

ORIGINALAN NAUČNI RAD – ORIGINAL SCIENTIFIC PAPER

UDK 636.7.09:616.981.42

ISPITIVANJE PREVALENCIJE ANTITELA NA *B. canis* KOD PASA LUTALICA NA TERITORIJI GRADA BEOGRADA*
INVESTIGATIONS OF PREVALENCE OF ANTIBODIES TO *B.canis* IN STRAY DOGS IN TERRITORY OF BELGRADE

Sonja Radojičić, Milica Čilerdžić, B. Dimić, Jasmina Kirčanski**

Ovim radom obuhvaćeno je ispitivanje pasa lotalica na teritoriji grada Beograda. Na prisustvo antitela specifičnih na *Brucella canis* ukupno je ispitano 184 uzorka krvnih seruma. U dijagnostikovanju se koristila metoda spore aglutinacije u epruveti sa 2-merkaptetanolom. Od 184 ispitana seruma, 49 (26,63%) seruma je imalo titar 1/50, 25 seruma je imalo titar 1/100 (13,58%), dok je 20 seruma imalo titar jednak ili veći od 1/200 (10,87%). Za izolaciju *B. canis* je dostavljeno i 15 uzoraka pune krvi od serološki negativnih životinja. Bakteriološki nalaz ovih uzoraka je bio negativan. Dobijeni rezultati ukazuju da je broj seropozitivnih pasa lotalica na teritoriji Beograda izuzetno visok i da je 10,87 posto testiranih pasa sigurno inficirano bakterijom *Brucella canis*.

Ključne reči: Brucella canis, seroprevalencija, psi lotalice, aglutinacija

Uvod / Introduction

Bruceloza pasa izazvana bakterijom *Brucella canis*, kontagiozna je bolest lančastog načina širenja koja je prisutna u skoro svim zemljama sveta. Uzročnik bolesti je mali G-koobacilus koji je otkriven sredinom šezdesetih godina prošloga veka u SAD [1]. *Brucella canis* je za sada poslednja zvanično priznata vrsta roda *Brucella* koja pokazuje neke jedinstvene karakteristike (izrazita mukoidnost i antigeno izmenjen lipopolisaharidni omotač-RLPS) u odnosu na ostale članove.

* Rad primljen za štampu 3. 4. 2006. godine

** Dr Sonja Radojičić, docent, Katedra za zarazne bolesti životinja i bolesti pčela, Fakultet veterinarske medicine, Beograd; Milica Čilerdžić, dipl. vet., Bane Dimić, dipl. vet. Veterinarska stanica, Beograd; Jasmina Kirčanski, dipl. vet. Katedra za zarazne bolesti životinja i bolesti pčela, Fakultet veterinarske medicine, Beograd

Patogena je za pse i neke divlje karnivore, a na čoveka se prenosi izuzetno retko. Broj prijavljenih slučajeva obolelih ljudi je veoma mali, delom i zbog toga što je *B. canis* zbog svoje različite antigene građe manje patogena od ostalih vrsta brucela. U našoj zemlji su prvi seropozitivni psi otkriveni 1999. godine, a prva uspešna izolacija *B. canis* je izvedena iste godine [2]. Daljim ispitivanjem kućnih pasa ustanovljen je visok stepen seropozitivnih pasa (4,27 posto na uzorku od 164 testirane životinje) [3]. Zatim su istraživanja ukazala da je bolest prisutna i u drugim gradovima, a prevalencija kod pasa lotalica sa teritorije Podgorice je bila izuzetno visoka, 9,37 posto na uzorku od 96 ispitanih seruma [4]. Bruceloza pasa je bolest koja se teško klinički uočava. Činjenica da kod muških pasa izaziva orhitis koji može da bude jednostran ili obostran i da se takav klinički znak lakše uoči, verovatno objašnjava češće otkrivanje bolesti kod mužjaka. Kod ženki dolazi do abortusa u 45. do 55. dana graviditeta, što se često i previdi, jer ženke pojedu pobačene plodove. Smetnje u koncepciji se kod ženskih, a i muških životinja najčešće ne dovode u vezu sa brucelozom pasa, a interesantan je i podatak da se većina obolelih pasa sa teritorije Beograda nikada nije parila. Koitus svakako nije naznačajniji način širenja infekcije, pogotovo u zemljama sa velikim brojem pasa lotalica. Uz to, epizootiološke karakteristike bruceloze na našim prostorima pokazuju specifičnosti koje dosta zavise od toga da li su u pitanju veliki ili manji gradovi i seoske sredine. U velikim gradovima je uobičajen kontakt domaćih pasa i pasa lotalica na zajedničkim zelenim površinama, pa je oronazalni put inficiranja veoma važan. Uz to, urin muških životinja može da bude značajan izvor infekcije, čemu pogoduje i socijalni život i ponašanje pasa. Ženke posle abortusa izlučuju skoro čistu kulturu brucela vaginalnim iscedkom koji traje i nekoliko nedelja posle pobačaja [5]. Sledeći graviditet može da bude naizgled normalan, a rađanje slabo vitalnih mladunaca jedini znak hronične infekcije. Jedan broj preživelih mladunaca sa dostizanjem polne zrelosti može da ispolji kliničku sliku akutne bruceloze, što je posebno opasno sa epizootiološkog aspekta.

Zbog antigene strukture koja je drugačija u odnosu na takozvane S ~klasične brucele~ (uz *B. canis* samo je *B. ovis* primarno patogena u R formi) serološka dijagnostika je vezana za upotrebu homotipskog antigena. Klasičnim testovima za detekciju antitela specifičnih za ostale vrste brucela, nije moguće da se ustanovi serološki odgovor na *B. canis*. Mada se dijagnostikovanje bruceloze pasa u našoj zemlji radi već pet godina na Katedri za zarazne bolesti životinja i bolesti pčela Fakulteta veterinarske medicine, ovo je prvo ispitivanje uzoraka krvnih seruma na prisustvo specifičnih antitela protiv *B. canis* kod pasa lotalica na teritoriji Beograda.

Materijal i metode rada / *Materials and methods*

Krv od pasa lotalica uzimana je punkcijom vene jugularis. Uzorci su dostavljani na Katedru za zarazne bolesti životinja i bolesti pčela Fakulteta veterinarske medicine, na kojoj je nakon centrifugovanja serum odvajan, razlivan u

ependorff epruvete i zamrzavan do dalje obrade. Serumi su ispitivani sporom serumskom aglutinacijom i testirani su u razređenju od 1/50, 1/100 i 1/200 kao što je preporučeno [6]. Antigen za sporu aglutinaciju pravljen je od referentnog soja RM 6/66 po opisanoj proceduri. Ukratko, posle uzgajanja *B. canis* na triptoznom agaru u Rouxovim bocama, kolonije su spirane formalin fiziološkim rastvorom. Suspenzija je filtrirana kroz nekoliko slojeva sterilne gaze da bi se otklonili delovi agara, a zatim je bakterijska suspenzija inaktivisana zagrevanjem na temperaturi od 70°C tokom jednog časa. Posle hlađenja, suspenzija je centrifugovana na 1000xg 30 minuta, supernatant je odbacivan, a istaložene bakterije resuspendovane u formalin fosfatnom slanom puferu. Antigen je standardizovan na 4,5% pakovane ćelijske zapremine, podešavanjem gustine bakterija. Nakon toga, stok antigena je čuvan na temperaturi od +4°C, do upotrebe.

Spora serumaska aglutinacija je rađena u epruvetama na temperaturi od +37°C. Razređenja seruma su pravijena u 3,5% rastvoru NaCl uz dodatak formalin fiziološkog rastvora i 2-merkaptetanola, koji je kao disulfid redukujući agens imao ulogu u razaranju antitela klase IgM. Svaki uzorak krvnog seruma je testiran u tri razređenja. Reakcija je izvođena na temperaturi od 37 °C i očitavana dvokratno, u intervalima od 24 i 48 časova. Kao pozitivno, označavano je svako razređenje seruma u kome je nastalo potpuno razbistravanje tečnosti. Sledeći preporuke u literaturi za ovaj tip testova [6], titri 1/50 i 1/100 su označavani kao sumnjivi, dok je razređenje 1/200 označavano kao znak aktivne infekcije [7]. Kao pozitivne kontrole korišćeni su uzorci krvnih seruma titra od 1/200 i 1/3200, negativnu kontrolu predstavljao je uzorak krvnog seruma koji potiče od klinički i serološki negativne životinje, a rađena je i kontrola antigena bez dodavanja seruma.

Rezultati i diskusija / Results and discussion

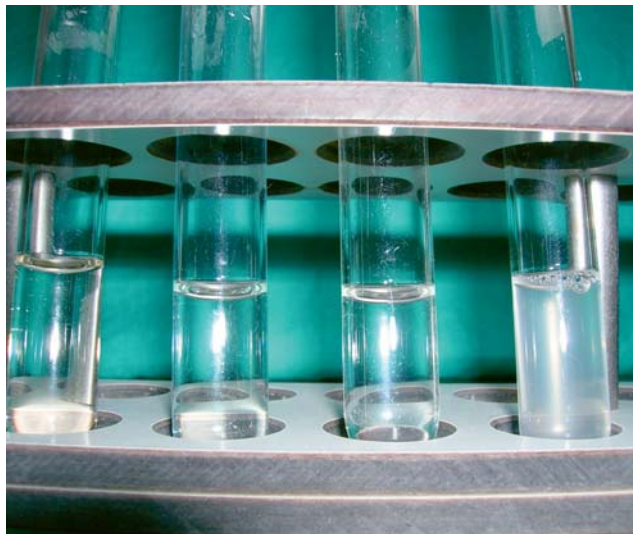
U tabeli 1 prikazani su rezultati ispitivanja krvnih seruma pasa lualica sporim aglutinacionim testom. Kao što se vidi iz tabele, titar antitela od 1/50 ustanovljen je kod 49 uzoraka krvnih seruma ili 26,63 posto, a titar od 1/100 kod 25 krvnih seruma ili 13,58 posto, dok je sigurno pozitivnih (razređenje 1/200) bilo 20 uzoraka krvnih seruma ili 10,87 posto od ukupnog broja testiranih seruma.

Tabela 1. Broj pozitivnih i negativnih rezultata dobijenih testiranjem sporim aglutinacionim testom sa 2-merkaptetanolom

Table 1. Number of positive and negative results obtained by the slow agglutination test with 2-mercaptoethanol

Test (spora aglutinacija u epruveti sa 2-merkaptetanolom) / Test (slow tube agglutination test with 2-mercaptoethanol)	Broj pozitivnih uzoraka seruma u datom titru, % / Number of positive sera in given titer, %	Broj negativnih uzoraka seruma u datom titru, % / Number of negative sera in given titer, %
Titar 1/50 / Titer 1/50	49 26,63%	135 73,37%
Titar 1/100 / Titer 1/100	25 13,58%	159 86,42%
Titar 1/200 / Titer 1/200	20 10,87%	164 89,13%
Ukupno testirano / Total tested	184 100%	

Na slici 1 prikazan je izgled pozitivne i negativne reakcije.



Slika 1. Izgled spore serumske aglutinacije u epruveti sa 2-merkaptetanolom
Figure 1. View of slow serum agglutination in test tube with 2-mercaptoethanol

Legenda: S leva na desno, izgled pozitivne reakcije u razređenjima 1/50, 1/100 i 1/200. Poslednja epruveta predstavlja negativnu kontrolu.

Legend: Left to right, positive reaction in dilutions 1/50, 1/100 and 1/200. Last test tube shows negative control.

Upotreba 2-merkaptetanola se uvek preporučuje kako bi se povećala specifičnost reakcije. Međutim, povećanje specifičnosti, uzrokuje smanjenje osetljivosti testa. S obzirom da je dijagnostikovanje bruceloze pasa veoma teško, odlučili smo se za povećanje specifičnosti i korišćenje merkaptetanola koji razara disulfidne veze u IgM pentamerima, koji su najčešći uzrok lažno pozitivnih reakcija. Ovakav izbor određen broj stvarano pozitivnih uzoraka krvnih seruma može da ostavi u zoni lažno negativnih, pa se testiranje uzoraka parnih krvnih seruma u svim sumnjivim slučajevima nameće kao obavezno. Dijagnostika bruceloze pasa nije standardizovana na međunarodnom nivou, pa zbog toga ne mogu precizno da se odrede parametri upotrebljenog testa. Zato se za poređenje testova koristi *kappa* statistička analiza koja nam pruža podatke o saglasnosti testova [3]. Izolacija uzročnika, kao najbolji i nasigurniji dijagnostički put, u većini slučajeva ne može da se sprovede zbog široke upotrebe antibiotika i antiinflamatornih lekova. Kod pasa lotalica najčešće nije moguće da se dođe do uzoraka krvi ili organa. Pored toga, izolacija brucela konvencionalnim bakteriološkim tehnikama je dugotrajna, rizična za laboratorijske radnike i niskog stepena uspešnosti zbog česte kontaminacije materijala. Izolacija brucela iz visoko kontaminisanog materijala često nije uspešna i pored primene selektivnih podloga [12]. Petnaest uzoraka pune krvi koji su dostavljeni radi eventualne izolacije *B. canis*, bilo je bakteriološki negativno. Uzorci su poticali od serološki negativnih životinja.

Dobijeni rezultati ukazuju da je prevalencija sigurno pozitivnih životinja izuzetno visoka i da je veća za 2.5 puta od one koja je utvrđena kod kućnih pasa na teritoriji grada Beograda [4]. Ovako veliki broj inficiranih pasa ustanovljen je u nekim zemljama Latinske Amerike (Meksiko) i nekim područjima Severne Amerike u kojima je seroprevalencija od 1 do blizu 19 posto sa najvišom ustanovljenom u ruralnim delovima južnih država [8, 9, 10]. U Japanu je seroprevalencija bila od 1,6 do 2,9 posto [11]. Prevalencija antitela na *B. canis* kod pasa lotalica na teritoriji Podgorice i Beograda gotovo je ista. Međutim, značajno odstupanje u dobijenim vrednostima se uočava za titar 1/50. Za razliku od rezultata dobijenih na teritoriji Podgorice (12,5% testiranih titar 1/50), broj seruma koji su pozitivni u titru 1/50 bio je za 2.44 puta veći od stvarno pozitivnih (titar 1/200). Upravo ovako veliko variranje u dobijenim vrednostima sumnjivih i stvarno pozitivnih ukazuje na potrebu stalne kontrole i tačnog dijagnostikovanja bolesti.

Pored pasa lotalica, veliki značaj u širenju i održavanju bolesti imaju i psi poznatih vlasnika, kod kojih se bolest ne dijagnostikuje i ne leči na pravi način. Nakon kratkotrajne upotrebe antibiotika bez adekvatno postavljene dijagnoze, bolest najčešće recidivira, što se ispoljava bilo ponovnim pojavljivanjem orhitisa kod mužjaka ili poremećajima u koncepciji kod ženki. Spektar kliničkih manifestacija kod hronične bruceloze pasa varira od generalizovane limfadenopatije, promena na koštano-zglobnom sistemu, diskospondilitisa i uveitisa. Kako je *B. canis* fakultativno intracelularna bakterija, to se pored tačno odabranih antibiotika (najčešće streptomycin i tetraciklini) koji se daju u periodu od mesec dana, zahteva i kastracija, odnosno ovarijehisterektomija svih inficiranih životinja. Epi-

zootiološka situacija bruceloze pasa je nepovoljna, ali i očekivana uzimajući u obzir primenu mera, broj pasa lualica i nedostatak pravovremenog i tačnog dijagnostikovanja. Pored napretka koji je postignut uvođenjem obaveznog testiranja pasa koji imaju reproduktivne probleme na *B. canis*, potrebno je da se sprovede dijagnostička ispitivanja i usklade kriterijumi kod procene rezultata i utvrđivanja imunološkog statusa inficiranih jedinki.

Literatura / References

1. Carmichael L. E. Kenny R. M.: Canine abortion caused by *Brucella canis*. J.A.V.M.A. 152, 6, 605-616, 1968. - 2. Radojičić Sonja, Lako B., Valčić M.: Bruceloza pasa stanje i mogućnost praćenja trenutne epizootiološke slike, I jugoslovenski epizootiološki dani, Žabljak, 10:13 oktobra, 120-122, Zbornik radova, 1999. - 3. Radojičić Sonja: Serološka dijagnostika infekcija izazvanih sa *Brucella canis* i procena epizootiološke situacije. Doktorska disertacija, Fakultet veterinarske medicine, Beograd, 2000. - 4. Radojičić Sonja, Laušević D., Žiković B., Đuričić Bosiljka: Serološka dijagnostika infekcija izazvanih sa *Brucella canis* kod pasa lualica na teritoriji opštine Podgorice, Vet. Žurnal Republike Srpske, 2, 3-4, 78-81, 2002. - 5. Carmichael L. E. Kenny R. M.: Canine brucellosis. Clinical disease, pathogenesis and immune response J.A.V.M.A. 156, 12, 1726-1733, 1970. - 6. Alton GG, Jones, LM, Angus, RD, Verger, JM. 1988.: Techniques for the brucellosis laboratory, INRA, 169-174, 1988. - 7. Badakhsh F. F., Carmichael L. E., Douglas J. A.: Improved rapid slide agglutination test for presumptive diagnosis of canine brucellosis J. Clin. Microbiol. 15. 286-289, 1982. - 8. Brown J., Blue J. L., Wooley R. E. et al.: A serologic survey of a population of Georgia dogs for *Brucella canis* and evaluation of the slide agglutination test J.A.V.M.A. 169, 11, 1214-16, 1976. - 9. Galphin S. P. Jr.: A serological survey for *Brucella canis* in dogs on military base. JAVMA, 171, 8, 728-729, 1977. - 10. Flores Castro R., Suarez F., Ramirez Pfeiffer, Carmichael L. E.: Canine brucellosis: Bacteriological and serological investigation of naturally infected dogs in Mexico City, J. Clin. Microbiol. 6, 6, 591-597, 1977. - 11. Serikawa T., Takada H., Kondo Y., et al.: Multiplication of *Brucella canis* in male reproductive organs and detection of autoantibody to spermatozoa in canine brucellosis. Develop. Biol. Standard. 56, 295-305, 1984. - 12. Nilsen K., Duncan J. R.: In Animal brucellosis, Chapter *Brucella canis*, Eds Boca Raton, CRC Press. 1990.

ENGLISH

INVESTIGATIONS OF PREVALENCE OF ANTIBODIES TO *B.canis* IN STRAY DOGS IN TERRITORY OF BELGRADE

Sonja Radojicic, Milica Cilerdzic, B.Dimic, Jasmina Kircanski

The paper covers investigations ofn stray dogs in the territory og thr city of Belgrade. A total of 184 blood serum samples were examined for the presence of antibodies specific to *Brucella canis*. The method of slow agglutination in a test tube with 2-mercaptoethanol was used in the diagnostic procedure. Of the 184 examined serums, 49 (26.63%) had a titer of 1/50, 25 serums had a titer of 1/100 (13.58%), while 20 serums had a titer equal to or bigger than 1/200 (10.87%). Furthermore, 15 samples of full blood from serologically negative animals were also presented for isolation. The bacteriological finding for

these samples was negative. The obtained results indicate that the number of seropositive stray dogs in the territory of Belgrade is extremely high and that 10.87% of the tested animals are definitely infected with *Brucella canis*.

Key words: *Brucella canis*, seroprevalence stray dogs, agglutination

РУССКИЙ

ИСПЫТАНИЕ ПРЕОБЛАДАНИЯ АНТИТЕЛ НА *B. CANIS* У БРОДЯЧИХ СОБАК НА ТЕРРИТОРИИ ГОРОДА БЕЛГРАДА

Соня Радоичич, Милица Чилерджич, Б. Димич, Ясмينا Кирчански

Этой работой охвачено нами испытание бродячих собак на территории города Белграда. на присутствие антител специфических на *Brucella canis* испытано нами совокупно 184 кровяных сывороток. В диагностике использован метод медленной агглютинации в пробирке с 2-меркантоэтанолом. Из 184 испытанных сывороток, их 49 (26,63 %) имели титр 1/50, 25 сывороток имели титр 1/100 (13,58%) пока 20 сывороток имели титр одинаковый или больший от 1/200 (10,87%). Для изоляции доставлено нами и 15 образчиков полной крови от серологически отрицательных животных. Бактериологические результаты этих образчиков были отрицательные. Полученные результаты указывают, что число сероположительных бродячих собак на территории Белграда исключительно высокое и что 10,87% тестируемых наверно инфицировано с *Brucella canis*.

Ключевые слова: *Brucella canis*, серопреобладание, бродячие собаки, агглютинация