T Ag

		2-ME TAT (1/200) i ELISA T Ag			
		2-ME TAT		Ukupno	
		Negativni	Pozitivni		
ELISA T Ag	Negativni	Zbir	177	4	181
		% ELISA T Ag	97,8	2,2	100,0
		% 2-ME TAT	83,1	33,3	80,4
	Pozitivni	Zbir	36	8	44
		% ELISA T Ag	81,8	18,2	100,0
		% 2-ME TAT	16,9	66,7	19,6
Ukupno	Zbir	213	12	225	
	% ELISA T Ag	94,7	5,3	100,0	
	% 2-ME TAT	100,0	100,0	100,0	

Iz priložene tabele 20 se vidi da osetljivost ELISA testa sa antigenom dobijenim toplotnom ekstrakcijom iznosi 66,7%, a specifičnost 83,1%.

Tabela 21. Vrednost *Kappa* saglasnosti između 2-ME TAT i ELISA T Ag

	Vrednost	Standardna greška	<i>p</i> vrednost
<i>Kappa</i> saglasnost	0,220	0,076	0,000
Broj uzoraka	225		

*Kappa* vrednost 2-ME TAT i ELISA T Ag (antigen dobijen toplotnom ekstrakcijom) je 0,220, što prema podacima koje su objavili Viera i Garret (2005) ukazuje na „dovoljnu“ saglasnost, odnosno srednju podudarnost (Tabela 21).

Tabela 22. *Chi*-kvadrat test – 2-ME TAT i ELISA T Ag

	Vrednost	<i>p</i> vrednost
<i>McNemar</i> test		0,000
Broj uzoraka	225	

Primenom *McNemar* testa utvrđena je statistički značajna razlika između ovih dijagnostičkih testova ( $p < 0,05$ ) (Tabela 22).

Tabela 23. Prikaz rezultata 2-ME TAT i ELISA UZ Ag

		2-ME TAT (1/200) i ELISA UZ Ag			
		2-ME TAT		Ukupno	
		Negativni	Pozitivni		
ELISA UZ Ag	Negativni	Zbir	184	4	188
		% ELISA UZ Ag	97,9	2,1	100,0
		% 2-ME TAT	86,4	33,3	83,6
	Pozitivni	Zbir	29	8	37
		% ELISA UZ Ag	78,4	21,6	100,0
		% 2-ME TAT	13,6	66,7	16,4
Ukupno		Zbir	213	12	225
		% ELISA UZ Ag	94,7	5,3	100,0
		% 2-ME TAT	100,0	100,0	100,0

Iz priložene tabele 23 se vidi da osetljivost ELISA testa sa antigenom dobijenim ultrazvučnom dezintegracijom iznosi 66,7%, a specifičnost 86,4%.

Tabela 24. Vrednost *Kappa* saglasnosti između 2-ME TAT i ELISA UZ Ag

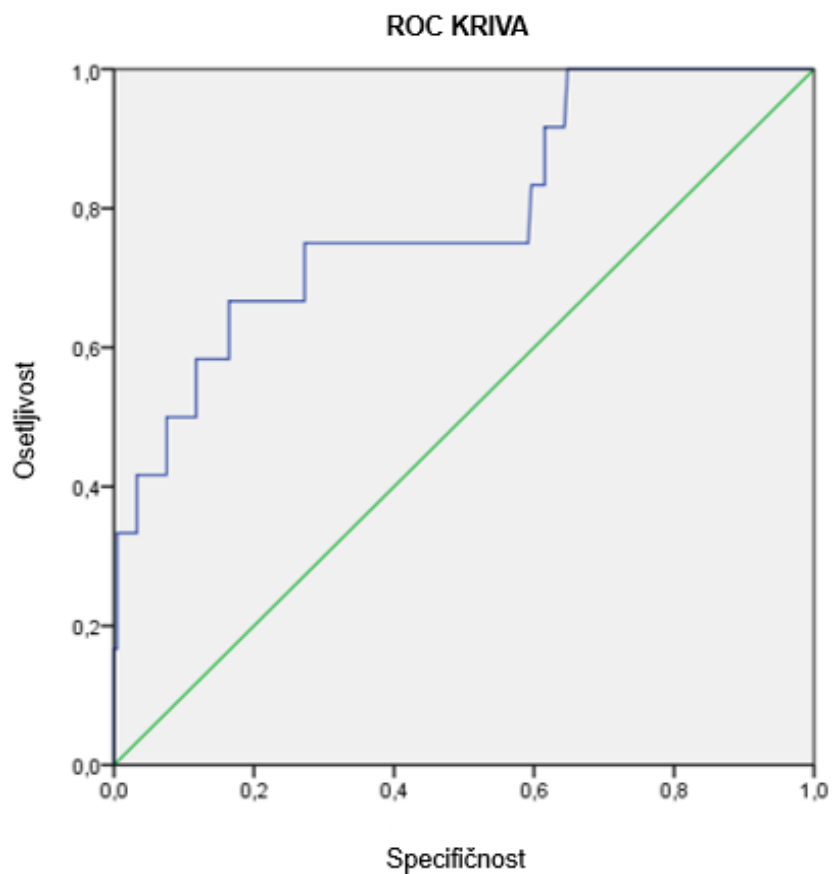
	Vrednost	Standardna greška	<i>p</i> vrednost
<i>Kappa</i> saglasnost	0,268	0,086	0,000
Broj uzoraka	225		

*Kappa* vrednost 2-ME TAT i ELISA testa u kome je korišćen antigen dobijen ultrazvučnom dezintegracijom iznosi 0,268, što prema podacima koje su objavili Viera i Garret (2005) ukazuje na „dovoljnu“ saglasnost, odnosno srednju podudarnost (Tabela 24).

Tabela 25. *Chi*-kvadrat test – 2-ME TAT i ELISA UZ Ag

	Vrednost	<i>p</i> vrednost
<i>McNemar</i> test		0,000
Broj uzoraka	225	

Primenom McNemar testa utvrđena je statistički značajna razlika između dva dijagnostička testa (  $p < 0,05$ ) (Tabela 25).

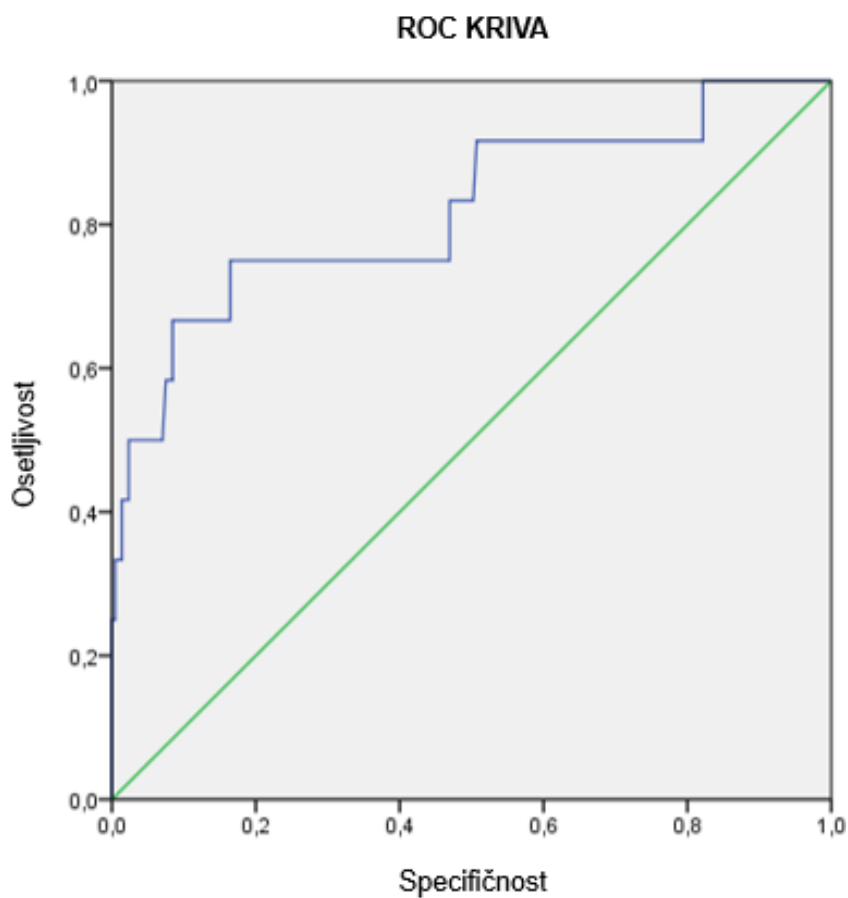


Grafikon 8. Rok kriva ELISA T Ag

Tabela 26. Površina ispod krive ELISA T Ag

Površina	Standardna greška	$p$ vrednost	Interval pouzdanosti	
			95%	
			Donja granica	Gornja granica
0,790	0,073	0,000744140455503903	0,646	0,933





Grafikon 9. Rok kriva ELISA UZ Ag

Tabela 27. Površina ispod krive ELISA UZ Ag

Površina	Standardna greška	$p$ vrednost	Interval pouzdanosti 95%	
			Donja granica	Gornja granica
0,820	0,075	0,000192786109313493	0,672	0,968

Rezultati analize ROC krive prikazani su u tabelama 26 i 27 i na grafikonima 8 i 9. Analizom dijagrama na grafikonima 8 i 9 uočava se da je ELISA test u kojem je korišćen antigen dobijen ultrazvučnom dezintegracijom (grafikon 9) bolji diskriminacioni metod od ELISA testa u kome je korišćen antigen dobijen toplotnom ekstrakcijom (grafikon 8) jer se kriva na grafikonu 9 nalazi bliže levoj i gornjoj liniji dijagrama nego što je slučaj sa krivom na grafikonu 8.

Vrednost površine ispod krive u ELISA testu u kome je korišćen UZ antigen (Tabela 27) je veća od vrednosti površine ispod krive u ELISA testu u kome je korišćen T antigen (Tabela 26). Vrednost površine ispod krive iznosi 0,820 što ELISA test sa UZ antigenom svrstava u dobre dijagnostičke testove.

## 6. DISKUSIJA

Bruceloza izazvana vrstom *B. canis* je primarno bolest pasa, divljih mesojeda i retko drugih domaćih životinja. Mada se ubraja u grupu klasičnih antropozoonoza, nema veći značaj za javno zdravlje, a infekcije ljudi su neuobičajene i obično blagotoka. Većina dijagnostikovanih slučajeva bolesti kod ljudi posledica je bliskog kontakta sa zaraženim psima ili profesionalne izloženosti velikim količinama čistih kultura bakterija (Carmichael, 1990). Bolest se kod pasa obično prenosi parenjem ili per/os, kontaktom sa kontaminiranim tkivima placentе, pobačenim fetusima ili vaginalnim sekretom zaraženih ženki. Za infekciju ovom vrstom brucela karakteristična je produžena bakterijemija koja može da traje godinama, ali i dugotrajno izlučivanje *B. canis* spermom i vaginalnim iscedkom tokom estrusa, nakon pobačaja ili normalnog porođaja (Carmichael i Kenney, 1970; George i sar., 1979). Kod ženki, najčešći klinički znak je pobačaj pred sam kraj gestacije. Povremeno može doći i do rane smrti embriona i resorpcije fetusa, odnosno pobačaja 10 do 20 dana nakon parenja (Carmichael, 1990). Inficirani mužjaci imaju unilateralni ili bilateralni epididimitis i orhitis kao najizraženije kliničke manifestacije bruceloze, koji često dovode do neplodnosti. Sperma inficiranih pasa obično sadrži veliki broj abnormalnih spermatozoida i inflamatornih ćelija, posebno tokom prva tri meseca infekcije. Hronično zaraženi mužjaci mogu imati azospermiju ili smanjen broj nezrelih spermatozoida (Carmichael i Joubert, 1988). Većina opisanih promena koje su vezane za sterilitet mužjaka posledica su autoimunskog odgovora. Već opisana produžena bakterijemija koju izaziva ova vrsta brucela, može da bude dragocena za dijagnostiku bolesti, odnosno šanse za izolaciju bakterija iz krvi pasa i u hroničnom toku bolesti su značajne (Carmichael i Kenney, 1970).

S obzirom na to da se serološki testovi najčešće koriste u dijagnostici infekcija ili kontroli zdravstvenog stanja pasa pre parenja, neophodno je iznalaženje najboljeg ili kombinacije najpouzdanijih testova. I pored toga što je bruceloza pasa poznata preko četiri decenije, na polju dijagnostike nije mnogo učinjeno, pa još uvek nedostaje saglasnost o najpouzdanijem testu. Zbog nepostojanja standardizovanih dijagnostičkih protokola, kao ni generalnog dogovora o najprikladnijem testu, svaka laboratorija definiše sopstvene kriterijume. Ovakva raznovrsnost testova i nedostatak jasno definisanih protokola dovodi do teškoća u interpretaciji rezultata seroloških testova u različitim laboratorijama. Iz tog razloga, cilj ove doktorske disertacije obuhvatio je unapređenje dijagnostike primenom preporučenih i novih, sopstveno pripremljenih testova. Jedan od zadataka ove disertacije je bilo i ispitivanje upotrebljivosti Bruce-ladder multiplex PCR metode za ispitivanje kliničkih uzoraka odnosno tkiva uterusa i testisa pasa.

Za statističke analize korišćen je program IBM SPSS Statistics 21. U cilju ispitivanja dijagnostičke osetljivosti i specifičnosti kao i stepena saglasnosti između testova, korišćena je *Kappa* statistička analiza i McNemar test kojim je ispitana statistička značajnost za interval pouzdanosti od 95%. Za statističku obradu podataka u skladu sa preporukama u literaturi kao referentni test korišćen je 2-ME TAT u titru od 1/200; sa vrednostima dobijenim ovim testom poređeni su rezultati bakteriološke izolacije, Bruce-ladder multiplex PCR metode i indirektni ELISA test formulisan sa dva različito pripremljena antigena: toplotnom ekstrakcijom i ultrazvučnom dezintegracijom bakterija.

Svi opisani problemi i zahtevi vezani za dijagnostiku su veoma važni za veterinarsku i humanu medicinu s obzirom na to da je bruceloza pasa koju izaziva *B. canis* kosmopolitsko oboljenje, a neke od zemalja u kojima su prijavljeni slučajevi bruceloze pasa su: Španija (Mateau de Antonio i sar., 1994), Austrija (Hofer i sar., 2012), Mađarska (Gyuranecz i sar., 2011), Kanada (Bosu i Prescott, 1980), Italija (Corrente i sar., 2010), Iran (Mosallanejad i sar., 2009). U Iranu, u gradu Ahvaz, u populaciji vlasničkih pasa prevalencija antitela protiv *B. canis* iznosila je 4,90% (5 pozitivnih pasa od ukupno 102 testirana) (Mosallanejad i sar., 2009). Australija i Novi Zeland su zemlje koje se deklarišu kao slobodne od *B. canis* (Wanke, 2004).

U našoj zemlji kod pasa lotalica, ali i kod vlasničkih pasa, bruceloza pasa se dijagnostikuje skoro dve decenije. U Srbiji su prvi seropozitivni psi otkriveni 1999. godine, a iste godine je i izolovana *B. canis* (Radojičić i sar., 1999). Od 164 ispitana seruma pasa različitih kategorija (psi iz odgajivačnica, lovački psi i klinički sumnjivi psi kao i grupa koja je predstavljala slučajni uzorak - vlasnički psi bez istorije bolesti) utvrđen je veliki broj seropozitivnih životinja, odnosno 4,27% (Radojičić, 2000). Nekoliko godina kasnije, ispitivanjem prevalencije antitela protiv *B. canis* na teritoriji grada Beograda, Radojičić i sar. (2006) su ispitujući 184 krvna seruma pasa lotalica, kod 49 (26,63%) utvrdili titar 1/50, kod 25 seruma (13,58%) titar 1/100, a kod 20 seruma (10,87%) titar 1/200. Iste godine, objavljena su ispitivanja sprovedena kod pasa na teritoriji opštine Požarevac kada je ustanovljeno da je 11,25% pasa bilo serološki pozitivno na osnovu preporučenih kriterijuma (2-ME TAT, titar 1/200 i viši) (Živojinović i sar., 2006). U ovom istraživanju od ukupno pregledana 74 uzorka vlasničkih i 77 uzoraka pasa lotalica, na ukupnom broju od 151 životinje, ustanovljena je prevalencija seropozitivnih životinja od 11,25%. Dobijeni rezultati su ukazali na interesantnu činjenicu: kod vlasničkih pasa nisu ustanovljene seropozitivne životinje, dok je kod pasa lotalica dijagnostikovano 17 slučajeva sa titrom jednakim ili većim od 1/200 (22,07%). Kako je broj vlasničkih i pasa lotalica u ovom istraživanju gotovo jednak, ovakav nalaz se može objasniti načinom držanja životinja u manjim sredinama u kojima se psi uglavnom nalaze vezani u dvorištima, ne izvode u šetnju pa i ne koriste zajedničke zelene površine koje su dostupne i psima lotalicama.

Stević i sar. (2013) su u retrospektivnoj analizi koja je obuhvatila period od 2004. do 2011. godine analizirali rezultate dobijene testiranjem seruma vlasničkih i pasa lotalica. U ispitivanom periodu u laboratoriji Katedre za zarazne bolesti životinja i bolesti pčela Fakulteta veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu, ukupno su ispitana 193 seruma pasa poznatih vlasnika i 120 seruma pasa lotalica. Od 193 ispitana seruma vlasničkih pasa, sigurno pozitivan titar od 1/200 u 2-ME TAT je imalo 29 uzoraka, odnosno 15,03%. Od 120 pasa lotalica pozitivan rezultat je imalo osam seruma ili 6,67%. Kod tumačenja ovako dobijenih rezultata treba imati na umu da su uzorci poreklom od vlasničkih pasa upućivani na ispitivanje u slučajevima sumnje na brucelozu, ali i za izdavanje putnih uverenja (zdravi psi). Sa druge strane, uzorci krvnih seruma poreklom od pasa lotalica su uzimani metodom slučajnog izbora. Ipak, bez

obzira na poreklo uzorka, može se zaključiti da se bruceloza izazvana vrstom *B. canis* kontinuirano, sa manjom ili većom prevalencijom dijagnostikuje na teritoriji Republike Srbije i sa najvećim učešćem životinja poreklom sa teritorije grada Beograda gde se jedino i vrše manje ili više kontinuirana ispitivanja.

Rezultati istraživanja ove doktorske disertacije su potvrdili da se u grupi pasa lualica sa teritorije grada Beograda održava bruceloza izazvana vrstom *B. canis*. Od ispitanih 225 krvnih seruma pasa testom 2-ME TAT kod 33 (14,67%) uzoraka ustanovljen je titar antitela protiv *B. canis*: 13 seruma (5,78%) je imalo titar 1/50, 8 (3,55%) titar 1/100, a 12 (5,33%) titar 1/200. Mada se na osnovu preporuka u literaturi (Alton i sar., 1988) kao znak aktivne infekcije uzimaju prilično visoke vrednosti titra specifičnih antitela (1/200 uz upotrebu 2-ME) uvek postoji mogućnost da su i niži titri znak samog početka infekcije, odnosno hroničnog toka koga prati i održavanje niskog titra antitela u cirkulaciji. Dokaz za ovu tvrdnju leži i u ustanovljenom lažno negativnom rezultatu. Naime, jedna od tri životinje kod kojih je izolovana *B. canis*, je bila serološki negativna u 2-ME TAT (Tabela 14). Ovakvi nalazi svakako opravdavaju ispitivanje parnih seruma u slučajevima kada titar antitela iznosi 1/50 i 1/100.

U sprovedenom ispitivanju osetljivost bakterijske izolacije iznosila je svega 16,7%, dok je ustanovljena specifičnost od 99,5%. Izolacija je bila uspešna kod dva uzorka poreklom od mužjaka i jednog uzorka tkiva uterusu. Tokom ovog ispitivanja uzorci reproduktivnih organa pasa lualica sakupljeni tokom sterilizacije, nisu bili „idealni“ materijal za izolaciju. Mada su organi uzimani aseptično, u većini slučajeva kontaminanti su za kratko vreme prerastali selektivni medijum, pa je od 225 uzoraka, *B. canis* izolovana samo iz tri, što čini 1,33% od ukupnog broja ispitanih životinja. Kod dva psa od kojih je izolovana *B. canis*, u krvnim serumima ustanovljen je titar antitela od 1/200, dok je treći pas bio serološki negativan. Za uspešnu izolaciju *Brucella* spp. neophodan je kvalitetan materijal uzet u pravom trenutku, vreme, odgovarajući laboratorijski uslovi i obučeno osoblje sa velikim iskustvom, između ostalog i zbog subjektivne procene izgleda kolonija. Sa druge strane, negativan rezultat izolacije ne znači da životinja nije inficirana, pa ovaj deo lažno negativnih uzoraka predstavlja razlog što se izolacija primenjuje samo u određenim slučajevima. Kod vlasničkih pasa, pre slanja uzoraka na laboratorijsko ispitivanje, obično je započet antibiotski tretman, pa

sve ovo utiče na malu osetljivost klasične bakteriološke izolacije. Izolacija brucela se smatra zlatnim standardom u dijagnostici bruceloze zbog visoke specifičnosti, ali je njena osetljivost značajno manja i pod uticajem brojnih faktora.

S obzirom na mali broj izolata, ne može se utvrditi da li na procenat izolacije utiče pol životinje, ali svakako je jasno da je klinička slika manifestnija kod mužjaka (orhitis) nego kod ženki koje nakon abortusa najčešće pojedu pobačene plodove. Ovakvo ponašanje je normalno za vrste mesojeda i omnivora, koje na taj način „čiste“ leglo od potencijalnih predatora. Dobijeni rezultati testa rezistencije na boje - tionin i bazni fuksin pokazuju da se profil osetljivosti odnosno rezistencije izolovanih sojeva razlikuje u odnosu na referentni RM 6/66 soj, kao i ranije izolovane sojeve *B. canis* sa našeg geografskog područja (Tabela 4). Dobijeni rezultati mogu da budu značajni epizootiološki markeri izvora, odnosno porekla izolovanih sojeva *B. canis*. Kappa statističkom analizom ustanovljena je srednja saglasnost od 0,251 između referentnog 2-ME TAT (titar 1/200) i bakteriološke izolacije. Primenom McNemar testa ustanovljena je statistički značajna razlika između ova dva testa ( $p < 0,05$ ). Corrente i sar. (2010) su u jednom istraživanju sprovedenom u Italiji u slučaju bruceloze dijagnostikovane kod psa, prisustvo *B. canis* dokazali serološkim i molekularnim metodama, dok klasična bakteriološka izolacija nije uspela (Corrente i sar., 2010). Zbog duge bakterijemije koja prati brucelozu pasa trebalo bi, kada god je moguće pokušati izolaciju bakterija iz krvi (Shin i Carmichael, 1999).

Ne postoji veliki broj istraživanja koja se odnose na otkrivanje prisustva DNK *B. canis* direktno iz uzoraka reproduktivnih organa pasa. U predstavljenom ispitivanju, iz ukupno ispitanih 225 uzoraka reproduktivnih organa-uterusa i testisa, pozitivna PCR reakcija je dobijena kod dva uzorka (0,88%). Jedan uzorak kod koga je Bruce-ladder multiplex PCR metodom detektovana DNK *B. canis*, poticao je od psa čiji je serum bio pozitivan u reakciji aglutinacije sa visinom titra antitela od 1/200 i kod koga je uspešno izolovana *B. canis*. Drugi uzorak pozitivan u Bruce-ladder multiplex PCR reakciji poticao je od psa sa serumom čiji je titar bio u rangu „sumnjivog“ odnosno titra od 1/50, ali iz čijih reproduktivnih organa nije izolovana *B. canis*. Jedanaest uzoraka homogenizata tkiva reproduktivnih organa poreklom od pasa kod kojih je ustanovljen titar specifičnih antitela od 1/200 bilo je negativno primenom Bruce-ladder multiplex

PCR metode. Interesantno je naglasiti da je primenom opisanog protokola, negativan bio i uzorak homogenizovanih organa poreklom od psa iz koga je izolovana *B. canis*, i koji je bio serološki negativan. Ponovljenim analizama ustanovljeno je da nije došlo do greške, odnosno zamene materijala. Bez obzira na povećanja količine ispitivane DNK u PCR smeši, svi amplikoni u pozitivnim PCR uzorcima su bili bleđi i slabo vidljivi (Slika 3). Kod dva PCR pozitivna uzorka (0,88%) homogenizovanih reproduktivnih organa detektovano je sedam amplikona što odgovara profilu *B. suis*. Nedostatak primenjenog protokola pored zanemarljive osetljivosti, odnosio se i na tačnost odnosno preciznost testa, koju ističu i sami autori metode Lopez-Goni (2008). Naime, od ispitana 24 izolata *B. canis*, čak devet je davalo profil koji odgovara *B. suis* (Lopez-Goni, 2008). Zato su isti autori, novim setom prajmera 2011. godine objavili poboljšanu verziju metode, koja nesumnjivo vrši diskriminaciju između ove dve vrste brucela. U testiranju validnosti protokola, autori su između ostalih koristili i izolat *B. canis* SR-1 (Lopez-Goni i sar., 2011).

Bruce-ladder multiplex PCR metoda je razvijena i namenjena za određivanje vrsta odnosno biotipova izolovanih kultura brucela uključujući i vakcinalne sojeve. Mada je primena molekularnih metoda napravila revoluciju u dijagnostici velikog broja infektivnih bolesti, može se reći da svako pravilo potvrđuju izuzeci. U praksi bi bilo korisno detektovati nukleinsku kiselinu mikroorganizma direktno u uzorku, izbegavajući tako komplikovani proces klasične bakteriološke izolacije. Primena PCR protokola namenjenog tipizaciji bakterijskih izolata, pokazala se neprimenjivom za ispitivanje uzoraka kliničkog materijala. Osetljivost ove metode u sprovedenom istraživanju iznosila je svega 8,3%. Bricker (2002) navodi da je PCR metoda brža i osetljivija od klasične bakteriološke izolacije jer na njen ishod ne utiče vijabilnost bakterija, kao ni prisustvo kontaminata u uzorku koji se ispituje. Ovaj zaključak nije u saglasnosti sa našim rezultatima. Razlozi za ovako nisku osetljivost koja je dobijena u sprovedenim istraživanjima ove doktorske disertacije mogu biti različiti: način pripreme i čuvanja uzoraka, činjenica da uzorci organa obiluju inhibitorima koji utiču na rezultate dobijene PCR metodom, niska koncentracija brucela u uzorku, primenjeni protokol za ekstrakciju DNK, vrsta upotrebljenih oligonukleotidnih sekvenci, itd. Na osetljivost primenjenog PCR protokola utiču mnogi faktori, ali po navodima u literaturi, uzorci mogu da budu ključni faktor (Cutler i sar., 2005). Naime, uzorci mleka, pune krvi,



sperme, placente nakon pobačaja ili vaginalnog brisa nakon pobačaja, ciljane ekstimpacije limfnih čvorova u značajnoj meri povećavaju osetljivost PCR tehnike.

Tokom ovog istraživanja ispitivana je i DNK izolovanih sojeva *B. canis* primenom Bruce-ladder multiplex PCR metode. Kod sva tri uzorka dobijena je pozitivna PCR reakcija sa vidljivih sedam amplikona, odnosno kod svih uzoraka bio je prisutan fragment od 794 bp što je odgovaralo profilu *B. suis* (slika 4). Na osnovu dobijenih profila, u cilju pravilne identifikacije sojeva *B. canis* izolovanih sa našeg geografskog područja, neophodno je koristiti novi Bruce-ladder multiplex PCR v2.0 protokol koji vrši jasnu diskriminaciju između vrsta *B. suis* i *B. canis*.

Rezultati dobijeni ispitivanjem uzoraka reproduktivnih organa pasa uz pomoć Bruce-ladder multiplex PCR metode su u saglasnosti sa rezultatima drugih autora. Gyuranecz i sar. (2011) su koristili Bruce-ladder multiplex PCR metodu na uzorcima slezine i jetre pasa i navode da je detekcija brucela direktno iz organa u većini slučajeva bila neuspešna i da bi trebalo koristiti neki osetljiviji PCR protokol. Drugi autori su koristeći drugačiji PCR protokol dobili i drugačije rezultate pri čemu su kao uzorke koristili ingvinalne limfne čvorove pasa i navode da je osetljivost PCR metode jednaka bakteriološkoj izolaciji (Aras i Uçan, 2010). U tabeli 17 prikazana je osetljivost PCR metode koja je u odnosu na referenti 2-ME TAT iznosila svega 8,3%, dok je specifičnost bila 99,5%. *Kappa* statističkom analizom ustanovljena je beznačajna podudarnost između ovih testova, 0,130, dok je primenom McNemar testa ustanovljena statistički značajna razlika između testova ( $p < 0,05$ ).

Koliko je važan tip testa odnosno porekla antigena za dijagnostiku bruceloze pasa govore brojna istraživanja. U Italiji su Ebani i sar. (2003) testirali 2328 krvnih seruma pasa na prisustvo antitela protiv *B. canis* AGID testom i brzom aglutinacijom na pločici sa dodatkom 2-ME, pri čemu je kao antigen korišćena *B. ovis*. Serumi poreklom od 25 pasa (1,07%) bili su pozitivni primenom AGID testa, dok su samo četiri (16%) od 25 pozitivnih seruma bila pozitivna i u testu brze agutinacije na pločici. ELISA testom sa homotipskim antigenom (*B. canis*) detektovano je devet pozitivnih seruma: šest pozitivnih i tri negativna u AGID testu. Primenom ELISA testa u kome je antigen dobijen od *B. ovis*, otkriveno je 15 pozitivnih uzoraka. Od ovih pozitivnih uzoraka primenom AGID testa pozitivno je bilo 10 uzoraka, negativno pet i osam je bilo

pozitivno primenom ELISA testa sa *B. canis* kao antigenom. U ovom ispitivanju je dokazana veća specifičnost testova kod kojih je za pripremu antigena korišćena *B. canis*.

Poznato je da krv pasa lako hemolizuje, pa je testiranje takvih seruma povezano sa brojnim poteškoćama. Veliki problem u formulisanju imunoenzimskih testova predstavljaju i česte nespecifične reakcije, koje zbog svog intenziteta onemogućavaju razlikovanje pozitivnih i negativnih uzoraka. Drugim rečima, nemoguće je odrediti graničnu vrednost. Iz tog razloga, neophodna je predobrada ispitujućih seruma. Za pojavu visokog pozadinskog efekta (*back ground*) koji onemogućava određivanje realne granične vrednosti najodgovorniji je M izotip antitela, pa je eliminacija ove klase imunoglobulina i najvažnija. Mada antipseća antitela koja se koriste za dizajniranje različitih ELISA testova imaju delimičan afinitet i za IgM, ELISA testovima se uglavnom detektuje G klasa imunoglobulina. U sprovedenom ispitivanju, a pre izvođenja ELISA testova serumi su tretirani na različite načine: dodavanjem većeg procenta BSA kao nespecifičnog blokatora, inaktivacijom seruma na 56 °C 30 minuta i dodatkom 2-merkaptetanola. Ustanovljeno je da je na smanjenje nespecifičnih reakcija najznačajnije uticalo tretiranje seruma sa 2-ME, koji kao disulfid redukujući agens razara IgM molekule koji su najčešći razlog za nastanak ovakvih nespecifičnih reakcija. Tretman seruma sa 0,7% 2-ME na temperaturi od 4 °C preko noći smanjivao je broj nespecifičnih reakcija. Ovaj zaključak je u saglasnosti sa već objavljenim podacima drugih autora. Mateu de Antonio i sar., (1994) navode da se problem unakrsne reaktivnosti rešava obradom seruma sa 2-ME koji razlaže IgM.

Corbel je još 1985. godine ukazao na problem unakrsno reagujućih antitela IgM klase koja nastaju izlaganjem organizma životinje raznim mikroorganizmima i antigenima iz spoljašnje sredine, a ne samo usled infekcije *B. canis*. Iz tog razloga serološki testovi koji detektuju prisustvo IgM klase antitela, koja su i prva klasa imunoglobulina koja se pojavljuje nakon infekcije, nisu najbolji izbor. Za nespecifične reakcije mogu da budu odgovorni i IgG, unakrsno reagujuća antitela sintetisana na antigeno slične bakterije. Kako su osetljivost i specifičnost dijagnostičkih testova obrnuto proporcionalne, poželjno je koristiti onu kombinaciju testova koja daje najbolje rezultate. Obično se u eradikacionim kampanjama neke bolesti na samom početku

koriste visoko osetljivi testovi, dok se na kraju koriste specifični testovi. Tretiranjem seruma 2-merkaptetanolom povećava se specifičnost upotrebljenog testa, ali se na određeni način afektuje osetljivost te se povećava verovatnoća dobijanja lažno negativnih rezultata.

Antigeni dobijeni toplotnom ekstrakcijom i ultrazvučnom dezintegracijom *B. canis* analizirani su uz pomoć SDS-PAGE na 12,5% poliakrilamidnom gelu. Gelovi su obojeni *Commassie Brilliant Blue* bojom. Za određivanje molekulskih masa pojedinih proteinskih frakcija konstruisan je baždarni dijagram zavisnosti logaritma molekulskih masa ( $\log M_r$ ) markera proteina (*Serva, Germany*) i njihove pokretljivosti u poliakrilamidnom gelu (Slika 5). Na slici 6. prikazan je izgled proteinskih traka antigena dobijenog toplotnom ekstrakcijom i antigena dobijenog ultrazvučnom dezintegracijom. Denzitometrijska analiza antigena dobijenog ultrazvučnom dezintegracijom prikazana je u grafikonu 3 i tabeli 5. Ovako dobijen antigen pokazao je raznovrsnu procentualnu zastupljenost proteina različitih molekulskih masa. Procentualno najzastupljeniji su bili proteini od 10,95 kDa (11,56%) i 30,5 (10,62%). Zatim slede proteini od 24,5 kDa (9,20%), 38 kDa (7,97%) i 22 kDa (7,85%). Za razliku od njega, proteinski sastav antigena dobijenog toplotnom ekstrakcijom bio je znatno skromniji: u najvećem procentu, čak 43,12 %, bio je prisutan protein od 10,95 kDa , dok su proteini molekulskih masa od 14 i 15,5 kDa bili zastupljeni sa po 6,5%. U smeši antigena dobijenog toplotnom ekstrakcijom izdvajao se i protein velike molekulske mase od 76 kDa sa učešćem od 7,41%. Denzitometrijskom analizom antigena dobijenog ultrazvučnom dezintegracijom detektovana su 23 proteina različitih molekulskih masa (opseg od 9,41 do 93,77 kDa- tabela 5) dok je u antigenu dobijenom toplotnom ekstrakcijom detektovano devet proteina (u opsegu od 10,95 do 76 kDa- tabela 6). Salhi i sar. (2003) navode da su glavni proteini spoljašnje membrane brucela porini - proteini grupe 2 (36,00 do 38,00 kDa) i proteini grupe 3 (25,00 do 27,00 kDa i 31,00 do 34,00 kDa).

Optimalna koncentracija proteina za formulaciju imunoenzimskih testova sa dva različito pripremljena antigena, vršena je šah titracijom. Ispitane su 4 koncentracije proteina: 10, 1, 0,1 i 0,01  $\mu\text{g/ml}$ . Takođe su korišćena 4 različita razblaženja seruma: 1/200, 1/400, 1/800 i 1/1600. Rezultati dobijeni šah titracijom su prikazani u

grafikonima 5 i 6 i tabelama 7 i 8. Za oba antigena ustanovljena optimalna koncentracija antigena iznosila je 1 µg/ml, a optimalno razređenje seruma iznosilo je 1/200. Koeficijent varijacije za oba ELISA testa iznosio je 28,5 odnosno 28,6% i nalazio se u granicama dozvoljenih vrednosti. Ustanovljena granična vrednost za indirektni ELISA test sa antigenima dobijenim toplotnom ekstrakcijom iznosila je  $0,382 \pm 0,18$ . Granična vrednost za antigen dobijen ultrazvučnom dezintegracijom je bila viša i kretala se u opsegu  $0,614 \pm 0,30$ . Sprovedeno istraživanje je pokazalo da je indirektna ELISA u kojoj se koriste antigeni dobijeni toplotnom ekstrakcijom jednako osetljiva (66,7%), ali manje specifična (83,1%) metoda od ELISA testa u kome se koriste antigeni ekstrahovani ultrazvučnom dezintegracijom (osetljivost 66,7%, specifičnost 86,4%). ELISA testom sa antigenom dobijenim toplotnom ekstrakcijom su od ispitanih 225 uzoraka, otkrivena 44 (19,55%) pozitivna uzorka, dok je u ELISA testu sa antigenom dobijenim ultrazvučnom dezintegracijom, koji je specifičniji, bilo 37 (16,44%) pozitivnih uzoraka. Slična zapažanja objavili su i drugi autori (Wanke i sar., 2002; Barkha i sar., 2011 Oliveira i sar., 2011). Primena preporučenog 2-ME TAT testa otežana je u svim slučajevima kada je uzorak seruma hemolitičan. Kako krv pasa lako hemolizuje, indirektni ELISA test sa antigenima dobijenim ultrazvučnom dezintegracijom može da bude odlična zamena za aglutinacione testove.

Rezultati analize ROC (*Receiver Operating Characteristics Curve*) krive pripremljenih ELISA testova (grafikon 8 i 9, tabela 26 i 27) i procenom vrednosti površine ispod krive (AUC- *Area Under the Curve* eng.) su pokazali da je u testu u kome je korišćen antigen dobijen ultrazvučnom dezintegracijom vrednost veća u odnosu na ELISA test sa antigenom dobijenim toplotnom ekstrakcijom i iznosi 0,820. Ova vrednost svrstava opisani ELISA test u dobre dijagnostičke testove.

Jedna od loših strana klasičnih ELISA testova u vezi je sa obaveznom predobradom ispitujućih seruma i razaranjem određenih klasa imunoglobulina. Predobrada seruma komplikuje izvođenje metode i zahteva više vremena za izvođenje. Radojičić i sar. (2001) su primenom dot-ELISA testa sa dva različito pripremljena antigena ispitali 44 krvna seruma pasa i ustanovili da su citoplazmatski proteini *B. canis* pouzdani i visoko specifični za brzu dijagnostiku bruceloze pasa. U ovom istraživanju serumi su testirani u razređenju 1/100, bez prethodne obrade toplotom ili hemijskim

sredstvima, a kao nosač je korišćena nitroceluloza na koju su nanošeni ispitivani antigeni. Upotrebom antipsećih antitela detektovani su imunoglobulini G i M izotipa, čime se povećava i osetljivost, ali i specifičnost testa upotrebom citoplazmatskih antigena.

Autori iz Indije takođe su objavili istraživanje u kome su citoplazmatski antigeni dobijeni ultrazvučnom dezintegracijom bakterija pogodni za formulaciju indirektnog ELISA testa koji je visoko osetljiv. Zbog visoke osetljivosti, autori preporučuju upravo ovaj test za trijažu uzoraka seruma, dok kao potvrdni test preporučuju AGID zbog visoke specifičnosti (Barkha i sar., 2011). Rezultati koje su dobili Wanke i sar. (2002) pokazuju da su ELISA testovi u kojima su korišćeni proteini spoljašnje membrane (*Outer Membrane Proteins-OMP*) i citoplazmatski antigeni *B. canis* visoko specifični za primenu u dijagnostici bruceloze pasa. Uzorci pasa u početnim fazama infekcije koji su negativni u testovima aglutinacije, mogu biti otkriveni ovako formulisanim ELISA testovima. Istraživanje Wanke i sar. (2002) pokazuje da su ELISA testovi u kojima su upotrebljeni antigeni spoljašnje membrane *B. canis-OMP* (*outer membrane proteins-eng.*) ili citoplazmatski antigeni *B. abortus* veoma specifični i osetljivi i mogu detektovati antitela protiv *B. canis* neposredno po inficiranju. Korišćenje citoplazmatskih antigena poreklom od drugih vrsta brucela moguće je zato što su unutrašnji proteini brucela visoko konzervisani i gotovo identični. Brucele nemaju plazmide pa se smatra da je upravo ova osobenost odgovorna za postojanje skoro identičnih citoplazmatskih proteina (Cutler i sar., 2005).

Rezultati Baldija i sar. (1994) takođe ukazuju na mogućnost upotrebe ELISA testa u kome se koriste citoplazmatski antigeni *B. abortus* u dijagnostici bruceloze pasa. Upotreba citoplazmatskog proteina *B. abortus* molekulske mase od 18 kDa kao antigena u ELISA testu pokazala se korisnom u dijagnostici bruceloze pasa (Baldi i sar., 1997).

Oliveira i sar., (2011) dizajnirali su ELISA test sa antigenima dobijenim toplotnom ekstrakcijom; ovaj test je pokazao visoku osetljivost (91,18%) što ukazuje na mogućnost njegove upotrebe kao pouzdanog i praktičnog trijažnog testa, kao i upotrebu u epizootiološkim istraživanjima. Koristeći različite antigene u ELISA testovima moguće je eliminisati unakrsne reakcije koje nastaju kao posledica sinteze specifičnih antitela protiv antigeno sličnih bakterija.

R-LPS koji se nalazi kod R formi brucela, antigeno je sličan i sa LPS-om drugih bakterija (*Pseudomonas* sp., *Bordetella bronchiseptica*, *Staphylococcus epidermidis*, *Actinobacillus equuli*) (Carmichael, 1990) i može biti odgovoran za manju specifičnost testova u kojima se koriste antigeni dobijeni toplotnom ekstrakcijom. Moguće je da testovi u kojima se koriste citoplazmatski antigeni nisu pogodni za otkrivanje životinja u početnim fazama infekcije. Naime, da bi se sintetisala specifična antitela protiv citoplazmatskih proteina brucela, potrebno je da prođe i nekoliko nedelja od infekcije. Antigeni dobijeni toplotnom ekstrakcijom, pored R-LPS sadrže i druge proteine spoljašnje membrane koji su zajednički svim brucelama (Bowden i sar., 1995). I drugi autori su objavili da R i S sojevi *Brucella* spp. imaju zajedničke citoplazmatske antigene. Dizajnirani su agar gel imunodifuzioni testovi u kojima su upotrebljeni citoplazmatski antigeni *B. canis* i mukoidnih sojeva *Pseudomonas aeruginosa* i *Staphylococcus* spp. Nabrojane bakterije dele neke površinske antigene determinante sa R-LPS *B.canis*; dokazano je da su citoplazmatski proteini bakterija roda *Brucella* specifični samo za ovaj rod i da je većina proteina zajednička svim njegovim vrstama (Carmichael i sar., 1984).

Rezultati brojnih autora, ali i oni dobijeni u ovom istraživanju ukazuju da je za dijagnostiku bruceloze pasa potrebno koristiti pored krvnog seruma i druge, različite dostupne uzorke u cilju postavljanja tačne dijagnoze. Kombinacija testova kojima se detektuju antigeni odnosno antitela protiv *B. canis* povećavaju verovatnoću otkrivanja inficiranih životinja. Na taj način zaustavlja se širenje bolesti na prijemčive životinje i eventualno ljude. Treba naglasiti, da u našoj zemlji do sada nije prijavljeno oboljenje ljudi izazvano ovom vrstom bakterija.

Rezultati dobijeni u istraživanju sprovedenom u okviru ove doktorske disertacije pokazuju da je *Kappa* statističkom analizom utvrđen stepen najviše saglasnosti između 2-ME TAT i ELISA testa sa UZ antigenom od 0,268, što je u rangju srednje podudarnosti.

*Kappa* statističkom analizom ustanovljen je stepen saglasnosti između 2-ME TAT i iELISA sa antigenom dobijenim toplotnom ekstrakcijom od 0,22 što je takođe u rangju srednje podudarnosti. Kao najosetljiviji testovi u ovom istraživanju pokazali su se ELISA testovi, sa osetljivošću od 66,7%.

Bez obzira na malu osetljivost klasične bakteriološke izolacije od svega 16%, *kappa* statistička saglasnost od 0,251 sa referentnim 2-ME TAT testom, govori da ova metoda svakako ima važnu ulogu u dijagnostici bruceloze pasa. Ovo i zbog činjenice da je bakteriološkom izolacijom otkriven bakteriološki pozitivan i serološki negativan serum. Iz tog razloga, kod negativnih seroloških rezultata, ili u slučajevima kada se ustanovi titar antitela od 1/50 ili 1/100 mora se uzeti parni uzorak seruma. Samo kombinacija različitih testova i posebno kod postavljene kliničke sumnje na brucelozu može da da tačan rezultat.

## 7. ZAKLJUČCI

Na osnovu sprovedenih ispitivanja i dobijenih rezultata, mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. Kod nevlasničkih pasa poreklom sa teritorije grada Beograda prisutna je bruceloza izazvana vrstom *B. canis*, a ustanovljena seroprevalencija iznosi 5,33%. Ova kategorija pasa predstavlja potencijalni rezervoar infekcije.
2. Svim pripremljenim testovima: 2-ME TAT, indirektnim ELISA testovima dizajniranim sa dva različito pripremljena antigena, klasičnom bakteriološkom izolacijom i Bruce-ladder multiplex PCR metodom dijagnostikovan je različit broj pasa pozitivnih na vrstu *B. canis*. Najniža osetljivost je ustanovljena kod Bruce-ladder multiplex PCR, a najviša kod ELISA testova.
3. Poređenjem sa 2-ME TAT osetljivost klasične bakteriološke izolacije iznosila je 16,7%, a specifičnost 99,5%. Sa druge strane, saglasnost između ova dva testa iznosila je 0,251 i kretala se u rangi umerene saglasnosti.
4. Kod izolovanih sojeva *B. canis*, ustanovljena su odstupanja u profilu osetljivosti na bazni fuksin u odnosu na referentni i ranije izolovane sojeve ove bakterije sa našeg područja, što može da bude značajan marker u epizootiološkim ispitivanjima.
5. Poređenjem sa 2-ME TAT, osetljivost Bruce-ladder multiplex PCR metode je bila zanemarljiva i iznosila je 8,3%. Takođe, saglasnost između 2-ME TAT i Bruce-ladder multiplex PCR iznosila je 0,130 što ukazuje na zanemarljivu saglasnost između ovih testova. Dobijeni rezultati su potvrdili da se navedeni PCR protokol ne može koristiti za ispitivanje prisustva DNK brucela u homogenizatima tkiva uterusu i testisa pasa. Uz to, primenom Bruce-ladder multiplex PCR metode, nije bila moguća tačna



identifikacija sojeva *B. canis* izolovanih sa našeg geografskog područja koji su davali profil vrste *B. suis*.

6. SDS-PAGE elektroforezom antigena dobijenog toplotom, dokazano je dominantno prisustvo proteina od 10,95 kDa (43,7%) koji odgovara R-LPS-u *B. canis*. Elektroforetski profil antigena dobijenog ultrazvukom imao je 3,7 puta manju količinu R-LPS-a, i ravnomerno učešće proteina spoljašnje membrane od 24,5, 30,47 i 38 kDa što je uticalo na veću specifičnost ovako pripremljenog ELISA testa.

7. Stepen najviše saglasnosti ustanovljen je između 2-ME TAT i ELISA testa sa antigenom dobijenim ultrazvukom. Dobijena vrednost od 0,268 se kretala u rangu srednje podudarnosti. Osetljivost ovako pripremljenog ELISA testa iznosila je 66,7%, a specifičnost 86,4%. Uz to, AUC vrednost od 0,820 ga svrstava u dobre dijagnostičke testove.

8. U cilju postavljanja tačne dijagnoze, za serološko ispitivanje, pored 2-ME TAT, preporučuje se i upotreba indirektnog ELISA testa formulisanog sa antigenom dobijenim ultrazvukom zbog boljih karakteristika. Kod postojanja sumnjivih rezultata seroloških testova, obavezno je testiranje parnih seruma i bakteriološko ispitivanje dostupnih kliničkih uzoraka, zbog dokazanog postojanja lažno negativnih rezultata.

## 8. LITERATURA

1. Alton G.G, Jones L.M., Angus R.D., Verger J.M. (1988) Tehniques for the brucellosis laboratory. INRA, 169-174.
2. Alton G.G., Jones L.M., Pietz D.E. (1975) Laboratory techniques in brucellosis, second ed. WHO, Geneva, Switzerland.
3. Aras Z., Uçan U.S. (2010) Detection of *Brucella canis* from inguinal lymph nodes of naturally infected dogs by PCR. Theriogenology, 74 (4): 658-62.
4. Baldi P.C., Wanke M.M., Loza M.E., Fossati C.A. (1994) *Brucella abortus* cytoplasmic proteins used as antigens in an ELISA potentially useful for the diagnosis of canine brucellosis. Vet Microbiol 41, 127–134.
5. Baldi P.C., Wanke M.M., Loza M.E., Monachesi N., Fossati C.A. (1997) Diagnosis of canine brucellosis by detection of serum antibodies against an 18 kDa cytoplasmic protein of *Brucella* spp. Vet Microbiol, 57, 273–281.
6. Barkha S., Dharmendra Kumar S., Dharendra Kumar S. (2011) Immunochemical characterization of antigens of *Brucella canis* and their use in seroprevalence study of canine brucellosis. Asian Pac J Trop Med, 4(11): 857-61.
7. Barton C.L. (1977) Canine brucellosis. Ve Clin N Am, 7, 705–710.
8. Berthelot X., Garin-Bastuji B. (1993). Brucelloses canines. Point Vet, 25, 125–129.
9. Billard E., Dornand J., Gross A. (2007) *Brucella suis* prevents human dendritic cell maturation and antigen presentation through regulation of tumor necrosis factor alpha secretion. Infect Immun, 75: 4980-9.
10. Boschiroli M.L., Ouahrani-Bettache S., Foulongne V., Michaux-Charachon S., Bourg G., Allardet-Servent A., Cazevieille C., Liautard J.P., Ramuz M., O'Callaghan D. (2002) The *Brucella suis* virB operon is induced intracellularly in macrophages. Proc Natl Acad Sci USA, 99(3): 1544-9.

11. Bosu W.T.K., Prescott J.F. (1980) A Serological Survey of Dogs for *Brucella canis* in Southwestern Ontario. *Can Vet J*, 21(7): 198–200.
12. Bowden R.A., Cloeckert A., Zygmunt M.S., Bernard S., Dubray G. (1995) Surface exposure of outer membrane protein and lipopolysaccharide epitopes in *Brucella* species studied by enzyme-linked immunosorbent assay and flow cytometry. *Infect Immun*, 63: 3945-52.
13. Bricker B.J. (2002) PCR as a diagnostic tool for brucellosis. *Vet Microbiol*, 90 (1-4): 435-46.
14. Carmichael L.E. (1966) Abortion in 200 beagles. *J Am Vet Med Assoc*, 149:1126.
15. Carmichael L.E. (1976) Canine brucellosis: an annotated review with selected cautionary comments. *Theriogenology*, 6: 105–16.
16. Carmichael L.E. (1979) Brucellosis (*Brucella canis*). In: Steele JH ed. Handbook series in zoonoses, Sect. A, v.1, Boca Raton FL, CRC Press Inc. p. 185–194.
17. Carmichael L.E. (1990). In: Nielsen K., Duncan J.R., Eds. Animal brucellosis. CRC: Boca Raton; pp. 335-50.
18. Carmichael L.E. (1999) Brucelosis canina causada por *B. canis*: enfermedad clínica problemas en inmunodiagnostico. *Rev Med Vet (Buenos Aires)*, 80: 102–106.
19. Carmichael L.E., Bruner D.W. (1968) Characteristics of a newly-recognized species of *Brucella* responsible for infectious canine abortions. *Cornell Vet*, 48: 579–592.
20. Carmichael L.E., Green E.G. (1990) Canine brucellosis. In: Greene, C.E. (Ed.), *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. W.B. Saunders Co, Philadelphia, PA, pp. 573.
21. Carmichael L.E., Joubert JC. (1988) Transmission of *Brucella canis* by contact exposure. *Cornell Vet*, 78: 63-73.
22. Carmichael L.E., Joubert J.C., Jones L. (1989) Characterization of *Brucella canis* protein antigens and polypeptide antibody responses of infected dogs. *Veterinary Microbiology*, 19, 373-387.

23. Carmichael L.E., Kenney R.M. (1968) Canine abortion caused by *Brucella canis*. J Am Vet Med Assoc, 152: 605–16.
24. Carmichael L.E., Kenney RM. (1970) Canine brucellosis: the clinical disease, pathogenesis and immune response. J Am Vet Med Assoc, 156: 1726-34.
25. Carmichael L.E., Shin S.J. (1996) Canine brucellosis: a diagnostician's dilemma. Semin Vet Med Surg (Small Anim), 11: 161– 165.
26. Carmichael L.E., Zoha S.J., Flores-Castro R (1984) Problems in the serodiagnosis of canine brucellosis: dog responses to cell wall and internal antigens of *Brucella canis*. Dev Biol Stand, 56: 371–83.
27. Celli J (2006) Surviving inside a macrophage: the many ways of *Brucella*. Res Microbiol, 157: 93-8.
28. Cirl C., Wieser A., Yadav M., Duerr S., Schubert S., Fischer H., Stappert D., Wantia N., Rodriguez N., Wagner H., Svanborg C., Miethke T. (2008) Subversion of Toll-like receptor signaling by a unique family of bacterial Toll/interleukin-1 receptor domain-containing proteins. Nat Med, 14: 399-406.
29. Corbel M.J., Brinley-Morgan W.J. (1984) Genus *Brucella*. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol 1. Ed. Krieg N.R., Holt J.G. Williams and Wilkins; Baltimore, 370
30. Corbel M.J. (1985) Recent advances in the study of *Brucella* antigens and their serological cross-reactions. Vet Bull, 55: 927-942.
31. Corrente M., Franchini D., Decaro N., Greco G., D'Abramo M., Greco M.F., Latronico F., Crovace A., Martella V. (2010) Detection of *Brucella canis* in a dog in Italy. New Microbiol, 33(4): 337-41.
32. Cutler S.J., Whatmore A.M., Commander N.J. (2005) Brucellosis – new aspects of an old disease. Journal of Applied Microbiology. 98, 1270–1281.
33. Ebani V.V., Cerri D., Fratini F., Bey R.F., Andreani E. (2003) Serological diagnosis of brucellosis caused by *Brucella canis*. Microbiologica 26, 65-73.
34. Flores-Castro R., Carmichael L.E. (1977) Canine brucellosis: current status of methods for diagnosis and treatment. In: 27th gainses veterinary symposium, 17–24.
35. Flores-Castro R., Segura R. (1976) A serological and bacteriological survey of canine brucellosis in mexico. Cornell Vet, 66: 347–52.

36. Flores-Castro R., Suarez F., Ramirez-Pfeiffer C., Carmichael L.E. (1977) Canine brucellosis: bacteriological and serological investigation of naturally infected dogs in Mexico City. *J Clin Micro*, 6: 591–7.
37. Foster G., Osterman B.S., Godfroid J., Jacques I., Cloeckaert A. (2007) *Brucella ceti* sp. nov. and *Brucella pinnipedialis* sp. nov. for *Brucella* strains with cetaceans and seals as their preferred hosts. *Int J Syst Evol Microbiol*, 57: 2688-2693.
38. García-Yoldi D., Marín C.M., de Miguel M.J., Muñoz P.M., Vizmanos J.L., López-Goñi I. (2006) Multiplex PCR assay for the identification and differentiation of all *Brucella* species and the vaccine strains *Brucella abortus* S19 and RB51 and *Brucella melitensis* Rev1. *Clin Chem*, 52: 779–781.
39. George L.W., Carmichael L.E. (1984). Antisperm responses in male dogs with chronic *Brucella canis* infections. *Am J Vet Res*, 45(2): 274–81.
40. George L.W, Duncan J.R, Carmichael L.E. (1979) Semen examination in dogs with canine brucellosis. *Am J Vet Res*, 40: 1589–95.
41. Greene C.E., Carmichael L.E. Canine brucellosis. In: Greene CE, editor. *Infectious diseases of the dog and cat*. Philadelphia: WB Saunders, Co; 2006. p. 369–81.
42. Gwin R.M., Kolwalski J.J, Wyman M., Winston S. (1980) Ocular lesions associated with *Brucella canis* infection in a dog. *J Am Anim Hosp Assoc*, 16: 607–10.
43. Gyuranecz M., Szeredi L., Rónai Z., Dénes B., Dencso L., Dán Á., Pálmai N., Hauser Z., Lami E., Makrai L., Erdélyi K., Jánosi S. (2011) Detection of *Brucella canis*-induced reproductive diseases in a kennel. *J Vet Diagn Invest*, 23(1): 143-7.
44. Hofer E., Bag Z.N., Revilla-Fernandez S., Melzer F., Tomaso H., Lopez-Goni I., Fasching G., Schmoll F. (2012) First detection of *Brucella canis* infections in a breeding kennel in Austria. *New Microbiol*, 35(4): 507-10.
45. Holst B.S., Löfqvist E., Ernholm L., Eld K., Cedersmyg E., Hallgren G. (2012) The first case of *Brucella canis* in Sweden: background, case report and recommendations from a northern European perspective. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 54:18.

46. Johnson CA, Bennett M, Jensen RK, Schirmer R. (1982) Effect of combined antibiotic therapy on fertility in brood bitches infected with *Brucella canis*. *Am Vet Med Assoc*, 180(11):1330-3.
47. Johnson C.A., Walker R.D. (1992). Clinical signs and diagnosis of *Brucella canis* infection. *Compend Cont Educ Pract Vet*, 14 (763/767): 770–772.
48. Kerwin S.C., Lewis D.D., Hribernik T.N., Partington B., Hosgood G., Eilts B.E. (1992) Diskospondylitis associated with *Brucella canis* infection in dogs: 14 cases (1980–1991). *J Am Vet Med Assoc*, 201: 1253–7.
49. Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259): 680-685.
50. Lewis Jr. G.E., Crumrine M.H., Jennings P.B., Fariss B.L. (1973) Therapeutic value of tetracycline and ampicillin in dogs infected with *Brucella canis*. *J Am Vet Med Assoc*, 163: 239–241.
51. López-Goñi I., García-Yoldi D., Marín C.M., de Miguel M.J., Barquero-Calvo E., Guzmán-Verri C., Albert D., Garin-Bastuji B. (2011) New Bruce-ladder multiplex PCR assay for the biovar typing of *Brucella suis* and the discrimination of *Brucella suis* and *Brucella canis*. *Vet Microbiol*, 154(1-2): 152-5.
52. López-Goñi I., García-Yoldi D., Marín C.M., de Miguel M.J., Muñoz P.M., Blasco J.M., Jacques I., Grayon M., Cloeckert A., Ferreira A.C., Cardoso R., Corrêa de Sá M.I., Walravens K. Albert D., Garin-Bastuji B. (2008) Evaluation of a multiplex PCR assay (Bruce-ladder) for molecular typing of all *Brucella* species, including the vaccine strains. *J Clin Microbiol*, 46: 3484–3487.
53. Mateau de Antonio E.M., Martin M., Casal J. (1994) Comparison of serological tests used in canine brucellosis diagnosis. *J Vet Diagn Investigat*, 6(2): 257-9.
54. Mateau de Antonio E.M., Martin M., Soler M. (1993). Use of indirect enzyme-linked immunosorbent assay with hot saline solution extracts of a variant (M-) strain of *Brucella canis* for diagnosis of brucellosis in dogs. *Am J Ve Res*, 54: 1043–1046.
55. Moon J.S., Park Y.H., Jung S.C., Ku B.G., Jang G.C., Shin S., Lee S.I., Lee J.M., Shin S.J. (1994) Serological tests in canine brucellosis. *RDA J Agric Sci Vet*, 36: 614–621.

56. Moore J.A, Kakuk T.J. (1969) Male dogs naturally infected with *Brucella canis*. J Am Vet Med Assoc, 155: 1352–8.
57. Moreno E., Stackebrandt E., Dorsch M, Wolters J., Busch M., Mayer H. (1990) *Brucella abortus* 16S rRNA and lipid A reveal a phylogenetic relationship with members of the alpha-2 subdivision of the class Proteobacteria. J Bacteriol, 172: 3569-76
58. Mosallanejad B., Ghorbanpoor Najafabadi M., Avizeh R., Mohammadian N.A. (2009) Serological survey on *Brucella canis* in companion dogs in Ahvaz. Iranian Journal of Veterinary Research, Shiraz University, 10, 4, 383-6.
59. Nicoletti P. (1989). Diagnosis and treatment of canine brucellosis. In: Kirk, R.W. (Ed.), Current Veterinary Therapy X. W.B. Saunders Co., Philadelphia, pp. 1317–1320.
60. Nicoletti, P. (1991) Further studies on the use of antibiotics in canine brucellosis. Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian 13(6): 944,946-947
61. Nicoletti P., Chase A. (1987) The use of antibiotics to control canine brucellosis. Compend. Cont. Educ. Pract. Vet. 9, 1063-1066.
62. Oliveira M.Z., Vale V., Keid L., Freire S.M., Meyer R., Portela R.W., Barrouin-Melo S.M. (2011) Validation of an ELISA method for the serological diagnosis of canine brucellosis due to *Brucella canis*. Res Vet Sci, 90(3): 425-31.
63. Pickerill P.A., Carmichael L.E. (1972) Canine brucellosis: control programs in commercial kennels and effect on reproduction. J Am Vet Med Assoc, 160: 1607–15.
64. Pizarro-Cerdá J., Moreno E., Gorvel J.P. (2000) Invasion and intracellular trafficking of *Brucella abortus* in non phagocytic cells. Rev Microbe Infect, 2: 829-35.
65. Pollock R.V.H. (1979). Canine brucellosis: current status. Compend Contin Educ Pract Vet, 1:255–67.
66. Porte F., Liautard J.P., Kohler S. (1999) Early acidification of phagosomes containing *Brucella suis* is essential for intracellular survival in murine macrophages. Infect Immun, 67: 4041-7.

67. Purvis D.S. (1981) Isolation of *Brucella canis* from canine with pyogranulomatous dermatitis. In: Abstracts of the 81st Annual Meeting of the American Society for Microbiology, pp. 309.
68. Radojičić S. (2000) Imunodijagnostički testovi u otkrivanju infekcija pasa izazvanih sa *Brucella canis* i njihov značaj u proceni epizootiološke situacije. Doktorska disertacija, Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu.
69. Radojičić S., Čilerdžić M., Dimić B., Kirčanski J. (2006) Ispitivanje prevalencije antitela na *B. canis* kod pasa lotalica na teritoriji grada Beograda. Veterinarski glasnik, 60(1-2): 43-49.
70. Radojičić S., Lako B., Đuričić B., Valčić M. (2001) Dot ELISA as a rapid method for serological diagnosis of canine brucellosis. Acta Veterinaria – Beograd, 51(5-6): 317-324.
71. Radojičić S., Lako B., Valčić M. (1999) Bruceloza pasa stanje i mogućnost praćenja trenutne epizootiološke slike, Zbornik radova, I jugoslovenski epizootiološki dani, Žabljak, 10-13 oktobra, 120-122.
72. Saegusa J., Ueda K., Got Y., Fujiwara K. (1977) Ocular lesions in experimental canine brucellosis. Jpn J Vet Sci, 39: 181–5.
73. Salcedo S.P., Maechesini M.I., Lelouard H., Fugier E., Jolly G., Balor S., Muller A., Lapaque N., Demaria O., Alexopoulou L., Comerci D.J., Ugalde R.A., Pierre P., Gorvel J.P. (2008) *Brucella* control of dendritic cell maturation is dependent on the TIR-containing protein Btp1. PLoS Pathog, 4(2): e21.
74. Salhi I., Boigegrain R. A., Machold J., Weise C., Cloeckert A., Rouot B. (2003) Characterization of New Members of the Group 3 Outer Membrane Protein Family of *Brucella* spp. Infection and Immunity, 71(8): 4326-4332.
75. Schoeb T.R., Morton R. (1978) Scrotal and testicular changes in canine brucellosis: a case report. J Am Vet Med Assoc, 172: 598–600.
76. Scholz H.C., Hubalek Z., Nesvadbova J., Tomaso H., Vergnaud G., Le Flèche P., Whatmore A.M., Al Dahouk S., Krüger M., Lodri C., Pfeffer M. (2008b) Isolation of *Brucella microti* from soil. Emerg Infect Dis, 14:1316-1317.
77. Scholz H.C., Hubalek Z., Sedlacek I., Vergnaud G., Tomaso H., Al Dahouk S., Melzer F., Kämpfer P., Neubauer H., Cloeckert A., Maquart M., Zygmunt M.S., Whatmore A., Falsen E., Bahn P., Göllner C., Pfeffer M., Huber B., Busse



- H.J., Nöckler K (2008a) *Brucella microti* sp. nov., isolated from the common vole *Microtus arvalis*. Int J Syst and Evol Microbiol, 58:375-382.
78. Scholz H.C., Hofer E., Vergnaud G., Le Flèche P., Whatmore A., Al Dahouk S., Pfeffer M., Krüger M., Cloeckeaert A., Tomaso H. (2009) Isolation of *Brucella microti* from mandibular lymph nodes of red foxes, *Vulpes vulpes*, in Lower Austria. Vector Borne Zoonotic Dis, 9:153-155.
79. Scholz H.C., Nöckler K., Göllner C., Bahn P., Vergnaud G., Tomaso H., Al Dahouk S., Kämpfer P., Cloeckeaert A., Maquart M., Zygmunt M.S., Whatmore A.M., Pfeffer M., Huber B., Busse H.J., De B.K. (2010) *Brucella inopinata* sp. nov, isolated from a breast implant infection. Int J Syst Evol Microbiol, 60: 801-808.
80. Scholz H.C., Revilla-Fernández S., Al Dahouk S., Hammerl J.A., Zygmunt M.S., Cloeckeaert A., Koylass M., Whatmore A.M., Blom J., Vergnaud G., Witte A., Aistleitner K., Hofer E. (2016) *Brucella vulpis* sp. nov., isolated from mandibular lymph nodes of red foxes (*Vulpes vulpes*). Int J Syst Evol Microbiol, 66(5): 2090-8.
81. Serikawa T., Iwaki S., Mori M., Muraguchi T., Yamada J. (1989) Purification of a *Brucella canis* cell wall antigen by using immunosorbent columns and use of the antigen in enzyme-linked immunosorbent assay for specific diagnosis of canine brucellosis. J Clin Microbiol, 27: 837–842.
82. Serikawa T., Kondo Y., Takada H., Yamada J. (1984a) Head-to-head type auto-spermagglutination with IgA antibody to acrosome induced by *Brucella canis* infection. Jpn J Vet Sci, 46: 40–48.
83. Serikawa T., Muraguchi T. (1979) Significance of urine in transmission of canine brucellosis. Jpn J Vet Sci, 41: 607.
84. Serikawa T., Muraguchi T., Nakao N., Irie Y. (1978) Significance of urine culture for detecting infection with *Brucella canis* in dogs. Jpn J Vet Sci, 40: 353–355.
85. Serikawa T., Muraguchi T., Yamada J. (1981) Spermagglutination and spermagglutinating activity of serum and tissue extracts from reproductive organs in male dogs experimentally infected with *Brucella canis*. Jpn J Vet Sci, 43: 469–90.

86. Serikawa T., Muraguchi T., Yamada J., Takada H. (1981) Long-term observation of canine brucellosis: excretion of *Brucella canis* into urine of infected male dogs. *Exp Anim*, 30: 7–14.
87. Serikawa T., Takada H., Kondo Y., Muraguchi T., Yamada J. (1984b) Multiplication of *Brucella canis* in male reproductive organs and detection of autoantibody to spermatozoa in canine brucellosis. *Dev Biol Stand*, 56: 295–305.
88. Shin S., Carmichael L.E. (1999) Canine brucellosis caused by *Brucella canis*. In: Carmichael LE, editor. *Recent advances in canine infectious diseases*. Ithaca NY: International veterinary information service
89. Simon R. (2001) *Protein Purification Techniques*. Oxford University Press, Second edition
90. Stević N., Bogunović D., Radojičić S., Valčić M. (2013) Bruceloza pasa na teritoriji Republike Srbije u periodu od 2004. do 2011. godine. *Veterinarski glasnik*, 67(5-6): 395-404.
91. Viera A.J., Garrett J.M. (2005) Understanding Interobserver Agreement: The Kappa Statistic *Fam Med*, 37(5): 360-3.
92. Wanke M.M. (2004) Canine brucellosis. *Anim Reprod Sci*, 82-83: 195-207.
93. Wanke M.M., Delpino M.V., Baldi P.C., Baldi P.C. (2002) Comparative performance of tests using cytosolic or outer membrane antigens of *Brucella* for the serodiagnosis of canine brucellosis. *Vet Microbiol*, 88: 367–375.
94. Wanke M.M., Delpino M.V., Baldi P.C. (2006) Use of enrofloxacin in the treatment of canine brucellosis in a dog kennel (clinical trial). *Theriogenology* 66, 1573-1578.
95. Wanke M.M., Monachesi N.E., Loza M.E., Rutter B., Baldi P.C., Fossati C.A. (2000) Determinacion de anticuerpos contra proteinas citoplasmáticas de *Brucella* por ELISA para la detección de casos crónicos de brucelosis canina. *Selec Vet*, 8: 308–311.
96. Weber A., Christoph H. (1982). Untersuchungen zur natürlichen Übertragung von *Brucella canis* bei Hunden. *Fortschr Veterinarmed*, 35: 351–355.
97. Whatmore A.M., Davison N., Cloeckert A., Al Dahouk S., Zygmunt M.S., Brew S.D., Perrett L.L., Koylass M.S., Vergnaud G., Quance C., Scholz H.C.,

- Dick E.J. Jr., Hubbard G., and Schlabritz-Loutsevitch N. E. (2014) *Brucella papionis* sp. nov., isolated from baboons (*Papio* spp.). *Int J Syst Evol Microbiol*, 64: 4120-4128.
98. [www.ruf.rice.edu](http://www.ruf.rice.edu)
99. Yamauchi C., Suzuki T., Nomura T., Kukita I., Iwaki T., Kazuno W, Ghoda A. (1974) Canine brucellosis in a beagle breeding colony. *Jpn J Vet Sci*, 36(2): 175-82.
100. Ying W., Nguyen M.Q., Jahre J.A. (1999) *Brucella canis* endocarditis: case report. *Clin Infect Dis*, 29: 1593–1594.
101. Zoha S.J., Carmichael L.E. (1982a). Properties of cell wall antigens of virulent *Brucella canis* and a less mucoid variant of reduced pathogenicity. *Am J Vet Res*, 43: 171–174.
102. Zoha S.J., Carmichael L.E. (1982b). Serological responses of dogs to cell wall and internal antigens of *Brucella canis* (*B. canis*). *Vet Microbiol*, 7: 35–50.
103. Živojinović S., Radojičić S., Živojinović M., Kirćanski J. (2006) Ispitivanje rasprostranjenosti bruceloze pasa izazvane bakterijom *Brucella canis* na teritoriji opštine Požarevac. *Veterinarski glasnik*, 60(5-6): 337-344.

## **Biografija**

Nataša Stević je rođena 15.09.1984. godine u Beogradu. Srednju školu „Peta beogradska gimnazija“ u Beogradu završila je 2003. godine. Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu upisala je školske 2003/2004. godine, a diplomirala je u februaru 2010. godine sa prosečnom ocenom 8,84. Doktorske akademske studije na Fakultetu veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu upisala je školske 2010/2011. godine i položila je sve ispite predviđene planom i programom doktorskih akademskih studija sa prosečnom ocenom 9,73. Stipendiju Ministarstva prosvete i nauke dobila je 2011. godine i angažovana je kao istraživač doktorant, a od 2012. godine i zaposlena kao istraživač pripravnik na projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije pod nazivom „Razvoj i standardizacija molekularnih i imunskih metoda u dijagnostici bakterijskih zoonoza“ (ev. br. TR 31088), čiji je rukovodilac prof. dr Sonja Radojičić.

U zvanju asistenta na Katedri za zarazne bolesti životinja i bolesti pčela Fakulteta veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu zaposlena je od 18.03.2015. godine i aktivno učestvuje u izvođenju praktičnog dela nastave.

Kao autor ili koautor do sada je objavila ukupno 15 radova od čega dva rada u časopisima međunarodnog značaja (M23), jedan rad u časopisu nacionalnog značaja (M52), kao i 12 saopštenja štampanih u celini ili u izvodu na skupovima nacionalnog značaja (M63 i M64).

Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписани-а: Наташа Стевић

број уписа: 15/3

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

**„Испитивање поузданости серолошких, бактериолошких и молекуларних метода у дијагностици бруцелозе паса изазване врстом *Brucella canis*“**

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 20.12.2017.

Наташа Стевић

Прилог 2.

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора: Наташа Стевић

Број уписа: 15/3

Студијски програм: Докторске академске студије

Наслов рада: „Испитивање поузданости серолошких, бактериолошких и молекуларних метода у дијагностици бруцелозе паса изазване врстом *Brucella canis*“

Ментор: др Соња Радојичић, редовни професор

Потписани: Наташа Стевић

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 20.12.2017.

Наташа Стевић

Прилог 3.

## Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

**„Испитивање поузданости серолошких, бактериолошких и молекуларних метода у дијагностици бруцелозе паса изазване врстом *Brucella canis*“**

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

У Београду, 20.12.2017.

Потпис докторанда

Наташа Стефан

1. Ауторство - Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. Ауторство – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.