

**ISPITIVANJE RASPROSTRANJENOSTI BRUCELOZE PASA
IZAZVANE BAKTERIJOM *BRUCELLA CANIS* NA TERITORIJI
OPŠTINE POŽAREVAC***
*INVESTIGATIONS OF SPREAD OF CANINE BRUCELLOSIS CAUSED
BY BRUCELLA CANIS IN TERRITORY OF MUNICIPALITY OF
POŽAREVAC*

S. Živojinović, Sonja Radojičić, Milena Živojinović, Jasmina Kirćanski**

*U radu je ispitano prisustvo i rasprostranjenost infekcija izazvanih bakterijom *Brucella canis* kod različitih kategorija pasa na teritoriji opštine Požarevac. Ukupno je ispitan 151 pas, od toga je 74 krvnih seruma poticalo od pasa poznatih vlasnika i 77 od pasa lotalica. Ispitivanja su obavljena i na 40 uzoraka pune krvi pasa lotalica, kao i na organima fetusa i reproduktivnim organima serološki pozitivne ženke posle izvedene histerektomije. Ispitivanja su obuhvatila klinički pregled pasa, brzu serumsku aglutinaciju, sporu serumsku aglutinaciju i izolaciju uzročnika. Od svih ispitanih pasa pozitivan rezultat brzim aglutinacionim testom dalo je 16,55 posto ispitanih uzoraka, sporim aglutinacionim testom 11,25 posto, što je izuzetno veliki procenat u odnosu na druge regione naše zemlje. Antibiotička terapija, zoohigijenske mere, kastracija, odnosno histerektomija (izbeći recidive i prekinuti lanac prenošenja infekcije) uslov su za iskorenjivanje oboljenja. Neophodna je kontrola pasa lotalica koji predstavljaju osnovni izvor infekcije. Rezultati dobijeni u toku ovog istraživanja ukazuju na potpunu opravdanost uvrščavanja ove zarazne bolesti u grupu oboljenja obaveznih za prijavljivanje.*

*Ključne reči: psi, *Brucella canis*, serološko ispitivanje, opština Požarevac*

* Rad primljen za štampu 11. 12. 2006. godine

** Slobodan Živojinović, vet. spec. (JVS, Požarevac); dr Sonja Radojičić, docent, Katedra za zarazne bolesti životinja i bolesti pčela, Fakultet veterinarske medicine, Beograd; mr Milena Živojinović, VSI „Požarevac”, Požarevac; Jasmina Kirćanski, dipl. vet., Katedra za zarazne bolesti životinja i bolesti pčela, Fakultet veterinarske medicine, Beograd

Uvod / Introduction

Bruceloza pasa je kontagiozno oboljenje izazvano fakultativno intracelularnom bakterijom *Brucella canis*. Pored pasa može da oboli i čovek, što povećava značaj rada na otkrivanju i suzbijanju ove bolesti. Bakterija je prvi put izolovana 1966. godine u SAD kao uzročnik enzootskog abortusa kuja, a zatim i u drugim zemljama sveta.

Prvi serološki pozitivni slučajevi u našoj zemlji otkriveni su 1998. godine, a prva uspešna izolacija *Brucella canis* je obavljena 1999. godine. Sva istraživanja ove problematike uglavnom su obavljena na teritoriji Beograda, gde je ustanovljen relativno visok stepen prevalencije i to kod pasa poznatih vlasnika, kao i na teritoriji Crne gore, područje Podgorice, gde su otkriveni serološki pozitivni psi iz kategorije pasa lotalica. *Brucella canis* je prvi put izolovana na teritoriji SCG 2000. godine. Izolat je označen kao *Brucella canis* soj SR-1 [4].

Smatra se da se bolest širila putem međunarodnih izložbi i parenjem pasa koji se zbog ekonomskih razloga transportuju širom sveta. Ulazna vrata infekcije su genitalni organi, konjunktiva i sluznica usne i nosne duplje. Tri nedelje posle infekcije bakterije se pojavljuju u krvi životinje (bakterijemija), gde se zadržavaju neko vreme. Ako je životinja gravidna, bakterije odlaze u matericu zato što placenta predstavlja tropno tkivo. Zato se često dešava da takve životinje ne stvore antitela i tada su serološki negativne sve do nekoliko dana pre pobačaja. Ako životinja nije gravidna, brucele posle prodiranja u organizam dospevaju u krv, gde se zadržavaju u dužem vremenskom periodu bez pojavljivanja kliničkih simptoma.

Inkubacija je neodređena. Nikada nije kraća od dve nedelje, a u proseku traje od nekoliko nedelja do nekoliko meseci. Kliničkim pregledom se često nađe otok retrofaringealnih limfnih čvorova. Kod ženskih životinja se javlja pobačaj između sedme i devete nedelje graviditeta, sa mukoidnim, serohemoragičnim ili sivozelenim vaginalnim iscetkom koji može da traje preko šest nedelja [1]. Kod pasa koji još nisu dostigli polnu zrelost osnovna klinička manifestacija je generalizovani limfadenitis [3]. Kod muških životinja se javlja epididimitis oko pet nedelja posle inficiranja. Patološke promene na spermatozoidima uočavaju se od 18 do 27 nedelje i manifestuju se oštećenjem akrozoma, deformacijom spermatozoida sa zadržanom protoplazmatičnom kapljicom, deformacijom repa, glave, aglutinacijom glava na glavu [2]. Ostale promene obuhvataju prostatitis, atrofiju testisa i zapaljenje kože skrotuma sa pojavom lezija zbog lizanja bolnog mesta [6].

Prevremeno rođena štenad je najčešće slaba i uginu za 24 do 48 časova. U nekim slučajevima, mladunci koji su verovatno inficirani intrauterino, preživljavaju i imaju uvećane limfne čvorove kao jedini vidljivi znak bolesti. Limfni čvorovi su uvećani i edematozni zbog limfoidne hiperplazije i granulomatozne inflamacije [4]. Ne tako često mogu da se jave diskospondilitis, poliartritis, glomerulonefritis i rekurentni uveitis anterior sa edemom rožnjače.

Ni jedna antibiotska terapija nije sto posto efikasna i često se obolje-nje ponovo javlja kod životinja koje su bile naizgled izlečene. Najčešće se mužjaci i ženke kastriraju, pri čemu se samo prekida prenošenje uzročnika. Enrofloksacin i aminoglikozidi, doksiciklin (tetraciklin) i streptomycin su pokazali sinergizam, dok su doksiciklin (tetraciklin) i rifampicin bili antagonisti.

Da bi došlo do pojavljivanja kliničkih simptoma bolesti kod ljudi potreban je veliki broj bakterija, tj. visoka infektivna doza. Česti simptomi su nelagodnost, bolovi u grlu, drhtavica, glavobolja, mučnina, bolovi u mišićima i zglobovima. Zapažen je gubitak telesne mase i uvećanje limfnih čvorova [8].

Za izolaciju *B. canis* najbolje je da se u laboratoriju pošalju pobačeni fetusi. Uzorci želudačnog sadržaja fetusa, slezina, jetra i fetalna membrana moraju da se uzorkuju aseptično u sterilnim kontejnerima. Takođe može da se pošalje i vaginalna sluz i mleko životinja koje su pobacile. Od mužjaka seme, testis, puna krv, epididimis, sadržaj prostate i urin je najbolji materijal za izolaciju. Uzorci se transportuju na ledu. Kod ženki se uzorkuje puna krv, vaginalni iscedak, placenta i urin [1]. Izolacija *B. canis* je moguća iz krvi, pobačenih fetusa, placente, limfnih čvorova, slezine, reproduktivnih organa mužjaka, semena, vaginalnog iscedka i materice. Postoje podaci o mogućoj izolaciji i iz kostne srži, mleka i urina [Eilts, 2003].

Diferencijalno-dijagnostički dolaze u obzir: trihomonijaza, neosporoza, vibrioza (*Campilobacter*), leptospiroza, mikoze (*Aspergillus*, *Absidia*) i listerioza.

Materijal i metode rada / *Materials and methods*

Ispitano je 74 krvna seruma pasa poznatih vlasnika i 77 krvnih seruma pasa lualica sa teritorije opštine Požarevac. Ispitano je i 40 uzoraka pune krvi pasa lualica. Za potrebe seroloških ispitivanja krv je uzorkovana u sterilne vakutejnere iz *vena cephalica antebrachii*. Posle odvajanja krvnih seruma oni su alikvotirani i čuvani na temperaturi od -20°C do izvođenja testa. Radi izolacije, krv je uzorkovana sterilno iz *vena cephalica antebrachii* u sterilne bočice sa dodatkom natrijum citrata. Uzorci pune krvi su čuvani na temperaturi od -20°C do izvođenja testa.

Serumi prikupljeni od pasa lualica i pasa poznatih vlasnika, testirani su preporučenim testovima i to prvo brzom serumskom aglutinacijom na pločici. Korišćena je jedna kap obojenog antigena i jedna kap krvnog seruma koji se ispituje. Posle njihovog mešanja očitavana je reakcija u roku od dva minuta. Pojava aglutinata označavana je kao pozitivna reakcija. Zbog specifičnih antigenih karakteristika *B. canis* koristio se homotipski antigen. Serumi pasa koji su dali pozitivne rezultate na brzom aglutinacionom testu testirani su sporom serumskom aglutinacijom sa 2-merkaptetanolom.

Spora serumska aglutinacija izvođena je na temperaturi od 37 °C i reakcija je očitavana na 24 i 48 časova. Testirana su razređena: 1/50, 1/100 i

1/200. Ukoliko su serumi imali pozitivnu reakciju u razređenju 1/200, rađena je dalja titracija (1/400, 1/800, 1/1600). Potpuno razbistravanje tečnosti u epruveti tumačeno je kao pozitivna reakcija. Svi serumi sa titrom jednakim ili većim od 1/200 proglašavani su kao pozitivni. Takođe su se koristili i Rose bengal test i mikro aglutinacija radi provere prisustva antitela na klasične brucele.

Izolacija *B. canis* je izvedena na Katedri za zarazne bolesti životinja i bolesti pčela Fakulteta veterinarske medicine u Beogradu po preporukama iz literature [9]. Od sterilno uzetih uzoraka krvi (njih 35) nije izolovana *B. canis*. Ovo se i očekivalo, s obzirom da su serumi ovih životinja bili serološki negativni. Uzorak seropozitivne ženke koji je uzet pre početka antibiotske terapije, kao i jedan broj seronegativnih uzoraka pune krvi (njih 5), morao je da bude eliminisan zbog nepropisnog pakovanja u staklene epruvete koje nisu bile predviđene za duboko zamrzavanje. Krv serološki pozitivne ženke, organi fetusa, reproduktivni organi uzorkovani posle histerektomije su bili bakteriološki negativni, što je najverovatnije bila posledica efikasnog antibiotskog tretmana.

Klinički pregled se sastojao iz dva dela. Prvi deo pregleda, koji je obuhvatao anamnezu i nacional, obavljen je kod pasa poznatih vlasnika kojih je bilo 74. Drugi deo pregleda, koji se odnosio na određivanje habitusa i trijasa, urađen je kod svih pasa.

Rezultati i diskusija / Results and discussion

Prvi deo kliničkog pregleda u koji se ubrajaju anamneza i nacional, bilo je moguće izvesti jedino na grupi pasa poznatih vlasnika.

Svi ispitani psi poznatih vlasnika, od kojih je bilo 52 mužjaka i 22 ženke, bili su polno zreli. Od toga su 18 mužjaka i 6 ženki bili rasni psi. Ostali ispitivani psi bili su mešanci. Ukupno se 19 ženki štenilo, a njih tri nikada nije pokazivalo znake estrusa. U grupi rasnih mužjaka, 15 je pareno pod kontrolom vlasnika i ordinirajućeg veterinara, dok za mešance vlasnici nisu bili u mogućnosti da daju tačne podatke. Deo rasnih pasa, njih 16 je barem jedanput bilo na nekoj izložbi, smotri ili utakmici, što je podatak od značaja zbog mogućeg dolaska u kontakt sa velikim brojem drugih pasa sa različitih teritorija (ne samo naša opština, okrug, država, već i okolne zemlje). Svi su bili uredno vakcinisani protiv besnila. Telesna građa kao odraz povezanosti i razvijenosti koštanog i mišićnog tkiva podelila je grupu pasa poznatih vlasnika u grupu sa dobrom (70 pasa) i grupu sa lošom telesnom građom (4 psa). Na osnovu određivanja habitusa koji predstavlja stanje životinje u momentu pregleda, moglo se reći da je veći deo pasa bio solidne telesne građe. Dobijanjem rezultata u testu merenja brzine i stepena reagovanja na nadražaje iz spoljašnje sredine klasifikovali smo 65 pasa kao živahne i 9 pasa kao flegmatične. Ispitivanjem položaja tela u prostoru i konstitucije kao delova habitusa utvrdili smo kod svih pasa da su te karakteristike u granicama normale, odnosno dobre.

S obzirom da se u drugoj ispitanoj grupi radilo o lualicama odmah smo pristupili drugom delu kliničkog pregleda, a to je opšte ispitivanje životinje

koje je i najinteresantnije za kliničare (*Status praesens*). Rezultati dobijeni u grupi pasa lotalica u opštim ispitivanjima kojima smo obuhvatili habitus i trijas (temperatura, puls i disanje) pokazali su da je od ispitanih 77 pasa lotalica dobru telesnu građu imalo njih 63, dok je sa lošom bilo njih 14. Temperamentnih je bilo 72, a flegmatičnih 5. Položaj tela u prostoru i konstitucija kod svih ispitanih pasa lotalica su bile dobre. Temperatura je merena maksimalnim termometrom sa Celzijusovim podeocima, rektalno, kod odmornih pasa i uvek je bila u granicama normale (37,5-38,5°C) kod obe ispitujuće grupe pasa. Puls i disanje su bili u granicama normale.

Od svih ispitanih pasa izdvojen je jedan, i to mešanac, ženka, stara oko pet godina koja je u momentu prvog kliničkog pregleda i prvog uzorkovanja krvi bila gravidna. Pripadala je grupi pasa sa dobrom telesnom građom, a u odnosu na temperament moglo se reći da je flegmatična, dobre konstitucije. Ženka je imala temperaturu 37,8 °C, puls je bio 100-110 otkucaja u minutu, a frekvencija disanja je bila 22-25 ekspiracija u minutu. Dobijeni parametri su varirali u zavisnosti od momenta pregleda (pre i posle štenjenja), ali su se uvek nalazili u granicama normale.

Uzorci seruma koji su dali pozitivnu reakciju u brzom aglutinacionom testu, testirani su sporom serumskom aglutinacijom sa 2-merkaptetanolom. Takvih seruma bilo je ukupno 25. Ispitivana razblaženja seruma bila su 1/50, 1/100, 1/200, 1/400, 1/800. Isti broj pasa imao je titar 1/50 i 1/100, po 4 psa (16 %), 17 uzoraka bilo je sa titrom jednakim ili većim od 1/200 (68 %), a od ukupnog broja ispitanih seruma pasa lotalica kojih je bilo 77, sa titrom jednakim ili većim od 1/200 bilo je 17 pasa (22,07 %). Ti psi su proglašavani pozitivnim. Čak 8 pasa (32 %) imalo je titar specifičnih antitela 1/400, dok je kod jednog (4%) titar bio 1/800.

Tabela 1. Rezultati ispitivanja krvnih seruma pasa lotalica sporim aglutinacionim testom sa 2-merkaptetanolom /

Table 1. Results of examinations of blood serum of stray dogs using slow agglutination test with 2-mercaptoethanol

Ispitujuća rezređenja seruma / <i>Serum dilutions used</i>	Broj pasa / <i>Number of dogs</i>	Procenat, %
1/50	4	16
1/100	4	16
1/200	8	32
1/400	8	32
1/800	1	4
Ukupno / <i>Total</i>	25	100

Od svih ispitanih pasa, pozitivan rezultat brzim aglutinacionim testom dalo je 25 uzoraka (16,55%). Sporim aglutinacionim testom obuhvaćeni su samo serumski pas lotalica koji su dali pozitivan rezultat brzim aglutinacionim testom. Od

77 pasa lualica titar 1/200 i veći dalo je 17 uzoraka (22,07%). Na celom uzorku (151) ovaj procenat je 11,25 posto.

Rezultat prvog ispitivanja kod izdvojene ženke bio je 1/400, a posle terapije titar je pao na 1/100. Nedelju dana posle završetka terapije kuja je oštenila 6 štenadi, pri čemu su dva bila mrtvorodena, a četiri je uginulo u roku od sedam dana. Neposredno pre operacije titar antitela na *B. canis* je bio manji od 1/50.

U toku naših ispitivanja ustanovili smo: izuzetno veliki procenat serološki pozitivnih pasa lualica na teritoriji opštine Požarevac u odnosu na druge regione SCG i ne postojanje oboljenja kod pasa poznatih vlasnika (zbog ograničenog kretanja, tako da nisu imali mogućnost kontakta sa psima lualicama). Nije ustanovljena korelacija između dobijenih rezultata i dela grada u kome su se nalazili serološki pozitivni psi. Serološka dijagnostika pasa zasniva se na nekoliko metoda, ali ni jedna nije potpuno pouzdana, pa je izolacija najsigurnija dijagnostička metoda. Ipak, serološki pregledi su neophodni za novonabavljene životinje. Međunarodno preporučeni serološki protokol određuje titar 1/200 kao sigurno pozitivan znak aktivne infekcije. Antibiotička terapija, zoohigijenske mere isključenje iz reprodukcije uslov su za iskorenjivanje oboljenja. Poštovanje propisanih doza i načina aplikacije preparata po preporuci proizvođača prilikom tretmana serološki pozitivnih životinja uslov je uspešne terapije čime se smanjuje nastajanje recidiva. Zbog izuzetno visokog broja serološki pozitivnih pasa na teritoriji opštine Požarevac, neophodno je da se smanji broj pasa lualica koji predstavljaju osnovni izvor infekcije. Uz terapiju obavezno bi trebalo da se primeni i kastracija, odnosno histerektomija, kako bi se izbegli recidivi i prekinuo lanac prenošenja infekcije.

Sprovedena serološka ispitivanja isključila su postojanje pozitivnih pasa na klasične brucele (*B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*). Bruceloza pasa izazvana bakterijom *B. canis* u vreme izrade ovog rada nije bila predviđena postojećim zakonskim propisima za prijavljivanje. Rezultati dobijeni u toku ovog istraživanja ukazuju na potpunu opravdanost uvršćivanja ove zarazne bolesti u grupu oboljenja obaveznih za prijavljivanje. Uzimajući u obzir činjenicu da *Brucella canis* ima i zoonozni karakter, mogućnost dijagnostike ovog oboljenja imala bi pored velikog epizootiološkog značaja i epidemiološku vrednost. Ta istraživanja bi isključila i druge vrste brucela i odredila eventualnu ulogu pasa kao prenosilaca bolesti.

Literatura / References

1. Geering W. A., Forman A. J., Nunn M. J.: Exotic Diseases of Animals. Aust Gov Publishing Service, Canberra, 440, 1995. - 2. Serikawa T., Takada H., Kondo Y., Muragichi T., Yamada J.: Multiplication of *Brucella canis* in male reproductive organs and detection of autoantibody to spermatozoa in canine brucellosis. Develop Biol. Standard. 56, 295-305, 1984. - 3. Carmichael L., Greene E.: Infectious disease of the dog and cat. Philadelphia, PA:WB Saunders, 248-257, 1998. - 4. Radojičić Sonja: Imunodijagnostički testovi u otkrivanju infekcije pasa izazvanih sa *Brucella canis* i njihov značaj u proceni epizootiološke

situacije. Doktorska disertacija Univerzitet u Beogradu fakultet veterinarske medicine, 2000. - 5. Lolin Miroslava: Zarazne bolesti životinja bakterijske etiologije. Univerzitet u Beogradu, 68-78, 1989. - 6. Faron C., Faron E.: The Threat of Canine Brucellosis: Myth or Menace; 7. Bruce E., Eilts 2003. Canine Brucellosis. University of Georgia Notes, 319-320, 1995. - 8. Carmichael L.: Brucellosis (*Brucella canis*) Appendix 4. in CRC Handbook Series in Zoonoses, Section A: Bacterial, Rickettsial and Mycotic Diseases, I, CRC Press, 180-194, 1979. - 9. Alton G. G. i sar.: Techniques for the Brucellosis laboratory. INRA Paris, 1988.

ENGLISH

INVESTIGATIONS OF SPREAD OF CANINE BRUCELLOSIS CAUSED BY *BRUCELLA CANIS* IN TERRITORY OF MUNICIPALITY OF POŽAREVAC

S. Živojinovic, Sonja Radojicic, Milena Živojinovic, Jasmina Kircanski

The paper examines the presence and distribution of infections caused by *Brucella canis* in different categories of dogs in the territory of the Municipality of Požarevac. A total of 151 dogs were examined, and 74 blood serums originated from dogs of known owners and 77 from stray dogs. The investigations were carried out also on 40 samples of full blood of stray dogs, as well as fetal organs and reproductive organs of a serologically positive female following hysterectomy. Investigations included a clinical examination of the dogs, rapid serum agglutination, slow serum agglutination, and isolation of the cause. In all the examined dogs, the rapid agglutination test gave a positive result in 16.55% of the examined samples, the slow agglutination test 11.25%, which is an extremely high percentage in comparison with other regions of our country. Therapy using antibiotics, zoohygienic measures, castration or hysterectomy (as attempts to avoid residue and break the chain of the transfer of the infection) are conditions for eradicating the disease. Control of stray dogs is necessary, as they present the basic source of the infection. The results obtained in the course of these investigations indicate the absolute justification of including this contagious disease in the group of diseases whose reporting is compulsory.

Key words: Dogs, *Brucella canis*, serological examinations, Municipality of Požarevac

РУССКИЙ

ИСПЫТАНИЕ РАСШИРЁННОСТИ БРУЦЁЛЛЕЗА СОБАК, ВЫЗВАННОГО С *BRUCELLA CANIS* НА ТЕРРИТОРИИ ОБЩИНЫ ПОЖАРЕВАЦ

С. Живоинович, Соня Радоичич, Милена Живоинович, Ясмينا Кирчански

В работе испытано нами присутствие и расширённость инфекций, вызванных с *Brucella canis* у различных категорий собак на территории общины Пожаревац. Совокупно нами испытана 151 собака, из њтого 74 кровяных серумов происходило из собак известных владельцев и 77 из бродячих собак. Испытания совершены и на 40 образчиков полной крови бродячих собак, словно и на органах плода и репродуктивных органах серологически положительные самки после совершённой истерэктомии. Испытания охватили клинический осмотр собак, быструю

серумную агглютинацию, медленную серумную агглютинацию и изоляцию возбудителя. Из всех, испытанных собак положительный результат быстрым агглютинационным тестом дало 16,55%, испытанных образчиков, медленным агглютинационным тестом 11,26%, что исключительно большой процент в отношении других регионов нашей страны. Антибиотическая терапия, зооигиенические меры, кастрация, то есть истерэктомия (избежать рецидивы и прекратить цепь перенесения инфекции) условие для искоренения заболевания. Необходим контроль бродячих собак, представляющие собой основной источник инфекции. Результаты, полученные в течение этого исследования указывают на полное оправдание включения этой заразной болезни в группу заболеваний, обязательных для прописки.

Ключевые слова: собаки, *Brucella canis*, серологическое испытание, община Пожаревац