

**UNIVERZITET U BEOGRADU
FAKULTET VETERINARSKE MEDICINE**

Ivan M. Pušić

**IZOLACIJA, IDENTIFIKACIJA I MOLEKULARNA
KARAKTERIZACIJA UZROČNIKA TUBERKULOZE GOVEDA U
VOJVODINI**

Doktorska disertacija

Beograd, 2016.

**UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE**

Ivan M. Pušić

**ISOLATION, IDENTIFICATION AND MOLECULAR
CHARACTERIZATION
OF CAUSATIVE AGENT OF BOVINE TUBERCULOSIS IN
VOJVODINA REGION**

PhD thesis

Belgrade, 2016.

MENTOR:

- **prof. dr Sonja Radojičić**, redovni profesor
Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu, Beograd

Članovi komisije:

- dr Dušan Mišić, vanredni profesor,
Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu, Beograd
- prof. dr Dušan Lalošević, redovni profesor
Medicinski fakultet Univerziteta u Novom Sadu
- dr Igor Stojanov, viši naučni saradnik
Naučni institut za veterinarstvo "Novi Sad", Novi Sad

Datum odbrane:

IZOLACIJA, IDENTIFIKACIJA I MOLEKULARNA KARAKTERIZACIJA UZROČNIKA TUBERKULOZE GOVEDA U VOJVODINI

REZIME

Cilj istraživanja bio je da se izvrši izolacija, identifikacija i molekularna karakterizacija, uzročnika tuberkuloze goveda u Vojvodini, kao i ispitivanje osetljivosti izolovanih sojeva na odabrane antituberkulozne antibiotike koji se koriste za terapiju tuberkuloze ljudi u našoj zemlji. Pored toga cilj istraživanja bilo je i uporedno ispitivanje osetljivosti i specifičnosti γ -IFN testa u dijagnostici tuberkuloze sa klasičnim mikrobiološkim metodama izolacije i identifikacije uzročnika. Konačno, na osnovu ispitivanja raširenosti, incidencije i prevalencije oboljenja u zapaćima cilj je bila i izrada aktuelne epizootiološke karte raširenosti tuberkuloze goveda u Vojvodini.

Za izolaciju bakterija MTB-kompleksa korišćeni su uzorci tkiva (pluća i limfni ćvorovi) 49 goveda koja su prilikom izvođenja komparativnog tuberkulinskog ili γ -IFN testa imala pozitivnu reakciju. Kod 40 od ovih grla prilikom patomorfološkog pregleda na liniji klanja, bile su ustanovljene promene koje mogu ukazivati na tuberkulozu. Bakterije MTB-kompleksa uspešno su izolovane iz uzoraka tkiva 19 goveda, dok je nalaz acidorezistentnih bakterija ustanovljen direktnom mikroskopijom u uzorcima limfnih ćvorova kod još 3 grla, ali izolacija nije uspela usled kontaminacije. Na osnovu klasićnih bakterioloških metoda, izgleda i rasta kolonija, kao i primenom standardnih biohemijskih testova identifikacije, svi izolati su tipizovani u vrstu *M. bovis*.

Na osetljivost prema izoniazidu, streptomycinu, etambutolu i rifampicinu, antituberkuloticima prve linije koji se u našoj zemlji koriste za lećenje ljudi obolelih od tuberkuloze, standardnom metodom proporcija, ispitano je 5 reprezentativnih izolata. Izolati su bili poreklom od goveda iz pet razlićutih zapaća lociranih u naseljima na teritoriji 5 opština, od kojih su 4 u Južnobaćkom i 1 u Sremskom okrugu. Ustanovljena je osetljivost izolata na sve ispitivane antituberkulotike, odnosno ni u jednom slućaju nije utvrćena pojava rezistencije.

Metodom PCR spoligotipizacije u cilju molekularne karakterizacije i genotipizacije bakterija *M.tuberculosis* kompleksa ispitano je 18 izolata mikobakterija kod kojih je proces ekstrakcije DNK bio uspešan. Rezultati molekularne karakterizacije odnosno spoligotipizacije izolovanih mikobakterija pokazuju odsustvo spejsera 1 i niza

spejsera od 3 sve do 16, kao i spejsera 28 što je karakteristično za *Mycobacterium caprae*. Odsustvo spejsera 28 i niza spejsera od 39 do 43, kod svih izolata ukazuje na pripadnost istom klasteru. Automatskom analizom binarnog koda dobijenih izolata u dve najveće baze podataka ustanovljeno je da se radi o spoligotipu SB 0418 odnosno ST 647, koji po raširenosti predstavlja dominantni klaster *Mycobacterium caprae* u srednje evropskim državama.

Uporedno ispitivanje komparativnog tuberkulinskog testa i *in vitro* γ -IFN testa, izvršeno je na 71 grlu goveda iz 25 zapata lociranih u Južnobačkom i Sremskom okrugu kod kojih je prilikom izvođenja monotesta ustanovljena pozitivna ili sumnjiva reakcija. Rezultati ispitivanja su na osnovu izračunate *Kappa*-statističke vrednosti pokazali srednju saglasnost dva testa, dok je ispitivanje osetljivosti γ -IFN testa u odnosu na *post mortem* potvrđene slučajeve tuberkuloze, iznosilo 90%.

U radu je prikazana i epizootiološka situacija tuberkuloze goveda u Vojvodini za period od prethodnih šest godina. Naročito je detaljno analizirana incidencija i prevalencija oboljenja u delovima Južnobačkog okruga, u kojima su ustanovljena žarišta sa endemski prisutnom tuberkulozom goveda. Na osnovu rezultata istraživanja napravljena je aktuelna epizootiološka karta tuberkuloze goveda u Vojvodini.

Ključne reči: tuberkuloza goveda, izolacija, MTB-kompleks, spoligotipizacija, antibiotska osetljivost, γ -IFN test, epizootiološka karta

Naučna oblast: Veterinarska medicina

Uža naučna oblast: Zarazne bolesti životinja i epizootiologija

UDK broj: 636.2:616.24-002.5:614.91

ISOLATION, IDENTIFICATION AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF CAUSATIVE AGENT OF BOVINE TUBERCULOSIS IN VOJVODINA REGION

SUMMARY

The aim of this research was isolation, genotyping and molecular characterization of the causative agent of cattle tuberculosis in the province of Vojvodina, as well as evaluation of susceptibility for isolated zoonotic MTB-complex bacteria towards a panel of selected anti-tuberculosis drugs used in tuberculosis treatment for humans in our country. Additionally, the goal of the research was to estimate sensitivity of γ -IFN test for tuberculosis diagnosis in cattle compared to standard microbiological methods of the isolation or histopathological identification of lesions. Finally, based on the animal incidence and herd prevalence per year, the objective was to create the actual epizootiological map of disease occurrence in Vojvodina province.

For the isolation of MTB-complex bacteria tissue samples (lung and lymph nodes) from 49 test positive cattle on single comparative tuberculin test were used. During the *post mortem* examination at the abattoir, visible lesions were present in 40 animals. MTB-complex bacteria were successfully isolated from the pathological material of 19 bovines, while direct microscopic examination of lymph node smears yielded positive result for acid fast bacteria, in additional three animals, but the isolation failed due to contamination or other reasons. Based on the classic bacteriological methods, growth characteristics, colony morphology and biochemical tests all isolates were designated as *M. bovis* species.

PCR-based spoligotyping, was performed on 18 MTB-complex isolates following successful DNA extraction, and a single spoligotype pattern was identified. The results of the molecular characterization, revealed the absence of spacer 1, spacer region 3-16, as well as spacer 28, in all isolates, a characteristic pattern for *Mycobacterium caprae*. The absence of spacer 28 and spacer region 39-43 suggests that all isolates belong to single cluster. Automated analysis of the binary code of the submitted spoligotype patterns in two largest online databases came out with identifier

number SB 0418 and ST 647 respectively, which represents the predominant *Mycobacterium caprae* cluster in Central-European countries.

Following the standard proportion method, we evaluated the susceptibility of 5 representative *M.caprae* isolates towards isoniazid, streptomycin, ethambutol and rifampicin, the first-line drugs used in our country for human tuberculosis treatment. Isolates were obtained from cattle originating from five different herds located on the territory of 5 municipalities, 4 of which were included in the South Backa region and 1 in Srem region. All isolates of *M. caprae* were successfully submitted to conventional susceptibility testing for the four antibiotics and none was resistant against any of the drugs tested.

Diagnostic testing in parallel, using single comparative cervical test and γ -IFN test was conducted in 71 bovine animal distributed in 25 herds from South Backa and Srem region. All animals previously tested positive or inconclusive on single intradermal tuberculin test. The interpretation of the estimated kappa statistics for two compared tests, showed a κ -index of 0,48 that represents a moderate agreement of the two tests, while the estimated sensitivity of γ -IFN test based on confirmed *post mortem* tuberculosis was 90%.

In this study the epizootiological situation of the cattle tuberculosis in Vojvodina in the last six years was evaluated. The animal incidence and herd prevalence of disease in the South Backa region, where the natural foci of infection were detected, was presented in more detail and over a longer period, spanning 10 years. Finally, the actual epizootiological map of the cattle tuberculosis presentation in Vojvodina region was generated.

Keywords: bovine tuberculosis, isolation, spoligotyping, *M.caprae*, antibiotic susceptibility, γ -IFN test, epizootiological map

Major Field of Study: Clinical veterinary medicine

Special Field of Study: Infectious diseases of animals and epizootiology

UDK number: 636.2:616.24-002.5:614.91

SADRŽAJ

REZIME	I
SUMMARY	III
1. UVOD	1
2. PREGLED LITERATURE	4
2.1. Istorijat bolesti	4
2.2. Etiologija	7
2.3. Epizootiologija tuberkuloze goveda	14
2.3.1. Prenosenje infekcije sa goveda na ljude	17
2.3.2. Prenosenje infekcije sa ljudi na goveda	23
2.3.3. Prenosenje infekcije sa divljih životinja na goveda i ljude	23
2.4. Patogeneza bolesti i patomorfološke promene	25
2.4.1. Patogeneza	27
2.4.2. Patomorfološke promene	36
2.5. Kontrola i eradikacija tuberkuloze goveda	39
2.6. Dijagnostika tuberkuloze	45
2.6.1. Intradermalni tuberkulinski test	47
2.6.2. Gama interferon test	56
2.6.3. Serološka dijagnostika	63
2.6.4. Ostali pomoćni dijagnostički testovi	65
2.6.5. Bakteriološka kultivacija i izolacija uzročnika	66
2.6.6. Molekularne metode dijagnostike	67
2.6.6.1. PCR	68
2.6.6.2. Genotipizacija	68
2.7. Molekularna epidemiologija tuberkuloze	74
3. CILJ I ZADACI RADA	78
4. MATERIJAL I METODE	80
4.1. MATERIJAL	80
4.2. Metode	83
4.2.1. Tuberkulinizacija	83
4.2.2. Patomorfološki pregled	84
4.2.3. Patohistološki pregled	85

4.2.4. Izolacija i bakteriološka identifikacija mikobakterija	85
4.2.5. Ispitivanje osetljivosti izolata na antituberkulotike	86
4.2.6. Ekstrakcija i priprema DNK	87
4.2.7. Spoligotipizacija	87
4.2.8. Mycobacterium bovis gama interferon test	90
4.2.9. Obrada signala dobijenih spoligotipizacijom	91
4.2.10. Statistička obrada podataka	92
5. REZULTATI	93
5.1.1. Rezultati direktnog mikroskopskog pregleda i izolacije mikobakterija	93
5.1.2. Rezultati molekularne identifikacije izolata iz MTB-kompleksa metodom spoligotipizacije	95
5.1.3. Rezultati patomorfološkog pregleda goveda na liniji klanja	101
5.1.4. Rezultati patohistološkog pregleda	102
5.2. Rezultati ispitivanja osetljivosti izolovanih mikobakterija na odabrane antituberkulotike	103
5.3. Rezultati dijagnostičkog ispitivanja goveda primenom intradermalnog komparativnog cervikalnog testa i gama interferon testa i njihovog poređenja	103
5.3.1. Rezultati ispitivanja osetljivosti gama interferon testa kod goveda sa potvrđenom dijagnozom tuberkuloze klasičnim metodama dijagnostike	107
5.4. Rezultati ispitivanja incidencije i prevalencije tuberkuloze goveda u Vojvodini	109
5.4.1. Rezultati ispitivanja incidencije i prevalencije tuberkuloze goveda u Južnobačkom okrugu u periodu 2006-2015godine	112
5.4.2. Rezultati ispitivanja raširenosti prevalencije tuberkuloze goveda u Sremskom okrugu u periodu 2006-2015 godine	136
6. DISKUSIJA	139
6.1. Utvrđivanje prisustva, izolacija i bakteriološka identifikacija uzročnika tuberkuloze goveda	139
6.2. Molekularna karakterizacija dobijenih izolata MTB-kompleksa kod goveda u Vojvodini	144
6.3. Ispitivanje osetljivosti <i>M. caprae</i> na odabrane antituberkulotike	148
6.4. <i>Ante mortem</i> dijagnostika tuberkuloze goveda primenom komparativne tuberkulinizacije i gama interferon testa i njihovo vrednovanje	151

6.5. Ispitivanje incidencije, prevalencije i epizootiologije tuberkuloze goveda u Vojvodini	155
7. ZAKLJUČCI	164
8. LITERATURA	166
9. PRILOG-FOTO DOKUMENTACIJA	190
BIOGRAFIJA	CXCIII
BIBLIOGRAFIJA	CXCIV
IZJAVA O AUTORSTVU	CXCV
IZJAVA O ISTOVETNOSTI ŠTAMPANE I ELEKTRONSKE VERZIJE DOKTORSKOG RADA	CXCVI
IZJAVA O KORIŠĆENJU	CXCVII

1. UVOD

Pojam „tuberkuloza“ označava kliničku ili patološku dijagnozu koja se po opšteprihvaćenim kriterijumima odnosi na klinički manifestne promene i lezije uzrokovane bakterijama svrstanim u *Mycobacterium tuberculosis kompleks*. Dva najznačajnija člana ovog kompleksa su *M. bovis* i *M. tuberculosis*, koji iako na genetskom nivou dele 99,95% podudarnosti, pokazuju u nekim aspektima značajne biološke razlike. *M. bovis* je najuniverzalniji patogen među mikobakterijama, "kosmopolita" sa najširim spektrom prijemčivih vrsta životinja, uključujući i ljude, kod kojih uzrokuje hronično progresivno oboljenje.

Gotovo čitav vek organizovano i sistematsko suzbijanje tuberkuloze goveda zaokuplja pažnju istraživača, farmera, veterinara i različitih državnih organa. Uprkos uloženim naporima i znatnim finansijskim sredstvima, potpuna eradikacija tuberkuloze u populaciji goveda pokazala se kao teško dostižan cilj. Tako i danas u mnogim zemljama širom sveta, tuberkuloza goveda, koza i farmski gajenih jelena nanosi velike ekonomske gubitke ovim granama stočarstva, a poslednjih godina prevalencija zaraženih zapata goveda u Evropi pokazuje tendenciju rasta.

Oboljenje ima veliki socio-ekonomski značaj u zemljama pogođenim epidemijom, ugrožava javno zdravlje, angažuje značajne materijalne resurse, ometa i ograničava slobodnu trgovinu i promet životinjama i animalnim proizvodima. Oskudnost podataka o prevalenciji *M.bovis*, *M.caprae* i drugih zoonoznih mikobakterija kod obolelih ljudi, umanjuje mogućnost da se pouzdano proceni i kvantifikuje antropozoonozni rizik, naročito u zemljama u razvoju. Pre široke primene pasterizacije mleka, smatra se da je između 20-40% slučajeva tuberkuloze ljudi bilo posledica infekcije vrstom *M.bovis*, najčešće usled konzumacije termički neobrađenog mleka i mlečnih proizvoda. Mnogi pokazatelji upozoravaju da će u kontekstu pandemije HIV infekcije, zoonozna tuberkuloza predstavljati sve veću pretnju za zdravlje ljudi, naročito u delovima sveta gde je enzootski prisutna kod domaćih ili divljih životinja, koje su u bliskom kontaktu sa ljudima. Sa druge strane, *Mycobacterium tuberculosis* osnovni etiološki uzročnik tuberkuloze ljudi, čije otkriće je Robert Koh objavio 24. marta 1882. godine, i na pragu 21. veka, predstavlja pojedinačno najznačajniji infektivni agens u pogledu morbiditeta i mortaliteta kod ljudi. Smatra se da je ovom bakterijom zaražena

jedna trećina svetske populacije, a svake godine registruje se između 10 i 12 miliona novoobolelih ljudi, od kojih oko 2 miliona podleže infekciji. Iako se infekcija uglavnom održava u klinički latentnom stanju, različiti faktori koji dovode do imunodeficijencije utiču na rasplamsavanje sistemskog oboljenja, koje bez blagovremene i adekvatne terapije često završava fatalno. Poseban problem predstavlja razvoj multirezistentnih sojeva, otpornih na veliki broj antituberkulotika, što je naročito karakteristično za sojeve *M.bovis* izolovane iz obolelih ljudi.

Napori da se zaustavi pandemija tuberkuloze nekada označavane i kao „bela smrt“, čine se odavno. Još početkom 20. veka Calmette i Guerin su od atenuiranog *M.bovis* BCG soja, napravili vakcinu, koja je prvi put oralno aplikovana novorođenom detetu 1921. godine. Do danas, vakcinu pripremljenu od ovog soja primilo je više od dve milijarde ljudi širom sveta. Iako se pokazala korisnom u sprečavanju razvoja mikobakterijskog meningitisa, efikasnost u prevenciji nastanka plućne tuberkuloze ostala je kontroverzna, te se zbog toga u nekim državama kao, npr. u Sjedinjenim Američkim Državama (SAD) vakcinacija gotovo i ne primenjuje. Dakle, uprkos dostupnosti savremenih dijagnostičkih procedura, terapije i profilakse, tuberkuloza je daleko od iskorenjene i zaboravljene bolesti, naprotiv.

Saradnja i zajednička istraživanja u rasvetljavanju različitih aspekata infekcije kao što su: izučavanje biologije i interakcije mikroorganizma i domaćina, razvoj novih vakcina i dijagnostikuma, konvencionalna i molekularna epidemiologija i epizootiologija tuberkuloze, istraživača iz oblasti veterinarske medicine i različitih biomedicinskih grana u okviru koncepta Jedinstvenog zdravlja (One Health Concept) nameću se kao neophodna za kontrolu i suzbijanje ovog oboljenja zajedničkog životinjama i ljudima.

Iako su mnoge države članice Evropske Unije i SAD, stekle status zvanično slobodnih od tuberkuloze goveda, u većini zemalja u razvoju u kojima nema programa kontrole, ona je endemski prisutna i raširena u različitom obimu. Ponovno probuđeno interesovanje za tuberkulozu goveda, koje je uzrokovano porastom incidencije i prevalencije infekcije u pojedinim razvijenim zemljama, kao i stalnim povećanjem broja ljudi obolelih od TBC širom sveta, dovelo je do novih otkrića u oblasti molekularne epidemiologije, etiologije i patogeneze ovog oboljenja. Primenom različitih molekularnih metoda dijagnostike i kreiranjem međunarodnih baza podataka, moguće je

pratiti globalnu filogeografiju MTB-kompleksa, analizirati međusobnu povezanost pojedinih žarišta i puteve kako intra tako i interspecijskog širenja infekcije i porediti podatke na evolutivnom filogenetskom stablu.

Iako je epizootiološku situaciju u pogledu tuberkuloze goveda u Srbiji moguće oceniti kao relativno povoljnu, usled postojanja žarišta tuberkuloze u pojedinim regionima, program kontrole i suzbijanja iako modifikovan, mora biti nastavljen, a sticanje statusa države slobodne od tuberkuloze goveda definisano kao krajnji cilj.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. ISTORIJAT BOLESTI

Tuberkuloza je veoma stara bolest i pratilac čovečanstva još od najranijeg vremena. U Bibliji su dati opisi dve mikobakterijske infekcije, lepre i tuberkuloze, koje su uzrokovale smrt i dovodile do značajne patnje i straha ondašnjih ljudi. U Staroj Grčkoj Hipokrat, Platon i Aretus opisuju pulmonalnu tuberkulozu označavajući bolest kao "phthisis", pri čemu Hipokrat primećuje da najčešće obolevaju ljudi u dobi od 18-35 godina (Daniel, 2006). Podaci dobijeni različitim metodama genotipizacije ukazuju da su moderni sojevi MTB-kompleksa evoluirali od zajedničnog ancestralnog pretka pre oko 20.000-15.000 godina (Sreevatsan i sar., 1997). Pre više od jednog veka, 1882. godine Robert Koh objavio je otkriće mikroorganizma koji uzrokuje tuberkulozu, verujući u početku da postoji samo jedan tip „TB bacila“. Međutim, američki istraživač Teobald Smit je 1898. godine proučavajući izolate poreklom od obolelih ljudi i goveda primetio izvesne razlike. Zato ih je nazvao goveđi i humani soj tuberkuloznog bacila, pri tome naglašavajući da ovi sojevi nisu strogo ograničeni na domaćine iz kojih su izolovani. Nešto kasnije, 1901. godine, Robert Koh na osnovu ograničenih informacija, iznosi mišljenje da su ljudi gotovo potpuno rezistentni na uzročnika bovine tuberkuloze i ukazuje da nije potrebno preduzimati nikakve mere prevencije. Ovakav stav usled velikog autoriteta koji je Koh uživao imao je značajne negativne posledice na otpočinjanje programa iskorenjivanja tuberkuloze goveda (Grange, 2001). Na sreću, ova hipoteza ipak nije prihvaćena bez rezerve, pa u Engleskoj osnivaju Kraljevsku Komisiju eksperata 1901. godine, sa ciljem da istraži povezanost između tuberkuloze goveda i pojave bolesti kod ljudi. Komisija konačno 1911. godine, donosi zaključak da se tuberkuloza može preneti sa životinja na ljude i da je *M.bovis* čest uzročnik tuberkuloze kod dece, koja se manifestovala kao cervikalna limfadenopatija ili tuberkulozni meningitis, dok je pojava pulmonalne tuberkuloze bila retka, osim u ruralnim sredinama, gde su ljudi bili u neposrednom dodiru sa govedima (Grange i Yates 1994). Ipak, bilo je potrebno da prođe više od 25 godina do početka prvog dobrovoljnog programa kontrole i eradikacije tuberkuloze goveda u Evropi. Tokom 30-tih godina 20. veka kod oko 40% zaklanih goveda u Velikoj Britaniji, pregledom trupova ustanovljene su tuberkulozne promene, a 0,5% muznih krava mlekom je izlučivalo uzročnika bolesti

(Francis 1947). U SAD se istorijska perspektiva sagledavanja zoonoznog potencijala uzročnika tuberkuloze goveda razlikovala od evropskog pristupa. Posle otkrića Teobalda Smita, 1898. godine zvanično je objavljen rizik od prenošenja tuberkuloze putem mleka i drugih proizvoda inficiranih životinja. Objekti za držanje goveda, klanice i mlekare, proglašene su rizičnim mestima od značaja za javno zdravlje, a promet mleka i mesa poreklom od inficiranih grla bio je zabranjen (Bezos i sar.,2014b). Kontrola i suzbijanje tuberkuloze goveda u SAD zvanično započinju 1917. godine (Rodwell i sar., 2010). Najstariji dokazi o tuberkulozi ljudi uzrokovanoj sa *M. bovis* pronađeni su prilikom ispitivanja mumija u Južnom Sibiru koje potiču iz Bronzanog doba, oko 2000. godina pre nove ere (Taylor i sar., 2007). Pred kraj 19. veka tuberkuloza je bila najveći zdravstveni problem u Evropi, pogađajući stanovništvo u velikim gradovima i industrijskim centrima, pri čemu je stepen morbiditeta iznosio gotovo 100%. U vreme otkrića bacila tuberkuloze Koh je bio veoma optimističan u pogledu perspektive potpune eradikacije tuberkuloze. Nažalost, optimizam je bio preuranjen i tuberkuloza do danas ostaje najsmrtonosnija zarazna bolest sa gotovo 9 miliona novoobolelih ljudi, registrovanih svake godine od kojih dva miliona podleže infekciji (Kaufmann i Schaible, 2005).

Na desetom Međunarodnom kongresu lekara koji je održan u Berlinu 1890. godine pred više od 5000 učesnika, Koh je objavio da je pronašao sastojak koji sprečava napredovanje tuberkuloze kod zamoraca, i nazvao ga tuberkulin. On je ustanovio da inficirane osobe reaguju drugačije u odnosu na zdrave iz kontrolne grupe kada im se lokalno aplikuju niske doze tuberkulina. Dok su inficirane osobe na mestu aplikacije razvijale specifičnu reakciju, kod zdravih ljudi je ona izostajala. Koh je ingeniozno shvatio da sastojak koji je aplikovao ne deluje direktno na mikobakterije, nego stimuliše ćelije organizma i predvideo dijagnostičku vrednost testa. Ovo otkriće je predstavljalo začetak dijagnostičke upotrebe testa kasne preosetljivosti koji se i danas koristi za otkrivanje tuberkuloznih ljudi. Koh nije samo tvorac ovog testa nego i jedna od prvih osoba koja je pokazala pozitivnu reakciju. Ubrzo posle ove objave veterinari u Danskoj su započeli sa testiranjem goveda aplikacijom tuberkulina (Daniel 2006).

Povezanosti tuberkuloze ljudi i pojave bolesti hroničnog mršavljenja goveda dugo je bila poznata, a u 19. veku Carmichael je ukazao da je scrofula (tuberkulozna cervikalna limfadenopatija) kod dece povezana sa konzumacijom kravljeg mleka. U

mnogim industrijalizovanim zemljama, borba protiv tuberkuloze goveda započela je još krajem 19. veka, pri čemu se kontrola dugo zasnivala na kliničkom pregledu goveda koji su vršili veterinari u cilju otkrivanja grla sa simptomima tuberkuloze, bakteriološkom pregledu uzoraka mleka i dobrovoljnom klanju obolelih životinja (Bezos i sar.,2014b). Testiranje zasnovano na intradermalnom, supkutanom ili sistemskom aplikovanju tuberkulina rađeno je u retkim situacijama (Snider, 1982; Monaghan i sar., 1994). Finska je bila prva država na svetu koja je pred sam kraj 19. veka započela tuberkulinizaciju goveda u cilju suzbijanja i iskorenjivanja tuberkuloze. Prvi obavezujući program iskorenjivanja tuberkuloze goveda zasnovan na tuberkulinizaciji i uklanjanju pozitivnih grla uz plaćanje kompenzacija i kontrolu kretanja, započet je u Velikoj Britaniji 1950. godine (Francis, 1958). U bivšoj SFRJ sa sistematskom kontrolom i suzbijanjem tuberkuloze goveda započelo se 1946. godine.

2.2 ETIOLOGIJA

M.bovis i *M.caprae* su male, nepokretne štapićaste bakterije dužine 1-4 μ m, ne stvaraju spore ni kapsule, a karakterišu se prisustvom voštane mikolične kiseline u ćelijskom zidu, koja ih štiti od fagocitne aktivnosti makrofaga i odgovorna je za acidorezistenciju i bojenje po Ziehl-Neelsen-u. Mikroorganizmi su gram pozitivni, aerobni ili mikroaerofilni i pri primarnoj izolaciji najbolje rastu na obogaćenim podlogama na temperaturi od 37°C. *M.bovis* najbolje raste na podlogama sa piruvatom, a bez glicerola, negativan je na niacin, osetljiv na izoniazid, THC, para-aminosalicilnu kiselinu i neotetrazolium (Gormley i sar.,2014).

Taksonomija i nomenklatura uzročnika tuberkuloze čoveka i drugih vrsta sisara, heterogene grupe sojeva ili vrsta mikobakterija danas klasifikovanih u tzv. *Mycobacterium tuberculosis* kompleks (MTB-kompleks), predstavlja izvor konfuzije već više od jednog veka (Gartner, 2001). Još 1970. godine predložena je klasifikacija u dve vrste: *Mycobacterium bovis* i *Mycobacterium tuberculosis* koje su neposredno nakon toga i unete u Listu odobrenih naziva bakterija (Karlsson i Lessel, 1970). Obe vrste su podjednako virulentne za zamorce, ali je *M.bovis* znatno patogeniji za zečeve koje ubija za 30-60 dana od inokulacije uz pojavu milijarnih ili kazeoznih lezija na plućima, slezini, jetri i drugim organima (Grange i Yates, 1994). Podela na ove dve vrste nije oštro razgraničena, pa se pojavljuju i sojevi koji se po osobinama mogu smestiti negde u sredinu i svrstavaju se u *Mycobacterium africanum* klaster. Pojedini sojevi *M. bovis* izolovani iz svinja, mačaka, foka, koza i dr. razlikuju se u nekim aspektima od tipičnih goveđih izolata. Tokom 1977. godine u Regionalnoj laboratoriji za tuberkulozu jugoistočne Engleske u Dulviču ustanovljen je sistem za diferencijaciju i razvrstavanje različitih sojeva unutar *M. tuberculosis* kompleksa. Ovaj sistem je i danas u upotrebi i preporučen je od Svetske zdravstvene organizacije. Klasifikacija uzročnika izvršena je na osnovu biohemijskih, kulturnih osobina i osetljivosti na pojedine antituberkulozne lekove. Na ovaj način razlikuju se *Mycobacterium tuberculosis* sa dva tipa «klasični» i «Azijski», *Mycobacterium africanum* tip1 i tip 2, *Mycobacterium bovis* «klasični» i «BCG» (de la Rua Domenech 2006b). Ipak, treba naglasiti da ne postoji jednostavan i opšte prihvaćen set fenotipskih osobina, za determinaciju *M.africanum*, ali opšti stav većine istraživača je da se sojevi koji nemaju jasno izražene «klasične»

fenotipske osobine *M.tuberculosis* ili *M.bovis*, na neki način proizvoljno označavaju kao *M.africanum* (Mostowy i sar., 2002). Brosch i sar., (2002) i Garnier i sar.,(2003), navode da se MTB- kompleks sastoji od grupe acido-alkoholno rezistentnih mikroorganizama koji su međusobno tesno povezani, a pojavljuju se kao uzročnici oboljenja kako ljudi tako i različitih vrsta životinja. Podela na vrste zasniva se prvenstveno na afinitetu prema pojedinim domaćinima i molekularnoj filogenetici. U ovaj kompleks se ubraja pet “klasičnih“ vrsta: *M. tuberculosis (sensu stricto)* koji je uzročnik oboljenja prvenstveno ljudi i primata a veoma retko drugih vrsta životinja (pasa, mačaka, svinja, goveda, divljih životinja i ptica), *Mycobacterium bovis* najznačajniji uzročnik tuberkuloze goveda i drugih vrsta iz porodice *Bovidae*, ali takođe i širokog spektra različitih vrsta domaćih i divljih životinja uključujući i čoveka, *Bacillus Calmette-Guirin (BCG)* vakcinalni soj poreklom od *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium africanum* koji predstavlja veoma heterogenu skupinu sojeva koji se pojavljuju kao uzročnici humane tuberkuloze u Africi, i *Mycobacterium microti* ustanovljen prvenstveno kod glodara, ali sporadično i drugih životinjskih vrsta; mačaka, svinja i lama. Sve mikobakterije koje su klasifikovane u MTB-kompleks poseduju identičnu 16S rRNK sekvencu i 99,9% homologije na nivou genoma (Sreevatsan i sar., 1997). Filogenetske analize ukazuju da bi sve članove MTB-kompleksa trebalo smatrati podvrstama ili sojevima jedne vrste (*M.tuberculosis*), koji su adaptirani na različite domaćine (Brosch i sar., 2002). Prema tome, najpravičnije bi bilo na osnovu molekularno-genetskih kriterijumima ove mikobakterije označavati kao *M.tuberculosis subsp. tuberculosis*; *M.tuberculosis subsp. bovis* itd. Uzimajući u obzir značaj tuberkuloze kako u humanoj tako i veterinarskoj medicini, kao i znatne razlike u epidemiologiji i epizootiologiji, patologiji i antibiotskoj rezistenciji, postojeća klasifikacija čini se korisnom i opravdanom te su zadržani stari pojedinačni nazivi (de la Rua Domenech, 2006b). Postoje podaci da su se pojedini autori i ranije zalagali da se različiti članovi MTB kompleksa smatraju varijetetima ili podvrstama *M. tuberculosis* (Collins i sar., 1982), a da je podela uzročnika na pet različitih vrsta zapravo veštačka i posledica velikog interesovanja koje je vladalo za uzročnika tuberkuloze kroz čitavu istoriju medicine (Frothingham i sar., 1998).

Smatra se da su svi sojevi ili vrste potekli od zajedničkog progenitora koji je u najtešnjoj vezi sa savremenim *M.canetti*. Genetska ispitivanja danas postojećih sojeva

M.canetti i drugih mikobakterija sa glatkim kolonijama vršena na uzorcima iz Istočne Afrike, ukazuju da je poslednji zajednički predak ove međusobno srodne, ali ipak veoma divergentne grupe mikobakterija, postojao pre oko 3 miliona godina (Gutierrez i sar., 2005; Taylor i sar., 2007). Supply i sar., (2013) analizom celokupnog genoma 5 reprezentativnih izolata *M.canetti* ustanovili su izraženu sklonost ka rekombinacijama i znatno veći genom u odnosu na *M.tuberculosis* i predložili evolucioni scenario po kojem je *M.tuberculosis* evoluirao iz pula ancestralnih tuberkoluznih bacila sa glatkim kolonijama, pojačavajući tokom vremena sopstvenu virulenciju. Iako je pri eksperimentalnoj infekciji miševa ustanovljena manja virulencija *M.canetti* u odnosu na *M.tuberculosis* (Supply i sar., 2013), čini se da tuberkuloza ljudi uzrokovana sa *M.canetti* postaje narastajući problem u državama Roga Afrike, a pravi domaćin, odnosno rezervoar u kome se glatki tuberkulozni bacil u prirodi održava do sada nije ustanovljen (Rodriguez-Campos i sar.,2014).

Razvojem različitih metoda molekularne genotipizacije u poslednjim decenijama, došlo je do identifikacije novih vrsta i sojeva unutar MTB-kompleksa, što je neminovno unelo određene korekcije u dotadašnje razumevanje etiologije tuberkuloze. Prema Rodriguez-Campos i sar., (2014) sada se u MTB-kompleks ubrajaju *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *M. bovis* Bacillus Calmette i Guérin, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium canettii*, *Mycobacterium pinnipedii* i *Mycobacterium caprae*, a od nedavno predloženo je da se uvrste još dva specifična člana; oriks bacil uzročnik tuberkuloze afričkog bivola i antilopa za koga je preporučen naziv *Mycobacterium orygis* i patogena mikobakterija izolovana iz mungosa *Mycobacterium mungi*. Sve ove različite vrste ili ekotipove moguće je diferencirati na osnovu njihovih kulturelnih, biohemijskih ili molekularnih karakteristika. Sojevi, odnosno vrste unutar MTB-kompleksa imaju visoko klonalnu strukturu populacije, sa veoma malo ili potpunim odsustvom rekombinacije odnosno izmene hromozomalne DNK među vrstama (Hershberg i sar., 2008). MTB-kompleks, u principu treba smatrati familijom "ekotipova" veoma srodnih i usko povezanih mikobakterija, pri čemu je svaki ekotip adaptiran na određenu vrstu domaćina ili grupu vrsta, ali ni inter-specijsko prenošenje nije retkost (Michel i sar., 2010). *M. bovis* je intracelularni patogen koji parazitira unutar makrofaga i drugih ćelija monocitnog tipa; iako su *M.bovis* i *M.tuberculosis* genetski veoma srodni, sa poklapanjem genetskog

koda od 99,9%, među njima ipak postoje signifikantne razlike u pogledu virulentnosti i širine spektra potencijalnih domaćina. *M.bovis* koji je glavni uzročnik tuberkuloze goveda i drugih farmskih životinja ima mnogo širi spektar potencijalnih domaćina, i može se održavati i perzistirati u zatvorenoj populaciji različitih životinjskih vrsta i u odsustvu primarnih domaćina- goveda (de Lisle i sar., 2001). U Velikoj Britaniji i Irskoj, jazavac (*Meles meles*), je domaćin u kome se infekcija nezavisno održava (Griffin i sar., 2005) pa neki istraživači čak smatraju da je u današnje vreme *M.bovis* na britanskim ostrvima, pre svega infekcija jazavaca sa kojih se onda ponovo vraća na goveda (Sheridan, 2011). Sumirajući rezultate velikog broja autora, Rodrigez-Campos i sar., (2014) navode da je do sada *M.bovis* infekcija ustanovljena kod goveda, ljudi i drugih primata, bivola, različitih vrsta antilopa, pasa, mačaka, svinja, ovaca, koza, i čitavog niza različitih vrsta divljih životinja uključujući i foke. Zapravo, svi kopneni sisari su u određenom stepenu prijemčivi za infekciju, u zavisnosti od infektivne doze, urođene otpornosti, predominantnog imunološkog obrasca, razvoja patološkog procesa, načina držanja i bioekoloških uslova (Morris i sar., 1994). U određenim epizootiološkim situacijama i pojedinim regionima sveta, tuberkuloza goveda može prvenstveno biti posledica infekcije nekim drugim uzročnikom, najčešće sa *M. caprae* i *M. africanum*. Bliska filogenetska povezanost *M.africanum* sa animalnim izolatima budi sumnje u postojanje zoonoznog rezervoara, ali iako je uzročnik sporadično izolovan iz obolelih majmuna i goveda nema čvrstih dokaza o njegovom zoonoznom poreklu (Rodriguez-Campos i sar., 2014). Opisani su i retki slučajevi tuberkuloze goveda uzrokovani vrstama *M. microti* i *M. pinnipedii* (Collins 2011). Kada se isključe infekcije životinja u zoo vrtovima, čini se da *M.pinnipedii* prvenstveno izaziva bolest kod morskih sisara u Južnoj hemisferi (Rodriguez-Campos i sar., 2014). Tuberkuloza goveda može biti uzrokovana i sa *M. tuberculosis*, što je naročito izraženo u državama sa visokom prevalencijom tuberkuloze kod ljudi (Ruettger i sar., 2012; Du i sar.,2011). Prvi opis i taksonomsku studiju “neobičajenog“ člana *M. tuberculosis* kompleksa prvobitno nazvanog *M. tuberculosis subsp. caprae*, a kasnije *M. bovis subsp. caprae* dali su Aranaz i sar., (1999). Mikobakterije koje su izolovane iz patološkog materijala poreklom od koza imale su jasno izražene kulturne, genetske i epizootiološke karakteristike koje su ih izdvajale od ostalih “klasičnih“ članova kompleksa. Sojevi koji su prvobitno izolovani iz koza, pokazivali su genetske karakteristike koje se ne sreću

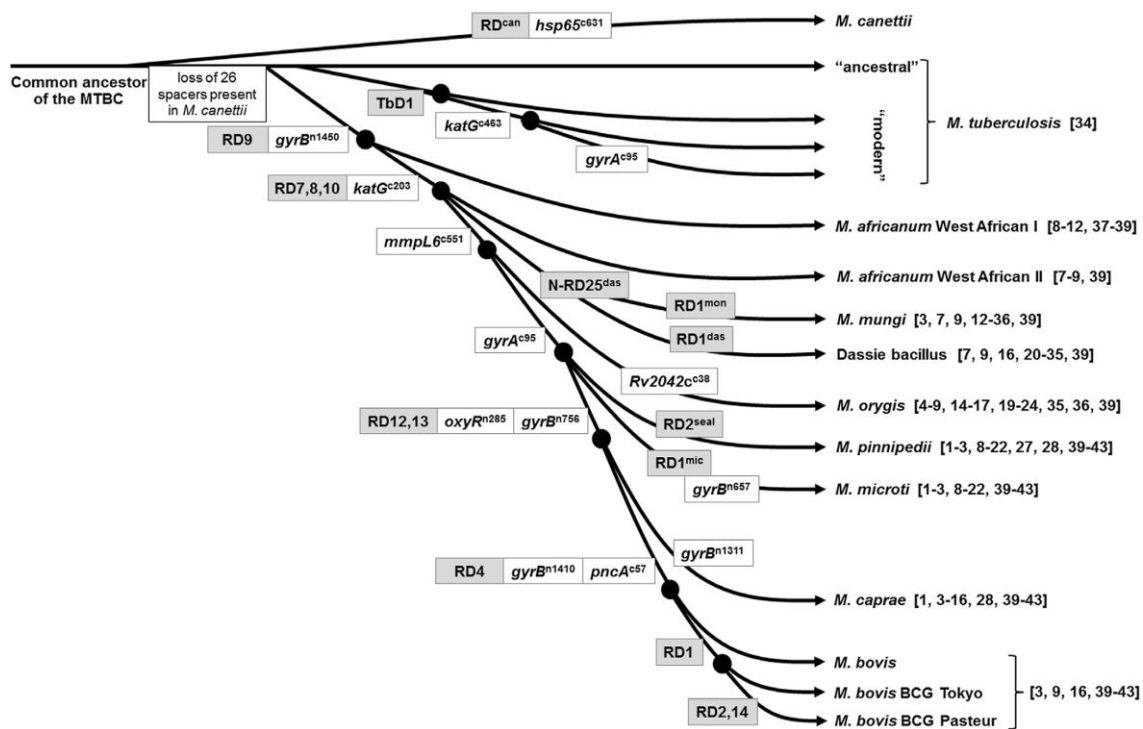
kod drugih izolata *M.bovis*. Metodom spoligotipizacije ustanovljeno je da im nedostaju karakteristični spejseri 1, 3-16 i 28, a da poseduju divlji tip alela pirazinamidaza *pncA* gena, što je karakteristično za *M.tuberculosis* (Prodinger i sar., 2002), uz specifičnu kombinaciju polimorfizma u pseudogenu *oxyR*, katalaza (*katG*), i giraza (*gyrA* i *gyrB*) genima (Rodriguez-Campos i sar., 2014). Nedavno je opisan i specifičan polimorfizam u *lepA* genu (Reddington i sar., 2011).

Etiološki najznačajniji uzročnici tuberkuloze domaćih životinja *M.bovis* i *M.caprae*, su zoonozni agensi koji dovode do infekcije ljudi izazivajući različite kliničke manifestacije (Romero i sar., 2007). Infekcija goveda vrstom *M.caprae* raširena je u Srednjoj Evropi, a sem kod goveda bakterija je izolovana iz patološkog materijala poreklom od ljudi, jelena, svinja, lisica, divljih svinja i kamila (Erler i sar., 2004; Prodinger i sar., 2005, Schiller i sar., 2010b).

Dugo je opstajala pretpostavka da tuberkuloza ljudi zapravo ima zoonozno poreklo, i da je *M.tuberculosis* evoluirao od *M.bovis* adaptirajući se na čoveka kao domaćina, pre 10.000-15.000 godina, u vreme domestikacije goveda (Sreevatsan i sar., 1997). Međutim, analize genskih delecija, različitih sojeva mikobakterija članova MTB-kompleksa, iz 30 različitih zemalja, kao i nedavno sekvenciranje celokupnog genoma *M.bovis* pokazali su da je on manji od genoma *M.tuberculosis* (Garnier i sar., 2003; Brosch i sar., 2002). Po svoj prilici *M.bovis* je konačni član zasebne linije mikobakterija u koju još spadaju *M.microti* i *M.africanum*. Za ovu grupu sojeva karakterističan je gubitak RD9 regiona (eng. region of difference), za kojim su sledile i delecije RD7, RD8 i RD11 (Haddad i sar.,2004). Sa druge strane, savremeni sojevi *M.tuberculosis* čine zasebnu liniju koja se pojavila pre oko 35.000 godina, i bila prisutna u populaciji ljudi, pre pojave *M.bovis* linije i stoga su filogenetski bliži zajedničkom MTB-kompleksu progenitoru. Na osnovu opširnih genetskih ispitivanja i poređenja genskih delecija u genomima pojedinih mikobakterija iz MTB-kompleksa, čini se izvesnim da je humani tip bacila, prethodio formama izolovanim iz goveda, koza, foka i glodara (Brosch i sar., 2002). Nedavnim molekularnim ispitivanjem uzoraka mikobakterijske DNK dobijenih iz fosila bizona starih više od 17.000 godina, ustanovljen je spoligotipni obrazac koji je mnogo bliži *M.tuberculosis* i *M.africanum* nego *M.bovis*, što može ukazivati da se ova vrsta u to vreme još nije pojavila, čime se dodatno potkrepljuju rezultati prethodnih istraživanja o evolutivnom razvoju pojedinih sojeva (Smith i sar., 2009).

Distribucija genomskih delecija ukazuje da današnji *M.bovis*, nije evolutivni prekurzor *M.tuberculosis* na filogenetskom stablu, i suprotstavlja se ranije rasprostranjenom mišljenju da je do širenja tuberkuloze u populaciji ljudi došlo nakon domestikacije goveda (Smith, 2012). Slične rezultate iznose Mostowy i sar., (2002) koji navode da RD regioni prisutni u *M.tuberculosis* H37 Rv, koji nedostaju u virulentnim *M.bovis* sojevima, ukazuju na filogenetsku evoluciju članova MTB-kompleksa, te da se uzročnik tuberkuloze ljudi ranije javio od mikobakterija izolovanih iz glodara, foka, goveda i koza. Intenzivno proučavanje DNK homologije pojedinih sojeva otkrilo je 95-100% YO DNK podudarnosti između pojedinih članova kompleksa, što može implicirati da svi članovi tuberkuloznog kompleksa zapravo pripadaju istoj vrsti. Sa druge strane, molekularna analiza DNK sekvenci *rpoB*, *katG*, *rpsL* i *gyrA* gena pokazala je veoma izraženu osobenost bakterija članova *Mycobacterium tuberculosis* kompleksa (van Soolingen i sar.,2001). Identifikacija pojedinih članova MTB-kompleksa pre uvođenja molekularnih metoda, zasnivala se tradicionalno na kulturelnim osobinama izolata, odnosno karakteristikama rasta bakterija na podlogama (stvaranje pigmenta, izgled i brzina rasta kolonija) kao i na biohemijskim testovima. Različite tehnike genotipizacije koje su razvijene za analizu pojedinih članova MTB-kompleksa, u velikoj meri su proširile i olakšale razumevanje filogenetskog razvoja i postale nezaobilazno oruđe u proučavanju epidemiologije tuberkuloze (Gormley i sar., 2014). DR (eng. direct repeat) region koji je bio predmet intenzivnog ispitivanja metodom spoligotipizacije u molekularno-epidemiološke svrhe, može biti izvor korisnih informacija i u proučavanju populacione genetike (Rodriguez-Campos i sar.,2014). Sa druge strane, delecije u RD regionu su jednosmerni evolucionari događaji i jednom izgubljeni delovi nikada se više ne stiču, pa ove informacije imaju značaja za filogenetski scenario i rekonstrukciju evolutivnog razvoja MTB-kompleks bakterija (Brosch i sar., 2002). Stoga je proučavanje RD regiona u mnogome doprinelo rekonstrukciji evolucionog procesa u okviru bakterija MTB-kompleksa i omogućilo definisanje određenih klonalnih grupa unutar kompleksa, koje su prilagođene pojedinim vrstama domaćina. Jasne razlike u spoligotipnom obrascu, tzv. spoligotipni potpis mogu biti upotrebljene kao indikatori određenih linija, odnosno klastera u okviru vrsta *M.tuberculosis*, *M. bovis* i *M.caprae* (Smith, 2012).

Slika 1. Filogenetski razvoj MTB-kompleks bakterija na osnovu prisustva/odsustva regiona razlikovanja (eng.regions of difference RD) i pojedinačnog nukleotidnog polimorfizma (SNPs).



Siva polja označavaju deleciju RD regiona, bele kućice označavaju SNPs , a brojevi označavaju poziciju mutacije na nukleotidu (n) ili kodonu reprezentativnog gena (c). Brojevi u zagradama pored označavaju gubitak spejsera na spoligotipnom obrascu. Slika je preuzeta iz rada:Rodriguez-Campos Sabrina i sar.: Overview and phylogeny of *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms: Implications for diagnostics and legislation of bovine tuberculosis Research in Veterinary Science 97 (2014) S5–S19

2.3. EPIZOOTIOLOGIJA TUBERKULOZE GOVEDA

Tuberkuloza goveda rasprostranjena je širom sveta kod različitih vrsta bovida, a širenje je najverovatnije posledica kretanja i prometa domaćih goveda (Smith, 2012). Uvoz živih životinja je najvažniji put za unošenje zarazne bolesti u države ili regione koji su slobodni od infekcije. Holandija iako zvanično slobodna od tuberkuloze goveda od 1999. godine, u poslednjih 15 godina suočavala se sa čestim unosom tuberkuloze uvozom goveda kako iz država EU koje nisu zvanično slobodne od tuberkuloze, tako i onih koje imaju status zvanično slobodnih (de Vos i sar.,2015).

Prema informacijama dostupnim u bazi podataka OIE-a, 128 od 155 država sveta prijavilo je prisustvo infekcije sa *M.bovis* i/ili pojavu klinički manifestne bolesti kod goveda ili drugih vrsta bovida tokom perioda od 2005. do 2008. godine <http://www.oie.int/wahis/public.php?page=-home>. Tuberkuloza goveda, prvenstveno uzrokovana sa *M. bovis*, a u znatno manjem obimu sa *M.caprae*, endemski je prisutna u mnogim evropskim državama i nanosi velike ekonomske gubitke stočarskoj proizvodnji. U poslednjim godinama u Evropskoj uniji, ukupna prevalencija tuberkuloze goveda raste kako u državama koje su stekle status zvanično slobodnih od tuberkuloze, tako i u državama članicama u kojima se sprovode različiti programi eradikacije (Schiller i sar., 2011). Tokom 2007. godine 0,57% stada goveda bila su pozitivna na tuberkulozu, dok je 2006. taj procenat iznosio 0.48%. Najnepovoljnija situacija je trenutno u Velikoj Britaniji i Irskoj, gde je tuberkulozom inficirano 4,37 odnosno 3,27% zapata goveda, a prevalencija nastavlja da raste, uprkos intenzivnim merama kontrole, uzrokujući materijalnu štetu koja se procenjuje na 108 miliona funti (Defra, 2009). Poseban problem predstavlja reaktivacija žarišta iako su preduzete pojačane mere nadzora i kontrole, pa se tako u roku od 12 meseci po okončanju prve epizode infekcije, u 23% zapata registruju novi slučajevi, dok se ta brojka u periodu od 24 meseca povećava na 38% zapata. Ovoj pojavi u velikoj meri doprinosi nedovoljna osetljivost tuberkulinskog testa, reaktivacija latentne infekcije kod nekih životinja kao i duže zadržavanje u zapatu grla sa sumnjivom ili nedovoljno jasnom tuberkulinskom reakcijom (Karolemeas i sar.,2012.).

Tuberkuloza goveda rasprostranjena je širom Afričkog kontinenta, ali su intenzitet infekcije i prevalencija u većini država nedovoljno poznati usled ekonomskih

ograničenja, nerazvijene veterinarske infrastrukture i nepostojanja mera kontrole (Michel i sar., 2010). U Nemačkoj je u periodu između 1995. i 2008., registrovano 119 žarišta tuberkuloze goveda, ali se taj broj u poslednje vreme povećava, pa ih je tako u 2007. godini bilo 12, a tokom 2008. ustanovljena su 23 nova žarišta. Kao najznačajniji faktor u širenju tuberkuloze identifikovana je trgovina živim govedima. Genotipizacija izolata jasno je potvrdila međusobnu povezanost 12 od ukupno 23 identifikovana žarišta u 2008 godini (Schiller i sar., 2011).

Prema istraživanjima koja je za vladu Velike Britanije izvršio Komitet za ispitivanje stočnih zaraza tokom 30-tih godina prošlog veka, više od 40% goveda u Engleskoj i Velsu bilo je inficirano sa *M.bovis*, a 0,5% je imalo tuberkulozni mastitis. U istom periodu oko 2500 ljudi godišnje umiralo je od posledica infekcije uzročnikom zoonozne tuberkuloze (Francis 1947). U Švajcarskoj početkom 50-tih godina prošlog veka kada je i uvedena obavezna kontrola tuberkuloze goveda, prevalencija na nivou zapata iznosila je oko 25%, dok je istovremeno, oko 10% slučajeva tuberkuloze ljudi bilo uzrokovano sa *M.bovis*. Od 1980. godine prešlo se na pasivni nadzor u klanicama, i otkrivani su samo pojedinačni slučajevi, koji su u određenom broju bili, posledica reaktivacije starih infekcija kod ljudi i kasnijeg širenja na goveda (Schiller i sar., 2011).

U Španiji tokom 1997. godine tuberkuloza je ustanovljena kod 1,26% goveda iz nacionalnog stada, a koja potiču iz ukupno 4,56% od svih registrovanih zapata (Anon 1998). Prevalencija inficiranih zapata je u stabilnom padu sa 4,3% u 1999 godini na 1,8% u 2004 godini. U Češkoj republici pojava tuberkuloze goveda izazvane vrstom *M.bovis* u periodu 1990-1999. bila je sporadična, a broj inficiranih grla ni jedne godine nije prelazio 0,04% ukupnog broja registrovanih životinja. Među izolatima dominirale su mikobakterije iz *M.avium* kompleksa i atipične mikobakterije. U ovom periodu otkriveno je ukupno 7 žarišta, od čega je pet bilo u zapatima sa više od 10 goveda, dok su 2 bila u manjim zapatima. Svi inficirani zapati eliminisani su u vremenskom periodu od nekoliko meseci od postavljanja prvobitne dijagnoze. U svim slučajevima inficiranih goveda, *M.bovis* je izolovana iz pluća ili bronhijalnih limfnih čvorova na kojima su bile vidljive tuberkulozne lezije, dok je kod jedne muzne krave potvrđeno prisustvo uzročnika u mleku (Pavlik i sar.,2002).

U Australiji, SAD, Evropi, delu Južne Amerike i Kubi, strategija obaveznog testiranja i uklanjanja inficiranih goveda rezultirala je skoro potpunim iskorenjivanjem

tuberkuloze. U pogledu statusa u odnosu na tuberkulozu goveda, države članice EU mogu biti klasifikovane na dva načina; kao zvanično slobodne (eng. tuberculosis officially free TBOF) ili države koje nisu slobodne od tuberkuloze goveda. Epizootološka situacija kada je u pitanju tuberkuloza goveda nije ista u pojedinim državama članicama i u velikoj meri oslikava razlike u načinu držanja goveda koje je prilagođeno različitim geografsko-klimatskim uslovima. Najveći broj inficiranih jedinki i zapata registrovan je u Irskoj i Severnoj Irskoj, gde je prevalencija na nivou zapata 7,3%, pri čemu je 2003. godine uklonjeno 16.000 tuberkulin pozitivnih goveda iz 3000 zapata, dok je situacija u južnim delovima Evrope varijabilna (Reviriego Gordejo i Vermeersch, 2006). U pojedinim regionima Italije koji nisu zvanično slobodni od tuberkuloze i pored implementacije programa eradikacije tuberkuloze, kofinansiranih od strane EU, primećuje se porast broja inficiranih zapata, pa je u pogledu statusa u odnosu na prisustvo tuberkuloze goveda, u Italiji izvršena regionalizacija (Schiller i sar., 2011). U većini zemalja članica EU, izuzev Velike Britanije, epizootološka situacija u pogledu tuberkuloze goveda je uglavnom povoljna. Broj zapata goveda koji se nalaze pod različitim stepenom restrikcije zbog prisustva tuberkuloze u Velikoj Britaniji 2004 godine iznosio je 5,66% od ukupnog broja, što je mala razlika u odnosu na prethodnu godinu kada je bilo 5,65% inficiranih zapata. Međutim, incidencija tuberkuloznih zapata goveda pokazuje negativan rast, i broj novoinficiranih stada porastao je sa 3220 u 2003 na 3339 u 2004 godini, sa glavnim žarištem u Zapadnoj Engleskoj i Velsu, ali sa tendencijom laganog širenja i na druge delove zemlje. Tako je tokom 2004 godine ukupno 5263 zapata goveda bilo pod različitim nivoom restrikcije usled izbijanja tuberkuloze, pri čemu nije bilo bitne razlike među zapatima tovni i mlečnih goveda. Zbog visoke incidencije tuberkuloze u nacionalnom stadu goveda, Velika Britanija je jedna od retkih zemalja Zapadne Evrope koja nema status zvanično slobodne od tuberkuloze goveda prema važećim EU standardima (de la Rua-Domenech i sar., 2006a), pa ovo oboljenje i danas predstavlja jedan od glavnih zdravstvenih problema u govedarstvu. Tokom 2007. godine u Velikoj Britaniji je otkriveno 4172 novoinficiranih zapata, pri čemu su direktni troškovi implementacije programa suzbijanja tuberkuloze iznosili ukupno nešto više od 58 miliona funti (Defra, 2009).

Pojedine države članice EU ili regioni, nakon višedecenijskog sprovođenja programa suzbijanja i eradikacije tuberkuloze goveda, zvanično su stekle status

slobodnih od tuberkuloze, npr. Danska 1980., Holandija 1995., Nemačka i Luksemburg 1997., Austrija i neki regioni u Italiji 1999., Francuska 2001. i Belgija 2003. Godine. Neke države su posle uspešno implementiranih nacionalnih programa eradikacije tuberkuloze, stekle status zvanično slobodnih u momentu priključenja EU: Finska i Švedska 1995., Češka 2004. (Reviriego Gordejo i Vermeersch, 2006). Jedinствена politika EU u pogledu iskorenjivanja tuberkuloze goveda, zasniva se na dva osnovna principa: države članice su odgovorne za iskorenjivanje tuberkuloze na sopstvenoj teritoriji, uz finansijsku podršku Unije, a konačno iskorenjivanje tuberkuloze goveda u EU mora biti krajnji cilj, što države članice moraju imati kao definisanu strategiju.

U populaciji goveda glavni put širenja *M.bovis* infekcije je putem inhalacije aerosola koji nastaju pri kašljanju i kijanju zaraženih jedinki ili preko kontaminiranih čestica prašine. Moguće je i indirektno širenje infekcije preko kontaminiranih pašnjaka, hrane, vode i različitih predmeta i opreme (Cousins 2001; Neill i sar, 1994). Eksperimentalna ispitivanja na govedima pokazala su da je za nastanak infekcije i razvoj patoloških promena dovoljna jedna CFU (Colony forming Unit odnosno 6-10 bacila) *M.bovis*, unesena intratrahealno (Dean i sar., 2005). Infekcija alimentarnim putem, dešava se znatno ređe i potrebna je mnogostruko veća infektivna doza (Neill i sar., 2001). Pod prirodnim uslovima *M. bovis* može se preneti sa goveda na različite druge vrste domaćih i divljih životinja i obrnuto, zatim sa životinja na čoveka i znatno ređe sa čoveka na životinje ili sa čoveka na čoveka (Collins 2001).

2.3.1. Prenošenje infekcije sa goveda na ljude

Prvi dokazi o zoonoznom karakteru tuberkuloze goveda potiču još iz praistorijskog perioda. Ispitivanjem mumija, koje datiraju iz Gvozdenog doba, pronađenih u Južnom Sibiru, na kojima su uočene promene karakteristične za tuberkulozu kostiju (Potova bolest) primenom savremenih metoda genotipizacije, kao uzročnik oboljenja identifikovan je *M.bovis* (Taylor i sar., 2007).

Infekcija ljudi sa *M.bovis*, u drugoj polovini 20. veka, bila je retka pojava u visoko industrijalizovanim zemljama. Prema podacima iz 1977 godine, od 1632 bakteriološki potvrđena slučaja tuberkuloze, u jugoistočnoj Engleskoj, u 20 (1,2%) uzročnik je bio *M.bovis* (Grange i Yates, 1994). Ipak treba imati u vidu da kod pojave tuberkuloze ljudi koja se u državama članicama EU obavezno prijavljuje najčešće nije specificirano koja

vrsta iz MTB-kompleksa je uzročnik (Reviriego Gordejo i Vermeersch, 2006). Postoje dve osnovne poteškoće na koje se nailazi pri pokušaju ustanovljavanja stvarne incidencije i prevalencije infekcije ljudi vrstom *M.bovis* i drugim zoonoznim mikobakterijama. Jedna leži u činjenici da infekcija ljudi bilo kojim mikroorganizmom iz MTB-kompleksa, ne mora nužno dovesti i do kliničkih manifestacija oboljenja, a druga da se u većini laboratorija u slučaju pojave oboljenja ne radi rutinska diferencijacija uzročnika MTB-kompleksa (de la Rúa-Domenech, 2006b). Istraživanja koja su vršili Wedlock i sar., (2002) pokazala su da je 30% dece sa kliničkom prezentacijom tuberkuloze, duž američko–meksičkog graničnog pojasa inficirano vrstom *M.bovis*. Situacija se nije mnogo promenila tokom naredne decenije, pa Rodwell i sar., (2010) navode da daleko najveći broj *M.bovis* izolata poreklom od obolelih ljudi u Kaliforniji ima spoligotipni obrazac, koji se sreće samo kod goveda u Meksiku. Epidemiološka istraživanja pokazuju da je glavni put prenošenja infekcije konzumiranje posebne vrste mekog sira queso fresco, koji se proizvodi od nepasterizovanog kravljeg mleka, i ilegalno unosi u Ameriku.

Terapijski protokol kod većine pacijenata ne zavisi od precizne identifikacije uzročnog agensa, pa se mali broj laboratorija i medicinskih centara opredeljuje za diferencijaciju između *M.bovis*, *M.caprae* i *M.tuberculosis* što zahteva vreme i sredstva. Ipak ne treba izgubiti iz vida da je većina sojeva *M.bovis*, prirodno rezistentna na pirazinamid, pa upotreba ovog antituberkulotika prve linije, nije indikovana u slučaju sumnje na zoonoznu tuberkulozu (Parreiras i sar., 2004).

U zemljama u razvoju a naročito državama Trećeg sveta, mere suzbijanja tuberkuloze goveda na principima testiranja i obaveznog uklanjanja obolelih grla se retko gde primenjuju, i većina stada goveda je gotovo bez ikakve kontrole. Novija istraživanja pokazuju da je oboljenje rašireno u Africi, u Egiptu oko 6,5% slučajeva plućne tuberkuloze uzrokovano je sa *M.bovis*, u Nigeriji 3,9%, a u Tanzaniji postoji pozitivna korelacija između pojave ekstrapulmonalne tuberkuloze ljudi i broja stoke u pojedinim regionima države (Cosivi i sar., 1998; Michel i sar.,2010). U Južnoj Americi prosečno 2% slučajeva plućne i oko 8% tuberkuloze sa ekstrapulmonalnom lokalizacijom uzrokovano je sa *M.bovis*, s tim da su procenti viši u regionima sa intenzivnom govedarskom proizvodnjom. De Kantor i sar., (2008) izveštavaju da su samo četiri Latinoameričke države prijavile bakteriološki potvrđene slučajeve zoonozne

tuberkuloze kod ljudi. Najveći broj slučajeva odnosio se na Argentinu gde je prosečno broj infekcija ljudi sa *M.bovis* u odnosu na *M.tuberculosis* u periodu 2000-2006. godine, varirao između 0,35-1%, u zavisnosti od regiona. Međutim, autori ističu da ovo ne oslikava pravo stanje stvari, jer se u većini država ne radi rutinski bakteriološka kultivacija, a naročito ne na podlogama koje sadrže piruvat, što dovodi do potcenjivanja problema.

Neki autori iznose pretpostavke da se *M.bovis* može smatrati uzročnikom tuberkuloze u 10-15% pacijenata od 7-10 miliona novo dijagnostikovanih slučajeva u zemljama Trećeg sveta tokom 2000. godine (Ashford i sar.,2001). Nedavna istraživanja Moonan-a i sar.,(2009) ukazuju da je od 11.860 izolata dobijenih od pacijenata u SAD, genotipskom analizom kod 165 (1,4%) ljudi ustanovljena infekcija sa *M.bovis*. U Meksiku gde je veoma raširena konzumacija termički neobrađenog mleka i mlečnih proizvoda, Perez-Guerrero i sar., (2008) ustanovili su da je kod 13,8% pacijenata sa kliničkom tuberkulozom uzročnik identifikovan kao *M.bovis*.

Čestice aerosola koje nastaju tokom obrade trupova zaklanih tuberkuloznih goveda, predstavljaju znatan rizik za infekciju klaničnih radnika. U Australiji od 3000 klaničnih radnika petoro je obolelo tokom perioda od dve godine (Jensen 1952). Uzimajući u obzir učestalost pojave goveđe tuberkuloze kod klaničnih radnika u Australiji, grupa istraživača predlagala je da se oboljenje uvrsti u profesionalni rizik. Kao glavni put infekcije navode inhalaciju infektivnog aerosola pri čemu se razvija plućna tuberkuloza (Robinson i sar.,1988). Kod aerogeno inficiranih ljudi razvija se plućna tuberkuloza koju je nemoguće klinički razlikovati od tuberkuloze uzrokovane sa *M.tuberculosis*, dok se pri konzumaciji mleka infekcija odvija preko tonzila ili crevne sluzokože, što dovodi do uvećanja cervikalnih i mezenterijalnih limfnih čvorova ponekad uz formiranje abscesa. Diseminacija uzročnika iz primarnog kompleksa putem krvi za posledicu ima pojavu izolovane organske tuberkuloze kostiju, bubrega, zglobova i moždanih ovojnica (Grange, 2001). Iako retko, infekcija ljudi moguća je i preko ozleda na koži, što je nekada bio profesionalni rizik ljudi u klaničnoj preradi, a lokalne promene koje su se razvijale nazvane su „kasapske bradavice“. Do infekcije ljudi sa *M.bovis* gotovo u svim slučajevima dolazi inhalacijom infektivnih aerosola ili konzumacijom mleka i mlečnih proizvoda kontaminiranih uzročnikom. Najvećem riziku od inhalacione infekcije izloženi su ljudi koji svakodnevno dolaze u dodir sa inficiranim

životinjama, kao što su klanični radnici, farmeri, veterinari, lovci, čuvari u zoo vrtovima i sl. U radovima većeg broja autora prikazani su slučajevi koji ukazuju da je bovini tip tuberkuloze najčešće profesionalno oboljenje, a da je izloženost kontaminiranom aerosolu najčešći put širenja infekcije (Cousins i Dawson, 1999; Dalovisio i sar., 1992, Sauret i sar., 1992). Međutim, Torgerson i Torgerson, (2009) smatraju da trend opadanja broja slučajeva zoonozne tuberkuloze kod ljudi, uprkos značajnom porastu broja obolelih goveda potvrđuje hipotezu da je tuberkuloza goveda oboljenje koje se prenosi prvenstveno alimentarnim putem, najčešće preko mleka, što je u razvijenim zemljama onemogućeno nakon uvođenja obavezne pasterizacije. Oni ukazuju da je i pre uvođenja programa obaveznog suzbijanja tuberkuloze goveda, bilo vrlo malo dokaza o prenošenju tuberkuloze sa goveda na ljude putem aerosola.

Do infekcije može doći i *per os* preko zaprljanih ruku, nakon rada sa inficiranim životinjama ili trupovima. Konzumiranje sirovog ili nedovoljno termički obrađenog mesa inficiranih goveda, predstavlja izuzetno mali rizik za nastanak infekcije kod ljudi u razvijenim zemljama (de la Rua- Domenech, 2006b).

Zbirni podaci za period 1997-2003., pokazuju da je 31% registrovanih slučajeva tuberkuloze ljudi u EU, gde se kao uzročnik javlja *M. bovis*, ustanovljeno u Velikoj Britaniji; to je jedna od država članica sa najvišom prevalencijom tuberkuloze goveda. Ipak, sa privođenjem kraju programa eradikacije tuberkuloze kod goveda goveda, došlo je do naglog pada incidencije humane tuberkuloze uzrokovane sa *M.bovis*. Najočigledniji je bio drastični pad broja dece obolele od tuberkuloznog cervikalnog limfadenitisa, što je bila najčešća manifestacija primarne tuberkuloze uzrokovane konzumacijom inficiranog mleka. Uprkos ponovnom rastu broja inficiranih goveda u Velikoj Britaniji od sredine 80-tih godina 20. veka, broj klinički obolelih ljudi sa bakteriološki potvrđenom infekcijom vrstom *M.bovis* u Engleskoj se od devedesetih na ovamo kreće u rasponu od 0,5-1,5% svih dijagnostikovanih slučajeva. Glavni razlog za to su obavezna pasterizacija mleka, redovno testiranje i brzo uklanjanje tuberkuloznih goveda (de la Rua-Domenech, 2006b). Međutim, goveda nisu jedini izvor infekcije *M.bovis* za ljude. Tako su zabeleženi slučajevi infekcije ljudi od strane farmški uzgajanih jelena, foka, koza, bivola, svinja, životinja iz zoovrtova itd. (Rodriguez-Campos i sar., 2014).

Na osnovu kliničkih manifestacija, radioloških i patomorfoloških karakteristika, nije moguće razlikovati tuberkulozu uzrokovanu sa *M.bovis* ili *M.tuberculosis*. Zbog načina inficiranja *M.bovis* nešto češće uzrokuje ekstrapulmonalnu tuberkulozu (Griffith, 2014).

Široko je rasprostranjena, ali nedokazana pretpostavka da je *M.bovis*, slabije virulentan za ljude u odnosu na *M.tuberculosis*. Razlike u virulenciji mogu se ogledati u težini kliničkog oboljenja, odnosu broja inficiranih prema broju obolelih, incidenciji širenja uzročnika sa čoveka na čoveka i verovatnoći endogene reaktivacije godinama ili decenijama nakon inicijalne infekcije (Grange, 2001). Veoma je teško kvantifikovati i obezbediti precizne informacije o navedenim odnosima, ali postoje mišljenja da infekcija bovinim tipom uzročnika tuberkuloze ne samo da ređe dovodi do pojave oboljenja kod ljudi, nego ima i značajan imunizujući efekat u sprečavanju oboljenja uzrokovanog sa *M.tuberculosis*. Tako u prilog navedenom, Rey i sar., 1977. navode da je incidencija pulmonalne tuberkuloze u populaciji ljudi pet puta veća u delovima Burkin Faso u kojima se retko javlja tuberkuloza goveda, u odnosu na delove ove države u kojima je tuberkuloza goveda raširena. Autori smatraju da je konzumiranje inficiranog mleka dovelo do prirodne imunizacije. Na drugom kraju sveta u zemljama Skandinavije, došlo je do privremenog povećanja morbiditeta i mortaliteta ljudi od tuberkuloze koje se poklapalo sa završetkom iskorenjivanja tuberkuloze kod goveda (Sjögren i Sutherland 1978). Veoma je malo dostupnih informacija o prevalenciji asimptomatske (latentne) infekcije izazvane sa *M.bovis* u populaciji ljudi, mada postoje indicije koje ukazuju da infekcija retko progredira u klinički manifestnu bolest (de la Rua-Domenech 2006b). Smatra se da se prenošenje *M.bovis* sa čoveka na čoveka, dešava u retkim situacijama, koje su najčešće povezane sa stanjima imunološkog deficita. Povećana prijemčivost HIV pozitivnih pacijenata na infekciju mikobakterijama, može dovesti do promene, pa je realno očekivati da ljudi od „slepe ulice“, postanu rezervoar u kome se *M.bovis* održava i nezavisno širi. Prenosnje *M.bovis* među HIV pozitivnim pacijentima opisano je od strane većeg broja istraživača i najčešće je povezano sa razvojem MDR sojeva (eng. multi drug resistant MDR) (Guerrero i sar., 1997; Samper i sar., 2007). Intrabolničke epidemije uzrokovane MDR sojevima *M.bovis* i prenošenje infekcije među imunokompetentnim pacijentima opisane su u Španiji i Italiji (Gutierrez i sar, 1997).

Osim goveda, kao potencijalni izvor infekcije za ljude javljaju se i farmški uzgajani jeleni, koze, bivoli, a od divljih sisara oposumi, feretke, vodeni bivoli, antilope, jeleni i bizon. Prenosnje infekcije sa drugih životinja osim goveda na ljude javlja se samo sporadično (de la Rúa-Domenech 2006b). U literaturi iako oskudni, postoje podaci o infekciji ljudi u Kanadi koji su radili na depopulaciji tuberkuloznog zapata jelena (Liss i sar.,1994). Na Novom Zelandu zabeleženo je nekoliko slučajeva kutane tuberkuloze kod ljudi koji su učestvovali u hvatanju inficiranih oposuma (Gallagher i sar., 1998).

Kod svih ostalih životinjskih vrsta infekcija sa *M.bovis* ima samoograničavajući karakter i javlja se samo dok je u ekosistemu prisutna životinjska vrsta u kojoj se infekcija prirodno održava. Ovakve vrste označavaju se kao „spill over“ i ustvari predstavljaju slepi kolosek infekcije (de Lisle i sar., 2001). Incidencija pojavljivanja i razmere patološkog procesa ukazuju da ove vrste nemaju značajnu ulogu u daljem širenju infekcije. Primer su ovce i konji koji obolevaju izuzetno retko i mogu se smatrati slepom ulicom za mikobakterije. Pojedine životinjske vrste iz ove grupe mogu imati ulogu u amplifikaciji infekcije, pa se tako ovde ubrajaju kamile, psi, mačke, svinje, divlje svinje i koze, jer u slučaju infekcije mogu biti izvor zaraze za druge životinje i čoveka (de la Rúa-Domenech, 2006b). Tuberkuloza pluća ili diseminovana tuberkuloza kod pasa i mačaka, predstavlja potencijalni rizik za infekciju, u slučajevima kada se vlasnici odluče da ih leče umesto da ih eutanaziraju (Monies i sar.,2000). Koze su veoma prijemčive za *M.bovis* i obolevaju kako od plućne tuberkuloze, tako i od tuberkuloznog mastita, uz izlučivanje velikog broja uzročnika mlekom. U Španiji su opisani slučajevi oboljevanja ljudi koji su bili u kontaktu sa kozama inficiranim sa *M.bovis* (Aranaz i sar., 1999). Infekcija ljudi vrstom *M.caprae* registrovana je u svim Srednje Evropskim državama u kojima je ovaj uzročnik dominantno prisutan u populaciji goveda (Prodinger i sar.,2005). Interesovanje za ovog patogena raste od momenta otkrića, i do sad je izolovan iz tuberkuloznih lezija, goveda, koza, svinja, divljači i čoveka. Smatra se da je oko trećina ljudi obolelih od zoonozne tuberkuloze u Nemačkoj inficirana sa *M.caprae* (Erler i sar.,2004). Zoonozno prenošenje pre svega sa goveda i koza, čini se da je glavni izvor infekcije za čoveka, jer do sada ne postoje jasni dokazi o prenošenju uzročnika direkto sa čoveka na čoveka. Smatra se da se incidencija infekcije sa *M.caprae* u populaciji ljudi kreće oko 0,3% od ukupno obolelih od

tuberkuloze, pri čemu je gotovo potpuno ograničena na Evropu u kojoj je ona najprisutnija (Nebrada i sar., 2016). Dürr i sar., (2013) u svojim istraživanjima uočili su izrazitu povezanost zoonozne tuberkuloze sa ekstrapulmonalnom lokalizacijom lezija, u poređenju sa tuberkulozom uzrokovanom sa *M.tuberculosis*, pri čemu su ustanovili da su najčešće zahvaćeni limfni čvorovi, genitalni i urinarni organi. Rizik od zoonoznog prenošenja tuberkuloze veći je u nerazvijenim zemljama, usled raširenosti infekcije u populaciji goveda, ali i drugih vrsta životinja, odsustva pasterizacije mleka, različitih lokalnih kulturnih navika koje uključuju suživot sa životinjama, siromaštva povezanog sa pothranjenošću i visoke prevalencije HIV infekcije (Michel i sar., 2010).

2.3.2. Prenosnje infekcije sa ljudi na goveda

Ljudi kod kojih je prisutna aktivna tuberkuloza uzrokovana vrstom *M. bovis*, mogu inficirati goveda, koja nakon toga daju pozitivnu reakciju na tuberkulinskom testu, a infekcija može napredovati ka kliničkom razvoju bolesti. Do infekcije goveda najčešće dolazi aerogenim putem (Du i sar., 2010, Collins i Grange 1987), međutim u literaturi je opisan slučaj farmera sa genitourinarnom tuberkulozom izazvanom vrstom *M.bovis* koji je širio infekciju na goveda uriniranjem u štali. Zabeleženo je, da je na ovaj pomalo bizaran način, farmer inficirao 48 goveda u 4 različita zapata (Schliesser, 1974). Wedlock i sar., (2002) navode da u svetlu svetske pandemije izazvane HIV virusom, postoji zabrinutost zbog rastuće mogućnosti da ljudi koinficirani virusom HIV-a i *M.bovis* budu izvor za unošenje infekcije u populaciju goveda. Međutim, novija istraživanja pokazuju da je i *M.tuberculosis* primarni uzročnik tuberkuloze ljudi opisan kao čest uzročnik tuberkuloze goveda u Kini (Du i sar., 2011). Ruetger i sar., (2012), ustanovili su infekciju kod goveda u Ukrajini uzrokovanu vrstom *M. tuberculosis* tip Peking naglašavajući antropozoonozni karakter infekcije.

2.3.3. Prenosnje infekcije sa divljih životinja na goveda i ljude

Infekcija sa *Mycobacterium bovis* prisutna je kod različitih divljih životinja u Evropi, SAD, Africi i Novom Zelandu. U određenim delovima sveta pojedine vrste divljih životinja imaju ulogu rezervoara, a manifestacija i tok infekcije nisu isti kod svih (Corner, 2006). Tuberkuloza divljači može imati i značaj za javno zdravlje pošto inficirane životinje mogu predstavljati izvor infekcije za čoveka. Prema Morris i Pfeiffer,1995., divlje životinje se na osnovu dinamike infekcije u populaciji mogu

klasifikovati u dve grupe: rezervoari odnosno vrste u kojima se infekcija održava i slučajni domaćini. U prvoj grupi infekcija perzistira i širi se samo intraspecijiski, dok je u drugoj za održavanje infekcije neophodno ponovno unošenje uzročnika putem neke druge životinjske vrste. Ipak, širenje infekcije sa slučajnih domaćina na domaće životinje moguće je u izvesnim slučajevima. Utvrđivanje kojoj grupi pripada neka vrsta divljači je značajno sa aspekta sagledavanja potreba za kontrolom i suzbijanjem infekcije u populaciji kao i za predviđanje toka i perzistencije infekcije u populaciji nakon uklanjanja tuberkulozne jedinice. Na širenje i prenošenje infekcije unutar grupe divljih životinja kao i između različitih vrsta životinja, značajnu ulogu imaju sledeći faktori: putevi intraspecijiskog prenošenja, anatomska lokalizacija patoloških promena, struktura i tip lezija, način na koji se uzročnik izlučuje i količina, putevi infekcije goveda i minimalna infektivna doza za svaki pojedinačni put prenošenja (Sheridan, 2011).

Kao primer slučajnog domaćina u kome se infekcija nemože samostalno održavati bez povremene reintrodukcije mogu se uzeti divlje svinje. Prema istraživanjima Corner-a (2006), u populaciji divljih svinja u Severnoj Australiji prevalencija infekcije bila je visoka, a ipak ova vrsta životinja nije imala značajnu ulogu u epizootologiji tuberkuloze goveda jer svinje nisu izlučivale signifikantne količine uzročnika. Ranija istraživanja istog autora sprovedena tokom sedamdesetih godina prošlog veka, ukazivala su da je u pojedinim oblastima prevalencija tuberkuloze u populaciji divljih svinja bila i preko 40%, pri čemu je do infekcije najverovatnije dolazilo nakon ingestije ostataka uginulih inficiranih goveda ili bivola. Istraživanja koja je sproveo 20-tak godina kasnije (McInerney i sar., 1995) pokazala su da je kod neznatnog broja svinja ustanovljena generalizovana infekcija, a lezije su najčešće bile ograničene na submandibularne limfne čvorove, nisu bile veće od 1-2 mm u dijametru dobro inkapsulirane i sa malim brojem mikobakterija. Na osnovu ovoga, autori zaključuju da je divlja svinja u Australiji slučajni domaćin i „slepa ulica“ u širenju infekcije. Epizootologija, patogeneza i distribucija patomorfoloških promena kod bivola identična je onoj kod goveda i gotovo isključivo se vezuje za respiratorni put prenošenja. Kod kuna tuberkulozne promene se najčešće nalaze na mezenterijalnim limfnim čvorovima, pri čemu su one makroskopski vidljive kod malog broja inficiranih jedinica. Lezije na respiratornim organima se sreću izuzetno retko, a kune izlučuju

uzročnika preko fecesa. Da li se kune mogu smatrati vrstom za održavanje ili se radi o slučajnom odnosno krajnjem domaćinu, nije još uvek sasvim razjašnjeno. Tuberkulozne lezije kod virdžinijskog jelena povezane su sa gornjim i donjim delovima respiratornog trakta i limfnim čvorovima glave pri čemu su prvenstveno zahvaćeni medijalni retrofaringealni limfni čvorovi (O'Brien i sar., 2001). Ovo navodi na zaključak da se infekcija u populaciji jelenske divljači širi putem aerosola, iako pod određenim specifičnim okolnostima do infekcije može doći i peroralno. Ponovna pojava tuberkuloze kod goveda u američkoj saveznoj državi Mičigen koja se nakon izvršene eradikacije smatrala slobodnom, povezuje se sa održavanjem uzročnika u grupama jelena kao rezervoara. Međutim, studija koju su sproveli DeLiberto i sar., (2004) o ponašanju goveda i jelena na paši, otkrila je da su direktni kontakti između njih izuzetno retki. Sa druge strane istraživanja brojnih autora (Schmitt i sar.,2002; Bruning-Fann i sar., 2001) potvrdila su prisustvo infekcije *M. bovis* kod 16 različitih vrsta divljači, ali ni kod jedne nisu ustanovljene patomorfološke promene koje bi ukazale da one predstavljaju izvor zaraze za goveda. Zaključak je da je način na koji se infekcija širi iz grupa jelena na goveda zasad nerazjašnjen. Međutim, kao prepreku potpunom eliminisanju tuberkuloze goveda u Austriji i Nemačkoj Schiller i sar. (2011), navode visok procenat inficiranih jelena koji u Alpima dele iste pašnjake sa govedima, dok u Velikoj Britaniji i Irskoj kao glavni uzrok za porast incidencije tuberkuloze goveda smatraju raširenost infekcije u populaciji jazavaca (preko 65% inficiranih jedinki) koji borave na pašnjacima i u kojima se infekcija održava i širi nezavisno od goveda (More i sar., 2007; Sheridan 2011).

Veliki broj različitih vrsta divljih životinja je uključen u epizootologiju tuberkuloze goveda, što treba uzeti u obzir pri izradi strategije suzbijanja i iskorenjivanja (Phillips i sar., 2003). U mediteranskim zemljama divlja svinja predstavlja važan rezervoar infekcije (Gortazar i sar., 2011), dok veći broj autora (Garnett i sar., 2005;Griffin i sar., 2005;Sheridan 2011) ukazuje na ulogu jazavca u održavanju infekcije i širenju na goveda u Velikoj Britaniji i Irskoj. U ovim državama u cilju sprečavanja širenja infekcije i pojave novih žarišta, pokušava se sa masovnim uništavanjem jazavaca u ugroženim područjima, iako pojedina naučna istraživanja ukazuju na neefikasnost ovakvih programa (Gallagher 2005; More i sar.,2007), ili se radi na uvođenju oralne vakcinacije populacije jazavaca protiv tuberkuloze (Sheridan

2011). Velika pažnja istraživača uključenih u suzbijanje tuberkuloze goveda širom sveta, poklanja se razvoju vakcina za divlje životinje. Ove vakcine morale bi da značajno smanje izlučivanje i spreče širenje infekcije, među jedinkama ciljne vrste rezervoara (Fitzgerald i Kaneene 2012).

U Austriji, Prodinger i sar. (2002), su upotrebom molekularnih metoda genotipizacije ustanovili da je uzročnik tuberkuloze kod pet ispitivanih jelena u periodu od 1994-2002., bila *M.caprae* što je prva potvrda prisustva infekcije divljih životinja ovom vrstom u Austriji. Infekcija istim uzročnikom potvrđena je kod ljudi i goveda. Inficirani jeleni odstreljeni su u krugu od 20 km u odnosu na farmu na kojoj su se nalazila obolela goveda. U delovima Austrije duž granice sa Nemačkom i Švajcarskom, smešten je značajan broj jedinki crvenog jelena, u kojoj se tuberkuloza uzrokovana sa *M.caprae* endemski održava (Schiller i sar., 2011). Kada se infekcija jednom unese i uspostavi u populaciji divljih životinja, bez obzira koji će se metod kontrole odabrati, treba očekivati da će se infekcija održavati u dužem vremenskom periodu. U svakom slučaju tuberkuloza goveda ostaje značajno oboljenje kako goveda, tako i divljači i eventualna kontrola i iskorenjivanje infekcije ostaje projekat za decenije koje dolaze (Fitzgerald i Kaneene 2012).

2.4. PATOGENEZA BOLESTI I PATOMORFOLOŠKE PROMENE

2.4.1. Patogeneza

Patogeneza i imunologija tuberkuloze goveda nikada nije proučavana sa istim intenzitetom kao tuberkuloza ljudi. Najveći deo interesovanja za imunološki odgovor goveda na infekciju bakterijama iz MTB-kompleksa, odnosio se pre svega na praktični aspekt, odnosno na vrednovanje dijagnostičke upotrebljivosti imunološke reakcije (Neill i sar.,2001). Patogeneza i patologija humane tuberkuloze kao i pojedinih vrsta laboratorijskih životinja koje se koriste kao modeli, mnogo su bolje razjašnjeni od patogeneze i toka bolesti kod domaćih životinja. Zato je često neophodna, ekstrapolacija rezultata istraživanja sprovedenih na genetski modifikovanim miševima, kojima nedostaju neke ćelijske linije i specifični citokini, ili rezultata dobijenih proučavanjem oboljenja kod ljudi (Cassidy, 2006). Klinička slika i patomorfološke promene mogu se upadljivo razlikovati među pojedinim inficiranim jedinkama. Kao i kod ljudi, tuberkulozni proces kod goveda predstavlja kompleksnu interakciju između uzročnika, imunoloških mehanizama i genetske predispozicije domaćina i bio-ekoloških uslova spoljašnje sredine. Kompleksna građa mikobakterija, koja je povezana sa njihovom virulencijom, prvenstveno se vezuje za svojstva ćelijskog zida, u kome ključnu ulogu imaju sulfolipidi, mikoazidi i lipoarabinomanan, koji pospešuju intracelularni parazitizam i inhibiraju aktivaciju makrofaga (Pollock i Neill 2002). Postoji veliki broj puteva širenja tuberkuloze u zaptima goveda. Pre svega, to je horizontalni put prenošenja, inhalacijom i ingestijom *M.bovis* direktno sa inficiranih životinja ili indirektno preko kontaminiranih pašnjaka, pojila i inficirane opreme. Moguća je i vertikalna transmisija, ali se kongenitalne i alimentarne infekcije putem ingestije kontaminiranog mleka retko sreću u državama gde se sprovodi program eradikacije. Opšte je prihvaćen koncept da do infekcije sa *M.bovis* dolazi nakon udisanja infektivnog aerosola, moguće čak i jedne jedine CFU (Pollock i Neill 2002). Dominantna pojava tuberkuloznih lezija u respiratornom traktu goveda inficiranih prirodnim putem, navela je prve istraživače na zaključak da se infekcija prenosi putem udisanja kontaminiranog aerosola (Francis 1947). Utemeljenost ovakvih zaključaka bila je potvrđena kasnije, eksperimentalnim radom većeg broja autora (Collins i Grange, 1983, Rodger i sar., 2007), pri čemu je minimalna infektivna doza bila 1000 puta manja

za respiratorni u odnosu na alimentarni put. Rezultati istraživanja i drugih timova naučnika (Neill i sar.,1992; Cassidy i sar.,1998; Liebana i sar., 2008), potvrđuju da je respiratorni trakt najvažniji primarni lokus infekcije, jer i direktna inokulacija uzročnika kao i kontaktna infekcija dovode do pojave lezija koje su u najvećoj meri ograničene na respiratorne organe. Kod prirodno inficiranih goveda, tuberkulozne lezije najčešće su lokalizovane u dorzo-kaudalnim delovima pluća, uglavnom u blizini pleure (Francis 1947; Dungworth i sar.,1993). Međutim Rodgers i sar., (2007) kod eksperimentalno inficirane teladi, ustanovili su ravnomernu distribuciju tuberkuloznih lezija u svim plućnim lobusima i pripadajućim limfnim čvorovima. Ipak, autori zaključuju da se u prirodnim uslovima infekcije, pri patomorfološkom pregledu ovako ravnomerna distribucija tuberkuloznih lezija retko sreće. Infektivne čestice aerosola dospevaju do alveola, gde bacili bivaju fagocitovani od strane makrofaga, kada započinje niz povezanih interakcija različitih populacija ćelija imunološkog sistema, kako urođenog tako i stečenog imuniteta unutar zahvaćenog tkiva ili pripadajućeg limfnog čvora. Novija istraživanja pokazuju da do infekcije kod goveda može doći i preko tonzila, što nameće zaključak da tačan put infekcije nije u potpunosti razjašnjen. Liebana i sar., (2008) takođe navode da su nakon patomorfološkog pregleda 400 goveda iz 242 inficirana zapata, tuberkulozne promene prvenstveno bile prisutne u organima grudne duplje, što potvrđuje da je aerogeni put dominantan način širenja infekcije. Međutim, relativno čest nalaz promena na mezenterijalnim limfnim čvorovima, kao i limfnim čvorovima glave upućuje i na mogućnost oralne infekcije u prirodnim uslovima. Rizik od širenja infekcije u zapatu goveda prvenstveno zavisi od intenziteta rasejavanja uzročnika od strane inficiranih grla. Iako se bacili tuberkuloze mogu izlučivati putem urina, mleka i fecesa, smatra se da je ovakav put širenja od malog značaja u razvijenim zemljama, gde dominira širenje infekcije aerosolom. Prisustvo bakterija u fecesu, najverovatnije je posledica iskašljavanja i gutanja sputuma sa mikobakterijama poreklom iz respiratornog trakta (Neill i sar., 2001). Prilikom eksperimentalne infekcije intranazalna inokulacija visokim dozama uzročnika, za posledicu ima brz razvoj infekcije sa izraženim patološkim lezijama, kod gotovo svih ovako zaraženih životinja. Sa smanjivanjem doze inokulata, smanjuje se i procenat obolelih životinja, kao i intenzitet patoloških promena (Cassidy 1998). Infektivna doza ima uticaj i na razvoj imunološke reakcije, tako što su više doze povezane sa stimulacijom ćelijski

posredovanog imuniteta, koji se razvija u toku nekoliko nedelja, ali i brzom pojavom cirkulišućih antitela. Izlaganje malim dozama uzročnika dovodi do postepenijeg razvoja ćelijski posredovanog imunološkog odgovora, dok je humoralni imunitet odsutan ili jedva merljiv (Pollock i Neill 2002). Ipak, rezultati novijih istraživanja, pokazuju da je pri ekperimentalnoj infekciji jednom jedinom CFU, moguće izazvati infekciju koja potpuno reflektuje patološki proces pod prirodnim uslovima. Razvoj granulomatoznih lezija je identičan, kao u slučaju infekcije sa znatno višim eksperimentalnim dozama (1000 CFU) tokom istog vremenskog perioda. Kod goveda inficiranih jednom infektivnom česticom, razvoj granulomatoznih promena, nekroze i kazeizacije na plućima i limfnim čvorovima je potpun, a infektivna doza nije imala nikakav uticaj ni na stimulaciju sinteze γ -IFN. Stoga, Johnson i sar., (2007) zaključuju da infekcija goveda malim dozama *M.bovis* uzrokuje patološke promene koje se ne razlikuju od onih nastalih pri ekperimentalnoj inokulaciji visokih doza patogena. Iako virulencija i količina infektivnog agensa igraju značajnu ulogu u progresiji infekcije i razmerama patološkog procesa i drugi faktori mogu imati uticaja na tok infekcije. Tako Doherty i sar., (1996) navode da je kod goveda izloženih deficitarnoj ishrani ustanovljen znatno manji broj određenih subpopulacija T-limfocita, što može ukazivati na oslabljenu otpornost pothranjenih životinja. Slična zapažanja iznose i Griffin i Dolan (1995), koji su ustanovili povećan broj novih slučajeva tuberkuloze u zapažanjima goveda na oskudnoj ispaši, bez mineralno-vitaminskih dodataka. Sa druge strane, Costello i sar., (1998) nisu utvrdili vezu između deficitarne ishrane i učestalosti rasejavanja uzročnika i infekcije goveda sa *M.bovis*. Istraživanja većeg broja autora pokazala su da se izlučivanje bakterija posle ekperimentalne infekcije, u početku dešava kontinuirano, da bi u kasnijem toku infekcije postalo intermitentno, pri čemu je za uspostavljanje infekcije potrebna mala količina vijabilnih bakterija, 5×10^2 CFU kada se bakterije u ekperimentalnim uslovima unesu intratrahealno (Neill i sar.,1988). Niske doze *M.bovis* mogu inicirati infekciju, ukoliko su unete na pravi način, pri čemu je oboljenje obično ograničeno na respiratorni trakt. Iako inficirana goveda mogu rasejavati uzročnike *M.bovis* i tako predstavljati izvor zaraze za druga goveda, u većem broju istraživanja ustanovljen je nizak nivo širenja infekcije. Pojava infekcije u zapažanjima goveda u Velikoj Britaniji u 34% slučajeva ograničena je na pojedinačna grla, što ukazuje da ona ne predstavljaju veliki rizik za širenje infekcije na ostale jedinke u bliskom kontaktu. Neki

aspekti patogeneze tuberkuloze goveda i dalje ostaju nedovoljno razjašnjeni, uključujući i glavni put prenošenja, infektivnu dozu i dužinu inkubacionog perioda (Liebana i sar.,2008). Ishod izlaganja goveda virulentnom *M.bovis* može biti višestruk; neke jedinke ostaju neinficirane bilo usled urođenih ili stečenih imunoloških mehanizama i najčešće bivaju nereaktivne prilikom tuberkulinskog testiranja. Međutim, neke od ovih životinja uprkos uspešnoj rezistenciji na infekciju, prolaze proces senzibilizacije i reaguju na tuberkulin usled jakog T-ćelijski indukovano imunološkog odgovora. Kod drugih goveda nakon izlaganja patogenim mikobakterijama dolazi do uspostavljanja infekcije i progresije oboljenja, i ovakva grla najčešće reaguju pozitivno na tuberkulinizaciji. Ipak, neka od ovih grla kasnije mogu postati anergična i nereaktivna na tuberkulin. Na kraju, u određenom broju slučajeva pod dejstvom imunoloških mehanizama, infekcija ostaje ograničena i opstaje u latentnom stanju bez progresije. Najveći broj goveda izloženih patogenoj *M.bovis* ima sposobnost da spreči infekciju ili da je u velikoj meri ograniči, verovatno u stadijumu latencije. Ovo ima veliki značaj u sprovođenju programa kontrole i eradikacije bolesti, i u određenoj meri može objasniti izostanak vidljivih patomorfoloških promena kod test pozitivnih goveda, kao i neuspešnu izolaciju uzročnika. Sa druge strane, u slučaju tuberkulin negativnih grla sa latentnom infekcijom, nakon dužeg perioda može doći do reaktivacije infekcije i diseminacije uzročnika, čime je možda moguće objasniti iznenadnu pojavu oboljenja u nekim zaptima bez jasne epizootiološke povezanosti odnosno utvrđenog puta unošenja infekcije (Pollock i Neill 2002). Tipično mali broj pozitivnih reaktora u zaptima goveda, može biti posledica izlaganja subinfektivnim dozama uzročnika i uspešnoj eliminaciji infekcije. Cassidy (2008), razmatrajući rezultate istraživanja Liebana i sar., (2008) koji su ustanovili da kod značajnog broja tuberkulin pozitivnih reaktora (55,5%), nakon klanja nije moguće ustanoviti patomorfološke promene niti izolovati *M.bovis*, naglašava mogućnost da se zapravo radi o životinjama koje su uspešno eliminisale infekciju, ali ostale rezidualno senzibilisane. Kada govedo dođe u kontakt sa *M.bovis* mnogo faktora utiče na dalji razvoj infekcije i njen ishod. Od vitalne je važnosti razumevanje ovih imunoloških mehanizama, jer neke jedinke iako inficirane visokim dozama infektivnog uzročnika, ne podlegnu bolesti, i uspešno ograniče patološki proces na mali broj lezija u respiratornom traktu (Liebana i sar., 2008). Uloga makrofaga u patogenezi bolesti je donekle paradoksalna, s jedne strane oni su glavna meta

intracelularnog parazitizma mikobakterija i njihovog održavanja pri latentnoj infekciji, a opet predstavljaju ključne ćelije u kontroli i eliminaciji mikobakterija. Iako makrofagi, unutar fagozoma koji se obrazuju nakon ingestije mikobakterija, omogućuju preživljavanje i replikaciju bacila, sa druge strane predstavljaju i ključni faktor za razvoj zaštitnog imuniteta (Wedlock i sar., 2002). Očigledno je da ova inicijalna interakcija između mikobakterija i makrofaga predstavlja najznačajniji događaj koji u velikoj mjeri određuje dalji tok i sam ishod infekcije. I druge ćelije imunološkog sistema su uključene u inicijalnu reakciju na infekciju mikobakterijama: NK-ćelije sintetišu gama interferon, a Cassidy i sar., (2006) ustanovili su prisustvo velikog broja neutrofila i njihovu pojačanu aktivnost, koja je naročito bila izražena u inicijalnoj fazi nastanka tuberkuloznih lezija i formiranja granuloma, kod eksperimentalno inficiranih zamoraca, miševa, teladi i pacova. Primarna uloga T-ćelija je lučenje citokina, kao što su γ -IFN, TNF i drugi, koji imaju veliki broj uloga, od kojih je jedna od najznačajnijih aktivacija makrofaga. Antigeni mikobakterija veoma brzo bivaju obrađeni i prezentovani od strane glavnog kompleksa histokompatibilnosti makrofaga (MHC), što dovodi do aktivacije mikobakterija-specifičnih CD4⁺T limfocita. Istraživanja na miševima pokazala su da je za razvoj protektivnog imuniteta protiv mikobakterija podjednako važna uloga CD4⁺ i CD8⁺ T limfocita. Subpopulacija tzv. „neuobičajenih“ T ćelija, kao što su $\gamma\delta$ T ćelije, CD1 i $\alpha\beta$ T ćelije nije dovoljno razjašnjena i njihova uloga verovatno varira kod različitih životinjskih vrsta (Waters i sar.,2014). Kod preživara je ustanovljena viša koncentracija cirkulišućih $\gamma\delta$ T ćelija, što može ukazivati na njihovu značajnu ulogu u zaštiti od tuberkuloze. Kod goveda se $\gamma\delta$ T ćelije, pojavljuju u velikom broju u ranom stadijumu infekcije (Cassidy i sar., 2001), alveolarni makrofagi oslobađaju mikobakterijalne glikolipide, ne-proteinske antigene koji aktiviraju pomenutu lozu T ćelija. Ispitivanja periferne krvi otkrivaju složeni sled interakcija u kojima učestvuju $\gamma\delta$ T ćelije, CD4⁺ i CD8⁺ T ćelije kod infekcije vrstom *M.bovis* (Pollock i sar., 1996), ukazujući da veliki broj različitih subpopulacija T ćelija ima ulogu u razvoju imunološke reakcije prema uzročniku tuberkuloze, ali da njihov značaj u kontroli infekcije može biti različit kod pojedinih životinjskih vrsta. Najznačajnija komponenta imunološkog odgovora na infekciju MTB-kompleks bakterijama je produkcija γ -IFN od strane T-helper i CD4⁺ T ćelija. Stečena imunodeficijencija koja pogađa CD4⁺ T-ćelije i IL-12/IFN- /STAT1 signalne puteve kod HIV pozitivnih pacijenata rezultira mnogo

težim kliničkim tokom bolesti (Cooper i Torrado, 2012). Generalno, uloga T-ćelija ide u dva pravca; mogu da stimulišu mikrobicidnu aktivnost makrofaga ili da po potrebi liziraju inficirane makrofage. Građa samog granuloma sprečava širenje mikobakterija, tako što infektivno jezgro okružuju višestruki slojevi neinficiranih makrofaga, džinovskih ćelija i fibroznog tkiva raspoređenih u obliku koncentričnih krugova (Saunders i Cooper, 2000). Unutar granuloma odvijaju se kompleksne i dinamične interakcije makrofaga, T-helper ćelija, sinteza različitih citokina kao i aktivnost samih mikobakterija, što sve utiče na konačan izgled i građu granuloma. Jedan od ishoda ovih interakcija može biti i kazeozna nekroza, sa mineralizacijom tuberkuloznog žarišta, praćena regresijom (Cassidy, 2006). Sa druge strane, aktivirane $\gamma\delta$ -ćelije i NK ćelije predstavljaju dodatni nespecifični okidač za razvoj nekroze direktnim uticajem na makrofage ili izlučivanjem različitih vrsta citokina, kao što su γ -IFN i TNF (Dannenber, 1999). γ -IFN je od presudnog značaja za aktivaciju fagocitne funkcije makrofaga (Waters i sar., 2014); proizvode ga i oslobađaju Th1 $CD4^+$ ćelije. Th1 klon proliferira pod uticajem IL 12 i IL18, dok Th2 ćelije oslobađaju IL4 koji stimuliše humoralni imunološki odgovor. Značaj Th1 γ -IFN odgovora na razvoj zaštitnog imuniteta kod goveda, pokazao se prilikom ispitivanja vakcina, kada su vakcine koje snažno stimulišu sintezu velike količine γ -IFN imale protektivno dejstvo, dok one koje stimulišu sintezu antitela nisu (Wedlock i sar., 2000). U procesu nastanka nekroze, zapaženo je nakupljanje $\gamma\delta$ -ćelija i T-limfocita u ranoj fazi formiranja mikobakterijskih lezija kod teladi i miševa (Cassidy i sar., 2001), a dokazana je i njihova sposobnost da u *in vitro* uslovima liziraju makrofage inficirane mikobakterijama (Dieli i sar., 2000). $CD8^+$ T ćelije goveda inficiranih vrstom *M.bovis*, kao odgovor na mikobakterijske antigene, oslobađaju γ -IFN, ali takođe i direktno kontrolišu replikaciju mikobakterija putem granulizina i liziranja inficiranih makrofaga, omogućujući da oslobođene mikobakterije preuzmu mnogo efikasnije dendritične ćelije (Liebana i sar., 2000). Aktivirani makrofagi imaju sposobnost da snižavanjem pH u fagozomima, izlože mikobakterije letalnom dejstvu nascentnog kiseonika i azotnih produkata (Wedlock i sar., 2002). Autofagija je najznačajniji intracelularni mehanizam uništavanja fagocitovanih mikobakterija od strane ćelija monocitno-makrofagne loze, i regulisan je velikim brojem različitih regulatornih molekula kao što su PI3 kinaza, CaMKII i kalcijumovim jonima. Postoje dokazi da virulentne mikobakterije mogu inhibirati

proces autofagije u inficiranoj ćeliji, te na taj način preživeti i uspostaviti latentnu infekciju pri čemu mikobakterije opstaju unutar fagozoma u različitim stupnjema razvoja i maturacije (Chandra i sar., 2011). Sa druge strane, kod nekih životinjskih vrsta, kod kojih su T-ćelije raspoređene kružno oko centralnog jezgra u kome se nalaze makrofagi, nekroza je znatno izraženija. U razvoju nekroze, kao i kasnijoj regresiji ili širenju granuloma, čini se da presudnu ulogu ima određena kombinacija, odnosno „profil“ izlučenih citokina. Naročiti značaj ima TNF- α , koji unutar nastalih lezija može imati dvojak efekat. S jedne strane, TNF- α ima centralnu ulogu u strukturnoj organizaciji granuloma delujući na endotelijalne ćelije i lokalnu mrežu hemokina, dok sa druge strane, prevelika količina oslobođenog TNF- α , ili prisustvo izmenjenih citokina kao što je IL 4, unutar lezija može pokrenuti masivnu ćelijsku nekrozu (Waters i sar., 2014). Kontinuirana proizvodnja i oslobađanje TNF- α dovodi do neprestane aktivacije makrofaga i njihovog nagomilavanja u granulomu, što rezultira konsolidacijom plućnog tkiva i smanjenjem njegove funkcije. Tako imunološki odgovor na infekciju mikobakterijama može poprimiti patološki ili zaštitni karakter (Wedlock i sar. 2002). Turner i sar., (2003) prilikom eksperimentalne infekcije zamoraca, ustanovili su značaj prirodno urođenog imuniteta u razvoju nekroze, pri čemu veliku ulogu u nastanku primarnih lezija imaju brza aktivacija i masivan prodor makrofaga i granulocita, a koji se javljaju i pre odgovora stečenog imuniteta. Razmatrajući da li nekroza započinje primarno kao pasivan ili aktivan događaj, Orme (1998), iznosi mišljenje da je nastanak nekroze pre rezultat neuspeha u aktivaciji makrofaga, nego posledica stimulacije i razaranja makrofaga od strane aktiviranih T-limfocita (Dannenberg i Rook 1994). U prilog navedenom, Orme (1998) ističe činjenicu da je pojava nekroze minimalna u tuberkuloznim lezijama u kojima su T-limfociti i makrofagi u bliskom kontaktu, što je slučaj u granulomima miševa, gde zrakasti infiltrati T-ćelija prodiru između centralno postavljenih makrofaga i lučenjem γ -IFN i drugih citokina, aktiviraju makrofage i sprečavaju njihovu nekrozu. Ostaje da se rasvetli zašto u nekim lezijama dominira Th-2 ćelijski „profil“ citokina koji uslovljava povećanu osetljivost na TNF- α , mada se ova pojava možda može povezati sa velikom količinom prisutnih antigena (Welsh i sar., 2005) ili gubitkom Th-1 ćelija i njihovih citokina tokom procesa selektivne apoptoze (Seah i Rook, 2001). Apoptoza T-ćelija i makrofaga predstavlja važan događaj koji se javlja unutar tuberkuloznih granuloma

čovjeka (Fayyazi i sar., 2000) i laboratorijskih miševa (Mohan i sar., 2001). Keane i sar.,(1997) ustanovili su da je oko 70% ćelija lociranih na periferiji aktivnih tuberkuloznih lezija kod inficiranih ljudi bilo u procesu apoptoze, dok Fayyazi i sar.,(2000) ističu da proces apoptoze T-ćelija i makrofaga u velikoj meri doprinosi ograničavanju širenja lezija. Ukoliko imunološki sistem uspe da uspostavi efikasnu kontrolu nad infekcijom, 90-95% antigen-specifičnih T-ćelija podleže apoptozi, ostavljajući mali broj ćelija pamćenja (Waters i sar.2014). U zavisnosti koja ćelijska loza dominantno podleže procesu apoptoze, ovaj proces može imati povoljan ili nepovoljan uticaj na mogućnost granuloma da kontroliše proliferaciju mikobakterija. Dok je apoptoza inficiranih makrofaga, koji predstavljaju svojevrsno „sklonište“ za mikobakterije i njihovo uklanjanje deo odbrambene strategije makroorganizma, apoptoza pojedinih linija T-ćelija unutar tuberkuloznih lezija slabi imunološki odgovor domaćina i doprinosi reaktivaciji oboljenja (Keane i sar., 2000). Eksperimentalni rezultati na ćelijskim modelima u *in vitro* uslovima pokazali su da je apoptoza efikasniji proces od nekroze u eliminaciji intracelularnih bakterija (Fratuzzi i sar., 1997), jer se apoptozom istovremeno uništava hromozomski materijal kako makrofaga tako i prisutnih mikobakterija. Sposobnost različitih sojeva *M. tuberculosis* da u *in vitro* uslovima blokiraju proces apoptoze makrofaga u pozitivnoj je korelaciji sa njihovom virulencijom (Keane i sar., 2000). Apoptoza ćelija unutar lezija, slično nekrozi pod direktnim je uticajem „koktela“ citokina, a pre svega TNF- α (Keane i sar., 1997). Iako uloga apoptoze kod prirodno inficiranih goveda nije razjašnjena, Gutierrez-Pabello i sar., (2002) u *in vitro* uslovima ustanovili su apoptozu makrofaga goveda inficiranih vrstom *M. bovis*. Migracija i priliv makrofaga u granulome diktirani su količinom i vrstom citokina prisutnih u lezijama i odražavaju trenutno stanje u odnosu domaćina i mikroorganizma. Smatra se da pojava likvefakcije unutar tuberkuloznih lezija ljudi i stvaranje kaverni, značajno doprinosi širenju tuberkuloze, jer povećava infektivnost i omogućava nastanak višestruko rezistentnih sojeva (Kaplan i sar., 2003). Iako nije sasvim poznato šta je okidač za pokretanje mehanizma likvefakcije, neki istraživači (Van Crevel i sar.,2000) smatraju da pretežna zastupljenost citokina koje izlučuju Th-2 ćelije, kao što je IL-4 a koji aktiviraju metaloproteinaze, dovodi do razmekšavanja čvrste kazeozne mase. Krajnji rezultat ovog procesa je nastanak šupljina čije površine postaju permeabilne za masivnu proliferaciju i prodor mikobakterija, te njihovu

mutagenezu, što naročito važi za kaverne koje se direktno naslanjaju na vazdušne puteve (Kaplan i sar. 2003). Čini se da odsustvo CD4+ i CD8 ćelija i veći parcijalni pritisak kiseonika u ovim lokusima pospešuju eksponencijalno umnožavanje mikobakterija i njihovo izlučivanje u spoljašnju sredinu preko respiratornih puteva. Detaljna patohistološka ispitivanja plućnih lezija ljudi obolelih od tuberkuloze (Dannenberg i sar., 1999), ukazala su na znatnu heterogenost građe granuloma i prisutnih citokina, među različitim individuama, što je verovatno povezano sa starošću procesa i pojavom aktivacije. Ova istraživanja ukazuju da je tuberkuloza ustvari posledica neprekidnog procesa infekcije, posledičnog stvaranja granuloma, nekroze, likvefakcije, prskanja kaverni i rasejavanja mikobakterija (Fenhalls i sar., 2002), pri čemu se svaka lezija ponaša kao samostalna mikrocelina, koja podleže procesu progresije ili regresije nezavisno od procesa koji se odvijaju u susednim lezijama. Dannenberg i sar. (1999), zato tuberkulozu opisuju kao „lokalno“ oboljenje, da bi naglasili heterogenost lezija koja je verovatno uslovljena količinom prisutnih mikobakterija, kao i lokalnom aktivnošću makrofaga i senzibilisanih T-ćelija. U mnogim aspektima imunološki odgovor goveda identičan je onom kod ljudi, što ne iznenađuje uzimajući u obzir genetsku podudarnost uzročnika (99,95% na nivou nukleotida), i dugotrajnu zajedničku evoluciju domaćin/patogen interakcijskih odnosa (Waters i sar., 2014). Još jedna od funkcija T-ćelija u zaštiti organizma od razvoja tuberkuloznog procesa je i njihova sposobnost da liziraju makrofage inficirane mikobakterijama.

Poznato je da pod određenim uslovima u uznapredovalim i generalizovanim slučajevima tuberkuloze, može doći do pojave anergije. Kod ovakvih jedinki izostaje merljiv ćelijski posredovan imunološki odgovor, odnosno životinje ne reaguju na tuberkulinski test, iako mogu posedovati visok titar cirkulišućih antitela (Neill i sar., 1994). Smatra se da do sinteze antitela dolazi u uznapredovalim stadijumima infekcije, a njihova uloga nije od velikog značaja u razvoju protektivnog imuniteta protiv intracelularnih bakterija (Pollock i Neill 2002). Kada je invazija mikobakterija uspešno zaustavljena i ograničena imunološkim mehanizmima domaćina, infekcija može preći u stanje „latencije“ i perzistirati godinama, bez progresije. Za razliku od čoveka uloga latencije se retko razmatra u kontekstu tuberkuloze goveda, ali može imati ogroman epizootiološki značaj u dinamici održavanja i širenja infekcije usled reaktivacije

(Pollock i Neill, 2002). Procene su da je gotovo jedna trećina svetske populacije inficirana u dormantnoj formi nekom od mikobakterija iz MTB-kompleksa (Brudey i sar.,2006), pri čemu ovi ljudi nemaju kliničke znake oboljenja niti šire infekciju. Na infekciju u ovim slučajevima najčešće ukazuju pozitivna tuberkulinska reakcija i nalaz starih lezija na plućima. U delovima sveta gde je niska prevalencija tuberkuloze, ovakvi pacijenti imaju važnu ulogu u širenju tuberkuloze, kada dođe do reaktivacije oboljenja u poznoj starosti ili usled imunosupresije (Cassidy, 2006). Do koje mere se ovaj model latencije i reaktivacije može primeniti na goveda i druge vrste životinja, nije sasvim jasno, ali da se sličan proces odvija u populaciji goveda navode neki autori (Pollock i Neil 2002). Novija istraživanja u kojima je registrovano prisustvo goveda sa pozitivnom tuberkulinskom reakcijom i γ -IFN testom, a bez vidljivih patomorfoloških promena, ili su iz organa izolovane mikobakterije u odsustvu lezija dodatno potvrđuju postojanje latencije kod goveda. Evidentno je da prisustvo ovakvih jedinki analogno kao u slučaju latentne infekcije ljudi, u velikoj meri otežava eradikaciju TB putem reaktivacije i diseminovanja uzročnika (Cassidy 2008).

2.4.2. Patomorfološke promene

Pre uvođenja programa suzbijanja i eradikacije tuberkuloze, kod goveda je bila česta pojava diseminovane ili pulmonalne tuberkuloze pri čemu su lezije zahvatale veliki deo pluća. Danas, u većini zemalja u kojima se sprovodi obavezna tuberkulinizacija goveda uz veterinarsko-sanitarni pregled mesa na liniji klanja, promene se mnogo češće sreću na limfnim čvorovima respiratornog trakta, nego u samom plućnom parenhimu (Corner 1994). U prošlosti, poteškoće u pronalaženju sitnih lezija u plućnom tkivu u odnosu na bolju vizuelizaciju istih u bronhijalnim, medijastinalnim i cervikalnim limfnim čvorovima, navele su neke istraživače da pretpostave kako životinje sa promenama samo na limfnim čvorovima, imaju „zatvorenu“ tuberkulozu i nemaju epizootiološkog značaja u širenju infekcije. Međutim, McIlroy i sar., (1986) patohistološkim ispitivanjem velikog broja isečaka pluća test pozitivnih goveda bez makroskopski uočljivih promena, kod 70% ispitivanih životinja ustanovili su lezije karakteristične za tuberkulozu. Pri ovome treba uzeti u obzir da se infekcija iz limfnih čvorova u određenom momentu, može proširiti na plućno tkivo, migracijom mikobakterija putem eferentnih limfnih sudova, *ductus thoracicus*-a i preko

desnog srca prodrati u plućnu cirkulaciju. Stoga, sva goveda sa tuberkuloznim lezijama na limfnim čvorovima respiratornog trakta treba smatrati potencijalnim izvorom zaraze za druge životinje i čoveka (Dannenberg i sar., 1999). Kod goveda tuberkuloza je najčešće lokalizovana na plućima, a makroskopske lezije karakterišu se otvrdnućem plućnog tkiva, koje je u tim delovima potpuno bezvazdušno i velikim delom izgubljene strukture, pretvoreno u sirastu masu-kazeum (Lalošević i sar., 2011). Tuberkulozne lezije često se mogu naći u limfnim čvorovima gornjih partija respiratornog trakta prirodno inficiranih goveda. U više odvojenih studija, kod 26-32% inficiranih jedinki lezije su ustanovljene u retrofaringealnim, submandibularnim i parotidnim limfnim čvorovima, što ukazuje da kod znatnog broja jedinki postoji mogućnost izlučivanja uzročnika preko respiratornog trakta (Corner 1994; Whipple i sar., 1996). Liebana i sar., (2008) ustanovili su pojavu mikroskopskih tuberkuloznih lezija na tonzilama inficiranih goveda što ukazuje na njihovu moguću ulogu u patogenezi bolesti. Kod goveda gornji delovi respiratornog trakta imaju najznačajniju ulogu u uspostavljanju infekcije, pa tako nalaz na liniji klanja kod prirodno inficiranih grla pokazuje da značajan broj životinja ima lezije lokalizovane samo na limfnim čvorovima glave (Neill i sar., 1994). Slične promene ustanovljene su i kod divljeg i farmski uzgajanog jelena, dok su kod jazavca lezije često povezane sa infekcijom preko ujednih rana. Tuberkulozne lezije najčešće se karakterišu prisustvom čvrstih čvorića belo-žućkaste boje, koji su malog prečnika, često manjeg od 1 cm (Neill i sar., 2001). Klasična tuberkulozna lezija praćena je formiranjem granuloma, čiji nastanak je odgovor na različite faktore virulencije i hroničnu antigenu stimulaciju usled perzistentne infekcije. Granulome kod goveda karakteriše prisustvo kazeozne nekrotične mase u jezgru, većinom mineralizovane, okružene infiltratom epiteloidnih makrofaga, tipa džinovskih multijedarnih Langhans ćelija i limfocita. Ukoliko proces ima tendenciju sanacije pojavljuje se vezivno tkivo u vidu zadebljale fibrozne kapsule. Intenzitet fibrozne inkapsulacije varira u zavisnosti od stadijuma razvoja infekcije i hroniciteta, tako da starije lezije sadrže više fibroziranih žarišta. Za razliku od ljudi, kod goveda proces kavitacije nije uobičajen, i u suprotnosti sa likveficiranim lezijama koje sadrže veliki broj acidorezistentnih bacila, kazeozne lezije su paucibacilarne, odnosno odlikuju se prisustvom male količine vijabilnih bakterija (Waters i sar., 2014). Hronična zapaljenska reakcija u kojoj dominiraju makrofagi, kao odgovor na infekciju mikobakterijama dovodi do formiranja

tuberkuloznih granuloma ili tuberkula. Na ovaj proces veliki uticaj ima intracelularna lokalizacija uzročnika unutar ćelija monocitne loze, kao i velika otpornost na fagocitozu usled prisustva voštanih materija u ćelijskom zidu. Sa mesta prodora mikobakterije invadiraju pripadajuće limfne čvorove, često uzrokujući pojavu granuloma u njima. Uloga granuloma je da ograniči ili spreči rast i razmnožavanje mikobakterija kroz interakciju inficiranih makrofaga i T-ćelija. Tuberkulozni granulomi predstavljaju dinamične strukture, sa brзом izmenom konstitutivnih ćelija u poređenju sa granulomima koji se formiraju kao odgovor na inertne partikule (Fenhalls i sar.,2000). Kombinacija inicijalnog mesta prodora mikobakterija i reakcije regionalnog limfnog čvora čine primarni kompleks, često označen kao Gonov-kompleks. Diseminacija patogenog agensa iz primarnog kompleksa odigrava se hematogeno i limfogeno (Waters i sar., 2014). Kazeozna nekroza je proces karakterističan za pojavu tuberkuloznih granuloma kod većine životinjskih vrsta, i ima veliki uticaj na dalje širenje infekcije. Ukoliko bolest napreduje, granulomi u plućima mogu da konfluiraju stvarajući velika područja kazeozne nekroze (Fenhalls i sar., 2002). Razvoj nekroze unutar tuberkuloznih lezija dugo je smatran posledicom aktivnog delovanja T-ćelija, sposobnih kako da aktiviraju makrofage tako i da liziraju inficirane (Dannenberg i sar.,1999). Novija istraživanja ukazuju i na značaj urođenog imuniteta (Turner i sar. 2003), zatim neuspeha u aktivaciji makrofaga (Orme 1998) i određene kombinacije citokina u nastanku nekroze. Postojanje urođenog imuniteta, koji dejstvuje putem mehanizama nezavisnih od elemenata stečenog imuniteta u procesu uništavanja i eliminacije mikobakterija, može objasniti zašto neke jedinke u populaciji gde postoji jednak rizik od izloženosti, ostaju neinficirane i daju negativnu reakciju prilikom tuberkulinizacije (Kisich i sar., 2002).

2.5. KONTROLA I ERADIKACIJA TUBERKULOZE GOVEDA

Tokom 30-tih godina 20 veka, usled visoke prevalencije tuberkuloze goveda i posledično velikog broja obolelih ljudi, u Velikoj Britaniji uvodi se program dobrovoljnog sertifikovanja zapata goveda na status slobodnih od tuberkuloze. Međutim, tek 1950. godine započinje se sa programom obaveznog suzbijanja tuberkuloze, koji je uključivao redovno godišnje testiranje, uklanjanje pozitivnih jedinki uz isplatu kompenzacija i kontrolu kretanja goveda (de la Rua-Domenech i sar., 2006a).

Sve razvijene države sveta imaju razrađenu nacionalnu strategiju i program mera za suzbijanje i iskorenjivanje tuberkuloze kod goveda i drugih domaćih životinja. Primarni cilj implementacije ovih mera kontrole je da se spreči širenje infekcije sa životinja na ljude, ali i veliki ekonomski gubitak u stočarskoj proizvodnji. U državama koje su veliki izvoznici goveđeg mesa, mlečnih proizvoda ili priplodnih grla, mogućnost da u slučaju pojave tuberkuloze usled trgovinskih restrikcija pretrpe velike štete, predstavlja glavni podsticaj za sistematsko suzbijanje (Milian-Suazo i sar., 2008). Većina nacionalnih strategija za kontrolu tuberkuloze zasniva se na dijagnostici infekcije kod živih goveda, redovnom godišnjem testiranju celokupnog zapata metodom intradermalne tuberkulinizacije i obaveznom uklanjanju inficiranih životinja. Identifikacija i što ranije uklanjanje inficiranih životinja čine osnovu programa eradikacije tuberkuloze goveda u mnogim državama širom sveta (Schiller i sar., 2011). Uspeh zavisi velikim delom od toga da li će inficirane životinje biti uklonjene pre nego što postanu izvor infekcije za druge životinje ili kontaminiraju životnu sredinu. Ipak uprkos dugogodišnjem striktnom sprovođenju mera obaveznog testiranja i uklanjanja pozitivnih grla u mnogim zemljama problem tuberkuloze goveda perzistira na određenom nivou, a uzroci neuspeha u eradikaciji tuberkuloze goveda su složeni i mnogostruki (Gormley i sar., 2004). Neophodno je identifikovati uzročnike tuberkuloznih promena kod goveda, da bi se što brže uvele mere kontrole bolesti i sprečilo širenje infekcije, i na taj način smanjile ekonomske štete i rizik od infekcije ljudi. U tom cilju važno je sprovoditi mere redovne godišnje tuberkulinizacije svih grla starijih od 24 meseca i svih goveda pre transporta, uz temeljan veterinarsko-sanitarni pregled na liniji klanja i obavezno uzorkovanje i kultivaciju suspektnog patološkog materijala (Pavlik i sar., 2002). Strategija redovnog testiranja praćena brzim

uklanjanjem pozitivnih jedinki, u mnogim državama Evrope, Severnoj Americi i Australiji dovela je do uspešne eradikacije ili značajnog smanjenja incidencije tuberkuloze goveda (Schiller i sar., 2011). Širom sveta najčešće primenjena dijagnostička metoda kod goveda i farmski gajenih jelena je intradermalna tuberkulinizacija, kojom se utvrđuje reakcija pozne preosetljivosti kod inficiranih jedinki. Razvojem γ -IFN testa, za dijagnostiku tuberkuloze u *in vitro* uslovima, dobijen je veoma praktičan pomoćni test, koji omogućuje da se sumnjiva grla retestiraju već 8-28 dana nakon intradermalne tuberkulinizacije (Ryan i sar., 2000). Međutim, da bi kontrola tuberkuloze goveda bila uspešna, testiranje i uklanjanje pozitivnih grla mora biti praćeno i čitavim nizom drugih mera. Od velikog značaja za sprečavanje širenja oboljenja su identifikacija i ograničavanje kretanja životinja sa inficiranih farmi. U nekim državama poput Australije u završnoj fazi iskorenjivanja kada je prevalencija još uvek bila relativno visoka (3%) primenjena je mera klanja svih životinja starijih od pet godina (Collins 2006). Kombinacija intradermalne tuberkulinizacije i pregleda trupova na liniji klanja, predstavlja najbolji način nadzora tuberkuloze goveda (DEFRA, 2005). U slučaju da infekcija u zapatu perzistira uprkos preduzetim merama, ekonomski opravdana alternativa kontinuiranom testiranju može biti depopulacija čitavog zapata. Pregled na liniji klanja i praćenje inficiranih grla do farme porekla je važna karika u lancu kontrole i od velike je pomoći u identifikaciji inficiranih zapata (Wedlock i sar. 2002). U Velikoj Britaniji 9-12% od ukupnog broja novoinficiranih grla i zapata biva otkriveno prilikom pregleda mesa na liniji klanja. Strogi EU standardi u pogledu higijene mesa, nalažu da se svi trupovi koji imaju više od jedne vidljive tuberkulozne lezije odbacuju, dok se kod trupova sa jednom promenom, ona zajedno sa okolnim tkivom odstranjuje (de la Rua-Domenech, 2006b). U zemljama u kojima postoji veliki broj rezervoara među različitim vrstama divljih životinja strategija testiranja i uklanjanja pozitivnih goveda, daje slabije rezultate. U pojedinim državama javljaju se različite vrste divljih životinja kao značajni rezervoari za održavanje *M.bovis*. U Velikoj Britaniji i Irskoj to je jazavac, u Novom Zelandu oposum, u SAD jelen. Kontrola infekcije glavnih rezervoara među divljim životinjama je neophodna mera u cilju postizanja uspešne kontrole oboljenja u stadima goveda. Različite strategije su primenjivane širom sveta da bi se ostvario ovaj cilj; u Novom Zelandu vršeno je masovno trovanje ili hvatanje oposuma u zamke, u Irskoj je ovlašćena državna služba bila zadužena za

hvatanje i premeštanje jazavaca iz regiona sa visokom prevalencijom tuberkuloze goveda, dok se u poslednje vreme prešlo na oralnu vakcinaciju jazavaca putem mamaka (Sheridan i sar., 2011). Kontrola infekcije kod divljih rezervoara imala je veliki značaj u smanjenju broja zapata goveda i farmskih jelena u kojima je prisutna tuberkuloza za 50% u Novom Zelandu, a u Irskoj je zapažen signifikantno manji broj goveda pozitivnih na tuberkulin kao i zapata koji su bili pod merama suzbijanja i kontrole zbog prisustva infekcije (Collins 2001).

Međutim, u regionima jugoistočne Engleske i Velsa, uprkos primeni tri različite strategije u kontroli brojnosti jazavaca, broj novootkrivenih tuberkuloznih zapata goveda postojano se uvećavao od 1986 god. (de la Rua-Domenech i sar., 2006a). Terapija obolelih grla ne sprovodi se nigde u svetu, međutim postoje oskudni podaci, da su životinje za koje je procenjeno da predstavljaju značajan genetski potencijal tretirane izoniazidom (Cousins 2001). Takođe, Parreiras i sar. (2004), navode da se u Brazilu u pojedinim regionima, nelegalno primenjuje terapija najčešće kao monoterapija izoniazidom. Problem predstavlja činjenica da lečene životinje ostaju tuberkulin pozitivne, a terapija ne mora biti uspešna, dok upotreba samo jednog antituberkuloznog leka može dovesti do pojave rezistencije.

Strategija kontrole tuberkuloze goveda zasnovana na redovnom testiranju i uklanjanju pozitivnih jedinki koja je suština svih programa eradikacije u visoko industrijalizovanim zemljama, teško je primenjiva u zemljama u razvoju. Razlozi su mnogostruki, u većini slučajeva radi se o nedostatku sredstava, ne postojanju veterinarsko-sanitarne infrastrukture, ali negde su u pitanju i politička nestabilnost ili socio-kulturološko neprihvatanje metoda kontrole. Stoga, manje od polovine država Afrike, Azije i Južne Amerike ima nacionalne programe kontrole tuberkuloze zasnovane na testiranju i obaveznom klanju inficiranih grla (Cosivi i sar., 1998). U takvim slučajevima prikladnija bi bila implementacija alternativne strategije, koja bi uključivala nadzor u klanicama sa praćenjem inficiranih grla do zapata iz kojih potiču, ograničavanje kretanja grla iz takvih zapata uz testiranje svih grla u njima i uklanjanje inficiranih jedinki. Širenje infekcije moglo bi biti redukovano edukacijom i informisanjem stanovništva, poboljšanjem higijensko-sanitarnih mera, obaveznom pasterizacijom mleka i vakcinacijom novorođenčadi i odraslih BCG vakcinom. Iako su podaci o prevalenciji bovine tuberkuloze u zemljama u razvoju oskudni, po svemu

sudeći velika je verovatnoća da će problem tuberkuloze u zapaćtima goveda i posledićno zoonozna tuberkuloza ljudi nastaviti da predstavlja znaćajnu pretnju javnom zdravlju (Moda i sar., 1996). Postojanje velikog broja rezervoara za odrćžavanje *M.bovis* i *M.caprae* sa kojih se infekcija ponovo širi na goveda, kao i intenzivan razvoj mećuregionalne i mećunarodne trgovine, koji pospešuju širenje infekcije, uticali su da se obnovi interesovanje za potencijalnu upotrebu vakcina u imunoprofilaksi tuberkuloze goveda (Waters i sar.,2012).Vakcinacija domaćih ųivotinja je jedna od mogućih opcija u visokorazvijenim zemljama, kao što su npr. Velika Britanija, Irska i Novi Zeland u kojima divlje ųivotinje predstavljaju znaćajan rezervoar *M.bovis*. Razvoj visoko efikasne vakcine, smatra se najboljom dugoroćnom strategijom za suzbijanje tuberkuloze goveda u Velikoj Britaniji (Krebs i sar. 1997), dok u zemljama u razvoju efikasna vakcina za domaće ili divlje ųivotinje rezervoare moće biti jedino rešenje za kontrolu tuberkuloze goveda (Wedlock i sar. 2002). Veliki broj vakcina za kontrolu tuberkuloze goveda ispitivan je kako na laboratorijskim ųivotinjama, tako i na ciljnim vrstama. ųive atenuirane vakcine indukuju snaćan ćelijski imunološki odgovor, i imaju prednost pošto je najćešće dovoljna samo jedna doza. ųive vakcine ukljućuju BCG, genetski modifikovanu BCG, ili vakcine saćinjene od avirulentnih mikobakterija iz *M.tuberculosis* kompleksa, dobijenih inaktivacijom gena nosioca virulencije (Collins, 2001). Prvobitna ispitivanja BCG vakcine na govedima u terenskim uslovima nisu dala zadovoljavajuće rezultate. Do neuspeha je došlo usled nekoliko mogućih faktora, a jedan je korišćenje visokih doza BCG (10^8 - 10^{10} CFU), što je potvrćeno prilikom kasnijih istraćivanja kada je ustanovljeno da niće doze efikasnije stimulišu protektivni ćelijski imunitet (Wedlock i sar. 2000). Takoće, vakcinacija je sprovedena u regionima sa visokom prevalencijom tuberkuloze goveda, što ostavlja mogućnost da su mnoge jedinke već bile inficirane pre imunizacije. Loša strana primene BCG vakcine je da vakcinisana goveda najćešće daju pozitivnu reakciju na tuberkulinskom testu. Inaktivisana vakcina proizvedena od *M. vaccae*, za koju postoji interesovanje u imunoprofilaksi ljudi, kod goveda ne dovodi do razvoja protektivnog imuniteta (Buddle i sar., 1999). Iako se ćine veliki naponi, da se primenom razlićitih metoda genetskog inženjeringa modifikuje BCG vakcina, dosad nije bilo većih uspeha prilikom testiranja na laboratorijskim ųivotinjama. Izuzetak je rekombinantna BCG vakcina u kojoj je prisutan 30-kDa glavni sekretorni protein *M.tuberculosis*, i indukuje snaćniji

protektivni imunitet u odnosu na klasičnu BCG vakcinu (Horwitz i sar.,2000). BCG vakcina indukuje određeni nivo zaštite protiv tuberkuloze goveda, ali je on veoma varijabilan, a sa druge strane, vakcinacija onemogućuje strategiju kontrole bolesti zasnovanu na intradermalnoj tuberkulinizaciji i uklanjanju pozitivnih grla. Međutim, iako do sada nije ustanovljen pojedinačno efikasniji način profilaktičke zaštite u odnosu na BCG, upotreba BCG vakcine u kombinaciji sa subjediničnim vakcinama, vektorskim ili DNK vakcinama pokazala je bolji nivo zaštite u odnosu na samostalnu primenu (Buddle i sar.,2001).

Ispitivanja efikasnosti BCG vakcine na divljim životinjama (oposum, jelen, lasica, jazavac), primenom različitih metoda aplikacije dala su ohrabrujuće rezultate i radi se na formulisanju strategije vakcinacije divljači u cilju kontrole infekcije. Ostaje ipak da se razreši niz tehničkih problema vezanih za proizvodnju i distribuciju vakcine u obliku mamaka (Wedlock i sar. 2002). Vakcinacija divljači primarno se vrši distribucijom mamaka sa imunoprofilaktičkim sredstvom za peroralno unošenje, mada se u pojedinim delovima Engleske primenjuje i parenteralna vakcinacija jazavaca (Sheridan 2011). Nedavna eksperimentalna ispitivanja na govedima pokazala su da subjedinične vakcine mogu pojačati imunitet izazvan prethodnom primenom BCG vakcina, tako da imunološki odgovor zasnovan na aktivaciji memorijskih T-ćelija ima protektivni efekat nakon eksperimentalne infekcije. Pokazalo se da je BCG vakcina najefikasnija kada se aplikuje teladima u neonatalnom periodu, a primenom DIVA (eng.differentiation of infected from vaccinated animals) vakcina moguće je razlikovati vakcinisane od inficiranih životinja primenom različitih *in vivo* i *in vitro* metoda (Waters i sar. 2012). Alternativni pristup u imunoprofilaksi tuberkuloze ljudi i životinja u fokus pažnje stavlja upotrebu proteinskih antigena koje sintetišu mikobakterije. U ovom tipu vakcina koristi se ultrafiltrat proteina proizvedenih od kulture mikobakterija (CFP-culture filtrate protein), bilo kao pojedinačnih ili mešavine različitih proteinskih derivata, ili pak peptida T-ćelijskih epitopa suspendovanih u odgovarajućem adjuvansu. Eksperimenti vršeni na miševima i zamorcima koji su imunizovani CFP vakcinama pokazali su visok stepen zaštite pri veštačkoj aerogenoj infekciji (Baldwin i sar., 1998). CFP vakcina proizvedena na kulturi *M.bovis* snažno je indukovala sintezu antitela kod vakcinisanih goveda, ali slabu produkciju antigen specifičnog γ -IFN. Kod eksperimentalno inficiranih goveda ova vakcina dovela je do smanjenja nastanka

tuberkuloznih lezija na plućima, iako u manjoj meri nego BCG. Međutim, kod goveda koja su vakcinisana CFP vakcinom, zapažena je veća prevalencija pojave ekstrapulmonalnih tuberkuloznih lezija u odnosu na nevakcinisana ili BCG vakcinisana goveda (Wedlock i sar. 2000). Primena CFP vakcine nije dovela do senzibilizacije životinja na tuberkulin, ali za uspešnu zaštitu verovatno je neophodna višestruka aplikacija subjedinične vakcine i adekvatan adjuvans za ciljanu životinjsku vrstu. U poslednje vreme radi se na razvoju DNK vakcine i dosad dobijeni rezultati na laboratorijskim životinjama ohrabruju (Baldwin i sar., 1998). Vakcine za ljude koje prolaze kroz klinička ispitivanja uključuju žive vakcine sa atenuiranim mikobakterijama, a razvijene su da zamene klasične BCG vakcine, i subjedinične vakcine za pojačavanje imunološkog odgovora na aplikovanu BCG. Subjedinične vakcine na virusnim nosačima Ag85A, takođe pojačavaju imunitet goveda posle BCG vakcinacije i mogu biti primenjene u budućnosti (Waters i sar. 2012). U cilju povećanja specifičnosti i osetljivosti dijagnostičkih testova za utvrđivanje infekcije kod živih goveda, identifikovan je čitav niz proteinskih i drugih mikobakterijskih antigena. ESAT 6 sekretorni antigen male molekulske težine, kojeg proizvode *M.tuberculosis* i *M.bovis*, ali ne i BCG pokazao se kao veoma koristan u dijagnostici BTB uz primenu γ -IFN testa (Schiller i sar., 2010b) i očekuje se da u velikoj meri poveća specifičnost pri retestiranju tuberkulin pozitivnih grla, a da pri tome ne utiče na bitnije smanjenje osetljivosti. Razvoj dijagnostičkih testova koji će moći da razlikuju inficirane od vakcinisanih životinja neophodan je preduslov za primenu DIVA vakcina u imunoprofilaksi tuberkuloze goveda, što bi omogućilo da se nastavi sa strategijom testiranja i uklanjanja inficiranih grla paralelno sa vakcinacijom (Wedlock i sar. 2002). Napor uloženi tokom decenija borbe sa uzročnikom tuberkuloze, upotrebom BCG vakcina i različitih hemoterapeutskih agenasa očigledno nije doneo željene rezultate. Potrebna je nova strategija, a višestrani pristup uzročniku oboljenja *M.tuberculosis* i širokom spektru njegovih interakcija sa organizmom domaćina, daje bolji uvid u biologiju mikroorganizma i stvara osnovu za razvoj novih terapijskih sredstava (Chandra i sar., 2011).

2.6. DIJAGNOSTIKA TUBERKULOZE

Najčešće primenjivane dijagnostičke metode i testovi za otkrivanje tuberkuloze goveda zasnivaju se na ćelijskom imunološkom odgovoru koji nastaje prilikom izlaganja životinje antigenima *M. bovis*. Dijagnostički testovi koji u osnovi imaju ispitivanje ćelijskog imunološkog odgovora su: intradermalna tuberkulinizacija, komparativna intradermalna tuberkulinizacija i gama interferon test. Testovi kasne preosetljivosti imaju prednost u ranoj detekciji tuberkuloze, jer se ćelijski imunološki odgovor na antigene *M. bovis* pojavljuje u ranim stadijumima infekcije u odnosu na humoralni (de la Rua-Domenech i sar., 2006a). Postavljanje pravovremene i tačne dijagnoze tuberkuloze goveda, uprkos značajnom razvoju i pojavi novih dijagnostičkih metoda i testova, još uvek predstavlja veliki izazov, usled postojećih ograničenja u pogledu njihove osetljivosti i specifičnosti, ali i složenosti imunološke reakcije makroorganizma na infekciju (Bezov i sar., 2014a).

Za kontrolu i eradikaciju tuberkuloze goveda, ali i drugih vrsta životinja od ključne je važnosti postavljanje tačne dijagnoze i brzo uklanjanje inficiranih životinja. Infekcija goveda uzročnikom tuberkuloze *M. bovis* najčešće je hroničnog toka i dugo vremena ostaje prikrivena u subkliničkoj formi (de la Rua-Domenech, 2006a). Pri tome je važno imati u vidu da inficirana goveda izlučuju uzročnika dugo pre pojave prvih kliničkih simptoma ili lezija karakterističnih za tuberkulozu. Čak i kada su prisutni klinički vidljivi simptomi, oni nisu patognomonični, pa se efikasna kontrola i suzbijanje tuberkuloze prvenstveno zasniva na otkrivanju i identifikaciji inficiranih grla u ranom stadijumu, primenom osetljivih imunodijagnostičkih testova (Collins 2006). Savremeni programi eradikacije tuberkuloze goveda, uglavnom se zasnivaju na dijagnostičkom ispitivanju celokupne populacije goveda, najčešće intradermalnom tuberkulinskom probom i obaveznom uklanjanju pozitivnih reaktora (Bezov i sar., 2014a). Iako se dijagnostika većine zaraznih i infektivnih bolesti zasniva na ispitivanju humoralnog imunološkog odgovora, kod tuberkuloze se merljiv titar antitela pojavljuje tek u stadijumu znatno uznapredovale infekcije ili pri infekciji visokim dozama uzročnika (Welsh i sar., 2005).

Infekcija uzročnikom tuberkuloze goveda prvenstveno dovodi do aktivacije ćelijski posredovanog imuniteta tokom rane i srednje faze bolesti u čemu najznačajniju ulogu

imaju Th1 limfociti. Iz tih razloga glavne dijagnostičke tehnike koje su u upotrebi širom sveta, intradermalna tuberkulinizacija i γ -IFN test zasnivaju se na detekciji ćelijski posredovanog imunološkog odgovora (Casal i sar., 2015).

Goveda razvijaju efikasan ćelijski posredovani imunološki odgovor koji omogućuje kontrolu infekcije u lokalizovanim žarištima tokom dugog perioda. S druge strane, humoralni imunitet i sinteza antitela nisu izraženi (Wedlock i sar., 2002). Smatra se da je visok nivo cirkulišućih antitela povezan sa nemogućnošću imunološkog sistema da ograniči infekciju i spreči razmnožavanje mikobakterija što neminovno vodi diseminaciji i progresiji oboljenja (Wood i Jones 2001). Zato u dijagnostici tuberkuloze na živim govedima značajniju ulogu imaju testovi zasnovani na ispitivanju ćelijskog imuniteta. Pored toga smatra se i da poseduju veću osetljivost u odnosu na do danas poznate testove kojima se utvrđuje prisustvo specifičnih antitela. Dva testa koja su zvanično odobrena u EU za dijagnostiku tuberkuloze goveda zasnivaju se na ispitivanju ćelijskog imuniteta. To su *in vivo* intradermalna tuberkulinizacija i *in vitro* gama interferon test. U zemljama u kojima se vrši kontrola i iskorenjivanje tuberkuloze goveda, rutinski nadzor sprovodi se jednom od varijanti intradermalnog tuberkulinskog testa, koji se označava još i kao „kožni test“ (Caffrey, 1994; Tweedle i Livingstone, 1994). Intradermalni tuberkulinski test predstavlja međunarodni standard u *ante mortem* dijagnostici tuberkuloze goveda, preporučen i priznat od strane OIE i Evropske komisije kao primarni test za dijagnostiku tuberkuloze goveda (Karolemeas i sar., 2012). U principu ovaj test se pokazao pouzdanim u identifikaciji inficiranih goveda, pa iako daleko od savršenog, još od vremena Kohovog otkrića tuberkulina, do danas nije zamenjen boljim dijagnostičkim metodom za masovno ispitivanje goveda (Kaufmann i Shaible, 2005). Postoji čitav niz faktora koji mogu uticati na osetljivost i specifičnost tuberkulinskog testa i umanjiti mogućnost pravilne identifikacije inficiranih jedinki (osetljivost) ili uzrokovati pojavu lažno pozitivnih jedinki (smanjena specifičnost). Usled toga pojavila se potreba za razvojem niza dopunskih testova sa ciljem da se poveća sigurnost u dijagnostici tuberkuloze goveda (de la Rua-Domenech i sar., 2006a). Jedan od ovih dijagnostičkih testova je γ -IFN test, koji je razvijen kao dopuna intradermalnom testu sa ciljem, poboljšanja ukupne verovatnoće otkrivanja tuberkuloznih grla (osetljivost) u regionima ili unutar zapata sa visokom prevalencije infekcije, kao i da poveća specifičnost dijagnostičkog testiranja u poslednjim fazama

procesa iskorenjivanja tuberkuloze, u regionima sa niskom incidencijom infekcije ili oblastima sa dokazanom nespecifičnom senzibilizacijom goveda. Međutim, čak ni paralelnom upotrebom tuberkulinskog testa i γ -IFN testa ne osigurava se 100% osetljivost (Schiller i sar., 2010b). Serološki testovi mogu pomoći u otkrivanju inficiranih životinja koje nisu reagovala na testovima kasne preosetljivosti (Pollock i sar., 2001).

Zapravo, ni jedan *in vitro* odnosno laboratorijski test u ovom trenutku ne može biti pouzdana "cost-effective" alternativa intradermalnoj tuberkulinizaciji koja i dalje predstavlja temelj rutinske dijagnostike tuberkuloze goveda, drugih farmskih životinja, pa i čoveka (Bezos i sar. 2014a).

2.6.1. Intradermalni tuberkulinski test

Dijagnostička metoda intradermalne tuberkulinizacije zasniva se na principu stimulisanja reakcije kasne preosetljivosti putem aplikovanja tuberkulina u kožu životinje (Coad i sar., 2010). Tuberkulin predstavlja protein, dobijen ekstrakcijom pomoću glicerola iz supernatanta kultura mikobakterija u tečnoj podlozi. Tokom decenija, prvobitni Kohov tuberkulin je prečišćavan različitim metodama, sve dok konačno nije zamenjen savremenim purifikovanim proteinskim derivatom tuberkulina (PPD). Bovini tuberkulin PPD koji se danas upotrebljava širom sveta za dijagnostiku tuberkuloze goveda, pripremljen je od soja AN5 *M. bovis* terenskog izolata iz Engleske, koji je prilagođen za optimalni rast u *in vitro* uslovima (Inwald i sar., 2003; Schiller i sar., 2010a), a avijarni PPD od sojeva *M. avium* D4ER ili TB56. Današnji tuberkulin PPD predstavlja mešavinu malih proteinskih frakcija rastvorljivih u vodi, dok su neke nespecifične komponente Kohovog tuberkulina uklonjene (Good i Duignan, 2011).

Kada se bovini tuberkulin ubrizga u kožu neinficirane životinje ne dolazi do značajnijeg lokalnog inflamatornog odgovora. Sa druge strane ako se tuberkulin aplikuje životinji čiji je imunološki sistem ranije bio senzibilisan infekcijom sa *M. bovis* ili izložen mikroorganizmima čiji antigeni daju unakrsnu reakciju, dolazi do zapaljenske reakcije, eksudacije i otoka koji su najintenzivniji 48-72h posle injekcije a nakon toga se brzo povlače (Francis i sar., 1958; Bezos i sar. 2014a). Dominantna komponenta imunološkog odgovora kod goveda inficiranih sa *M. bovis* zasnovana je na ćelijski posredovanom imunitetu, pri čemu najznačajniju ulogu imaju T-limfociti (Waters i sar.,

2014). Reakcija kasne preosetljivosti na aplikovani PPD tuberkulin odvija se posredstvom senzibilisanih T-ćelija, i potrebno je da prođe par nedelja od infekcije dok organizam razvije ovaj tip imunološkog odgovora (Thorns i Morris 1983).

Prema definisanoj proceduri intradermalna tuberkulinizacija se vrši tako, što se na prethodno ošišanom i očišćenom mestu aplikacije, izmeri debljina kožnog nabora, a zatim se u kožu ubrizga tuberkulin. Za ovu svrhu mogu se koristiti različiti tipovi špriceva, ali najčešće korišćeni su McLintock i Dermojet, a razlika je u tome što ovi poslednji ne sadrže iglu, nego se tuberkulin u kožu ubacuje pod visokim pritiskom (100 bara). Malo izbočenje na koži nalik zrnu pirinča koje se može palpirati, potvrda je pravilno izvedene tuberkulinizacije (de la Rua-Domenech i sar., 2006a). Nakon otprilike 72 (± 4) časa od aplikacije, mesto na kojem je ubrizgan tuberkulin se pregleda adspekcijom i palpacijom da bi se ustanovili znaci lokalne zapaljenske reakcije. To je tzv. pojedinačna intradermalna proba (eng. single intradermal test SIT) pri kojoj se tuberkulin obično aplikuje u kožu srednje trećine vrata (Evropske države) ili u kožni nabor repa (SAD, Kanada, Novi Zeland) (Monaghan i sar., 1994). Pre aplikacije tuberkulina neophodno je izmeriti debljinu kožnog nabora kutimetrom, da bi se ista mogla uporediti sa debljinom nakon 72 časa od tuberkulinske probe. Najbolje je da oba merenja obavi isti veterinar (Bezoz i sar., 2014a). Kada se tuberkulinski test izvodi kao pojedinačni komparativni intradermalni cervikalni test (eng. single intradermal comparative cervical test SICCT), simultano se u kožu aplikuju bovini i avijarni tuberkulin, jedan sa leve a drugi sa desne strane vrata. Tumačenje tuberkulinske reakcije zasniva se na činjenici da goveda koja su inficirana vrstom *M. bovis* daju izraženiju reakciju na bovini tuberkulin, dok sa druge strane, životinje inficirane drugim vrstama mikobakterija imaju tendenciju da jače reaguju na avijarni tuberkulin (Coad i sar., 2010). Primenom ovakvog načina tuberkulinizacije omogućeno je razlikovanje životinja koje su inficirane vrstom *M. bovis* od onih senzibilisanih mikobakterijama iz *M. avium complex*-a ili nepatogenim ambijentalnim mikobakterijama (Monaghan i sar., 1994). Za koji će se tip tuberkulinizacije odlučiti prilikom kontrole i suzbijanja tuberkuloze goveda, u nekom regionu, zavisi od prevalencije tuberkuloze i stepena izloženosti goveda nepatogenim ambijentalnim mikobakterijama koje mogu dovesti do senzibilizacije i pojave lažno pozitivnih rezultata. U državama kao što su SAD, Novi Zeland, Kanada i Australija, rutinska dijagnostika tuberkuloze goveda vrši se primenom

pojedinačnog intradermalnog tuberkulinskog testa, pri čemu se tuberkulin aplikuje u repni nabor (Cousins i sar., 2001). Međutim, u kontinentalnoj Evropi i većini drugih država u svetu cervikalni tuberkulinski test je primarni metod za dijagnostiku tuberkuloze goveda bilo za individualnu ili masovnu kontrolu (de Vos i sar., 2015). Prema Schiller i sar., (2010b) koža u predelu vrata je znatno osetljivija u odnosu na kožu repnog nabora u pogledu reakcije na tuberkulin, pa su u drugom slučaju potrebne veće doze PPD-tuberkulina. Ipak, maksimalna količina koja se aplikuje ne treba da pređe 0,2 ml rastvora koji sadrži minimalno 2000IU bovinog i avijarnog PPD (Bezos i sar., 2014a). Prema Good i Duignan-u (2011), u praksi je veoma važno pravilno odabrati deo vrata za intradermalnu aplikaciju PPD tuberkulina, a kao najpogodiji navode srednji deo vrata u dorzalnoj trećini. Države koje nisu zvanično slobodne od tuberkuloze goveda, u zavisnosti od epizootioloških pokazatelja koriste pojedinačni intradermalni test (SIT) ili pojedinačni komparativni test (SICT) kao osnovne dijagnostičke metode u programu eradikacije tuberkuloze. Tako recimo SIT je primarni dijagnostički metod u Španiji, Italiji, Hrvatskoj i Srbiji, dok se SICT koristi u Engleskoj, Irskoj i Portugaliji (Eradication, Control and Monitoring Programmes, European Commission; http://ec.europa.eu/food/animal/diseases/index_en.htm).

U većini država se pojedinačni komparativni cervikalni test (SICCT) koristi kao dodatni test prilikom retuberkulinizacije grla koja su dala pozitivnu, sumnjivu ili reakciju koju nije moguće sa sigurnošću protumačiti prilikom primarne tuberkulinizacije (Tweedle i Livingstone 1994). U Velikoj Britaniji i Irskoj SICCT je u upotrebi i kao rutinski test za masovnu kontrolu, ali i kao potvrdni test za sumnjiva grla ili zapate koji su označeni kao rizični za pojavu tuberkuloze goveda. U Republici Irskoj i Severnoj Irskoj svi zapati goveda rutinski se testiraju jedanput godišnje, dok se u ostalim delovima Velike Britanije dijagnostičko ispitivanje vrši na svakih 12, 24 ili 48 meseci u zavisnosti od epizootiološke situacije (de la Rua-Domenech i sar., 2006a). Leslie i sar., (1975) su nakon opsežnih terenskih ispitivanja SICCT metodom tada novog Weybridge bovinog PPD tuberkulina (1,0 mg/ml) i avijarnog PPD tuberkulina (0,5 mg/ml) na 10.305 goveda iz 179 različitih zapata postavili osnovna pravila u tumačenju reakcije i načinu doziranja tuberkulina koja su i danas na snazi. Prema njihovoj šemi u slučaju da se pozitivna reakcija na tuberkulin potvrdi nakon klanja životinje (patohistološki i/ili kultivacijom), buduće interpretacije rezultata intradermalne

tuberkulinizacije u takvim zapahtima odvijaju se po „pooštrenom“ kriterijumu. Ovo u praksi znači da se snižava granična (*cut off*) vrednost reakcije iznad koje se životinja označava kao pozitivna na tuberkulozu. Iako se na taj način povećava osetljivost SICCT testa preko „standarne“, ovako „pooštrenu“ interpretaciju rezultata testa ne treba koristiti u rutinskom nadzoru zbog smanjene specifičnosti, što može dovesti do neopravdano velikog broja sumnjivih i lažno pozitivnih grla i zapata (de la Rua-Domenech i sar., 2006a).

Specifičnost i osetljivost intradermalnog tuberkulinskog testa u velikoj meri zavise od niza faktora a neki od najznačajnijih su stadijum i težina infekcije, izloženost mikroorganizmima koji daju unakrsnu reakciju i imunološka reaktivnost samog makroorganizma (Norby i sar., 2004; Schiller i sar., 2010a). Good i Duignan (2011), smatraju da su koncentracija i potencija tuberkulina od presudnog značaja za ishod intradermalne tuberkulinske probe, pri čemu ukazuju na značajnu razliku u broju pozitivnih reakcija pri upotrebi tuberkulina visoke i niske koncentracije. Danas je proizvodnja PPD tuberkulina u Evropskoj Uniji standardizovana i regulisana različitim Direktivama, a kontrolu vrši Evropska referentna laboratorija za tuberkulozu goveda (Bezos i sar., 2014a). Smatra se da je bovini tuberkulin prihvatljivog kvaliteta ukoliko ima koncentraciju od minimum 2000IU u jednoj dozi, a ustanovljena potencija je između 66-150% od one koju deklarise proizvođač. Veliki broj različitih činilaca može dovesti do pojave lažno negativne reakcije pri tuberkulinizaciji. De la Rua-Domenech i sar., (2006a) navode da do pojave lažno negativnih rezultata može doći usled delovanja većeg broja faktora, od kojih neki zavise od same životinje kao što su: desenzibilizacija u slučaju kada je životinja podvrgnuta retuberkulinizaciji prerano nakon prvobitne tuberkulinizacije, nereaktivnost tokom prealergijskog perioda (kada je test rađen suviše rano posle infekcije), anergija (usled generalizovane infekcije ili imunološke iscrpljenosti životinje), koinfekcija ili ranija izloženost i senzibilizacija sa nepatogenim ambijentalnim mikobakterijama koje su prisutne u hranivima, vodi, prostirci ili ambijentu staja u kojima se drže goveda (npr. *Mycobacterium intracellulare complex*) što dovodi do hipersenzibilizacije na avijarni tuberkulin pri izvođenju SICCT ili gama interferon testa, prethodna primena imunosupresivnih lekova (npr. kortikosteroida), koinfekcija sa imunosupresivnim virusima (BVD i možda virus bovine imunodeficijencije) pothranjenost, izloženost životinje različitim stresogenim faktorima.

Drugu grupu faktora čine nepravilnosti vezane za korišćeni tuberkulin: (istekao rok, nepravilno skladišten tuberkulin, preduga izloženost svetlu i toploti, greške u proizvodnji tuberkulina, neadekvatan soj *M.bovis*, neadekvatna kalibracija šarže itd.). Treću grupu faktora čine oni vezani za greške pri aplikaciji (ubrizgavanje nedovoljne količine tuberkulina, supkutana aplikacija, zamena mesta aplikacije tuberkulina A i B), očitavanju reakcije (prerano ili prekasno, van propisanog okvira $72 \pm 6h$, namerno ili nenamerno pogrešno tumačenje reakcije) i greške u evidentiranju pozitivnih životinja i beleženju dobijenih rezultata. Sa druge strane koinfekcija ili prethodna izloženost goveda nepatogenim mikobakterijama, može dovesti do pojave lažno pozitivnih reakcija usled antigenske podudarnosti i unakrsne imunološke reakcije (Humblet i sar., 2011).

Gormley i sar., (2004) navode da su neke jedinke možda konstitucijski nesposobne da razviju merljiv ćelijski posredovani imunološki odgovor na stimulaciju tuberkulinom. Preosetljivost na tuberkulin obično se razvija 1-9 nedelja nakon infekcije uzročnikom *M.bovis*, u zavisnosti od konstitucije životinje i faktora vezanih za izvođenje samog testa (Schiller i sar., 2010a), ali za većinu životinja puni imunološki odgovor nastaje između 3 i 6 nedelje posle infekcije. Morrison i sar., (2000) ukazuju da se dužina utvrđenog prealergijskog perioda ustanovljena u istraživanjima vršenim početkom dvadesetog veka, odnosi na infekciju izuzetno visokim dozama uzročnika, što se u prirodi retko dešava, kao i na upotrebu zastarele formulacije tuberkulina. Ipak i novija eksperimentalna ispitivanja su pokazala da se kod teladi intranazalno inficirane sa 10^4 CFU *M.bovis* merljiva hiperalergijska reakcija na SICCT testu (standardno tumačenje) razvija nakon tri nedelje. Istraživanja u Velikoj Britaniji koja je tokom 2005-e, vršio Dean sa saradnicima, nisu potvrdila korelaciju između visine infektivne doze *M. bovis* kojoj su goveda bila izložena i intervala koji je neophodan za razvoj tuberkulinske reakcije. Generalizovana infekcija u poodmaklom stadijumu može dovesti životinju u stanje anergije na tuberkulin. Slično dejstvo ima i prolongiran ili intenzivan stres kojem je životinja izložena (Pollock i Neil, 2002). Prema nalazima Monaghan-a i sar., (1994) krave koje su se telile 4-6 nedelja pre izvođenja tuberkulinizacije mogu biti privremeno anergične. Izloženost životinje kortikosteroidima u terapijske ili eksperimentalne svrhe može u velikoj meri da utiče kod inficiranih grla na redukciju intenziteta tuberkulinske reakcije. Koinfekcija virusima koji deluju imunosupresivno, slabeći aktivnost limfocita i makrofaga (npr. BVDV), može imati prolazan negativni uticaj na dijagnostičke testove

za tuberkulozu (Charleston i sar., 2001). Uticaj pothranjenosti na slabljenje ćelijskog imuniteta kod laboratorijskih životinja i ljudi dokazan je većim brojem ispitivanja (Monaghan i sar., 1994). Posle intradermalne tuberkulinske probe, inficirana goveda neko vreme imaju smanjenu reaktivnost na ponovnu tuberkulinizaciju. Ovaj fenomen poznat je kao desenzibilizacija i može dovesti do neuspeha u pravilnoj identifikaciji eksperimentalno ili prirodno inficiranih goveda. Supresivni efekat najjače je izražen u prvoj nedelji nakon tuberkulinizacije (Doherty i sar., 1995; Bezos i sar., 2014a). Mehanizam nastanka desenzibilizacije nije u potpunosti objašnjen, ali puna reaktivnost vraća se po isteku 60 dana od primarne tuberkulinizacije (Thom i sar., 2004). Da bi se izbegao efekat desenzibilizacije, protokol tuberkulinizacije predviđa da između dve uzastopne kožne probe minimalni interval mora biti 42 dana. Istraživanja drugih autora (Costello i sar., 1997) ukazuju da učestale tuberkulinizacije koje se vrše u hronično inficiranim zaptima nemaju značajniji uticaj na desenzibilizaciju goveda, a Thom i sar., (2004) navode da ponovljene tuberkulinizacije teladi pre i posle eksperimentalne infekcije sa *M. bovis* ne ugrožavaju značajnije osetljivost testa. U Velikoj Britaniji retuberkulinizacija se vrši nakon isteka 60 dana u hronično inficiranim zaptima, pri nejasnim ili sumnjivim reakcijama što predstavlja racionalan okvir za prevazilaženje problema desenzibilizacije i sporog razvoja preosetljivosti na tuberkulin (de la Rua-Domenech i sar., 2006a). Kada se tumačenje tuberkulinske reakcije radi po kriterijumu standardne interpretacije SICCT, moguće je da promaknu jedinke koje su koinficirane mikobakterijama iz kompleksa *M. avium-intracellulare* pa intenzivnije reaguju na avijarni tuberkulin u odnosu na bovini. Istovremena eksperimentalna infekcija teladi sa *M. bovis* i *M. avium* u velikoj meri utiče na standardnu interpretaciju kako rezultata SICCT tako i γ -IFN testa (Hope i sar., 2005).

U poslednje dve decenije veliki broj autora ispitivao je osetljivost i specifičnost intradermalne tuberkulinizacije pod različitim epizootiološkim okolnostima, bilo da se izvodi kao monotest sa aplikacijom u kožu repnog nabora ili kožu vrata ili kao SICCT. Pri tome su dobijeni različiti rezultati, tako da Francis i sar., (1978) navode da je osetljivost 72,0%, Wood i sar., (1992) 68,2%, a Norby i sar., (2004), 83,3% , dok Doherty i sar. (1995), navode da pri pooštrenoju interpretaciji osetljivost testa dostiže i 100%. Koža vrata pokazuje veću osetljivost na aplikaciju tuberkulina, što se može

kompenzovati većom dozom kada se aplikacija vrši u kožu repnog nabora (Schiller i sar. 2010a).

Različite performanse pri izvođenju intradermalnog tuberkulinskog testa dobijene prilikom istraživanja širom sveta, sažeto su predstavljene od strane de la Rua-Domenech i sar., (2006a) i Vordermeier i sar., (2006): specifičnost SIT kreće se od 75,5-96,8%, a osetljivost 80-91%, a za SICCT ustanovljena osetljivost kretala se u rasponu 55,1-93,5%, dok je specifičnost bila od 88,8-100%. Ovako široka varijabilnost, najverovatnije je posledica različitih tehnika vršenja tuberkulinizacije, uključujući i varijacije u dozi i kvalitetu tuberkulina, a na kraju i kriterijuma za interpretaciju reakcije. Pri nedavno sprovedenom istraživanju u Velikoj Britaniji, pri standardnoj interpretaciji testa i upotrebom Bajezijanovog statističkog modela, koji je uključivao i podatke prikupljene nakon klanja grla negativnih na SICCT testu ustanovljena je specifičnost od 81% (Karolemeas i sar., 2012).

Nedovoljna specifičnost testa dovodi do pojave lažno pozitivnih jedinki, koje u kontekstu programa suzbijanja tuberkuloze predstavljaju tzv „nespecifične reaktore“ (NSR). Do pojave lažno pozitivnih i nespecifičnih reakcija može dovesti infekcija ili izloženost čitavom nizu različitih bakterija, koje imaju sličnu antigensku strukturu sa mikobakterijama uzročnicima tuberkuloze, i daju unakrsnu reakciju na PPD-B tuberkulinom. Pojava nespecifičnih reakcija preosetljivosti na intradermalnu tuberkulinsku probu, kao i druge dijagnostičke testove za tuberkulozu, opisana je kako posle prirodne tako i eksperimentalne infekcije sa *M. avium ssp. avium*, *M. avium ssp. paratuberculosis*, a procenat ovakvih reaktora u zavisnosti od države ili regiona može varirati od 0,5-10% (Schiller i sar., 2010a). Sličan efekat ima i imunizacija teladi vakcinom protiv Johne-ove bolesti ili eksperimentalna vakcinacija BCG sojem *M. bovis* (Vordermaier i sar., 2001), ili infekcija atipičnim mikobakterijama izolovanim iz materijala poreklom od različitih životinjskih vrsta (Hughes i sar., 2005). Najintenzivnija reakcija na bovini tuberkulin prisutna je kod goveda inficiranih sa *M. bovis* i *M. tuberculosis* (de la Rua-Domenech i sar., 2006a) ili *M. caprae* (Bezoz i sar., 2014a). Prilikom komparativne intradermalne tuberkulinizacije, goveda inficirana mikobakterijama koje ne ulaze u sastav tzv. MTB-kompleksa, obično intenzivnije reaguju na avijarni tuberkulin u odnosu na bovini (Schiller i sar. 2010b; Hope, i sar., 2005). Ovo različito reagovanje na avijarni i bovini tuberkulin čini osnovu SICCT testa

kojim se prevazilazi većina problema vezanih za pojavu nespecifičnih reakcija prilikom izvođenja pojedinačne tuberkulinske probe (Bezoz i sar., 2014a). Ipak, mali procenat goveda prirodno inficiranih sa *M. bovis*, kod kojih su tuberkulozne promene potvrđene post mortalno, može razviti podjednaku ili čak jaču reakciju preosetljivosti na avijarni u odnosu na bovini tuberkulin (Lesslie i sar., 1975). Dugoročno, jedan od načina da se prevaziđe postojeći problem nespecifične senzibilizacije je zamena PPD tuberkulina specifičnim prečišćenim antigenom poreklom od *M.bovis* (Amadori i sar., 2002; Schiller i sar., 2011). Upotrebom visokih doza ESAT-6 proteinske frakcije, prilikom intradermalne tuberkulinizacije, znatno je poboljšana specifičnost ali smanjena osetljivost u odnosu na PPD tuberkulin (Flores-Villalva i sar., 2012). U toku je i istraživanje mogućnosti korišćenja infracrvene termografije (IRT), u očitavanju tuberkulinske reakcije na daljinu pri izvođenju SICCT.

Poseban dijagnostički i epizootiološki problem predstavljaju grla koja su imala pozitivnu tuberkulinsku reakciju, ali kasnije nakon klanja nisu ustanovljene patomorfološke lezije karakteristične za tuberkulozu, niti je izolovan uzročnik, tzv. NVL (eng. non visible lesion) reaktori. Prema istraživanjima velikog broja različitih autora (Byrne 1992; Tweedle i Livingstone 1994; de la Rua-Domenech i sar. 2006b) u Velikoj Britaniji i Irskoj ovakva grla predstavljaju 50-80% od ukupnog broja pozitivnih grla na kožnom testu. Istraživanja koja su vršili Gonzales-Llamazares i sar., (1999) pokazala su da od 141 goveda koja su bila pozitivna na SICCT, kod 40 jedinki posle klanja nije izolovana *M.bovis*. Prema de la Rua-Domenech (2006b), ovo ostavlja lažan utisak da je specifičnost testa mnogo manja nego što je utvrđeno različim terenskim ispitivanjima i podriva poverenje veterinara i farmera u pouzdanost ove dijagnostičke metode. Sumirajući rezultate ispitivanja većeg broja istraživača, on navodi da su postmortalni pregledi koji se vrše nakon klanja u komercijalnim klanicama, kao i standardne bakteriološke metode za potvrdu kod obolelih jedinki znatno manje osetljive od testa kasne preosetljivosti (ćelijski posredovanog imunološkog odgovora na antigene bakterija), koji registruje i subklinički inficirane životinje. NVL reaktori mogu biti jedinke koje su u ranoj fazi infekcije kada su tuberkulozni granulomi previše mali i prisutni u neznatnom broju, pa su teško uočljivi na pregledu posle klanja. Razvoj tuberkuloznih promena uočljivih na *post-mortem* pregledu posledica je imunološkog odgovora makroorganizma na kolonizaciju tkiva mikobakterijama i javlja se u kasnijim

stadijumima infekcije. Stoga, vidljive tuberkulozne lezije ne moraju biti prisutne kod svih goveda inficiranih sa *M.bovis*, a čak i ako su prisutne mogu biti neznatnih dimenzija u ranoj fazi infekcije i promaći pri rutinskom pregledu na liniji klanja (Gormley i sar., 2004).

U drugom slučaju radi se o životinjama inficiranim sa *M. bovis*, ali bez kliničkih manifestacija oboljenja, usled sposobnosti organizma da privremeno ograniči infekciju u latentnom stanju (Pollock i Neil, 2002). Na kraju, može se raditi i o stvarno lažno pozitivnim jedinkama koje su inficirane napatogenim mikobakterijama iz spoljašnje sredine ili drugim uzročnicima koji daju unakrsnu reakciju sa antigenima prisutnim u tuberkulinu (Schiller i sar., 2010a). U regionima gde se tuberkuloza goveda javlja endemski i gde je infekcija potvrđena *post mortem* različitim laboratorijskim metodama, pozitivna tuberkulinska reakcija predstavlja visoko verovatan pokazatelj infekcije, i na određeni način čini nebitnim, da li su prisutne lezije ili je jedinka NVL reaktor. Kako prevalencija tuberkuloze u nekom regionu opada tako i vrednost tuberkulinskog testa (kožna proba ili γ - IFN) kao pouzdanog pokazatelja infekcije opada i pojavljuje se veći broj pozitivnih reakcija usled nespecifične senzibilizacije (de la Rua-Domenech i sar., 2006a). U takvim slučajevima pri retuberkulinizaciji neophodno je primeniti dodatne odnosno pomoćne testove, u cilju razjašnjavanja statusa grla sa pozitivnom ili sumnjivom reakcijom na tuberkulinskom testu (Schiller i sar., 2010b). Prema mišljenju de la Rua-Domenech i sar., (2006a) postojanje NVL reaktora, u suštini nije problem slabe specifičnosti tuberkulinskog kožnog testa, nego više nepostojanja „zlatnog standarda“ u određivanju stvarnog infektivnog statusa jedinke, kao i niske sposobnosti pozitivnog testa, da predvidi infekciju u zaptima i regionima koji imaju nisku prevalenciju ili su slobodni od tuberkuloze. Prema važećem protokolu tuberkulinizacije u EU, u zaptima u kojima su ustanovljena goveda sa pozitivnom reakcijom na tuberkulinskoj probi, retuberkulinizacija svih grla starijih od šest nedelja automatski se vrši po isteku 60 dana, sve dok jedna ili dve uzastupne tuberkulinizacije (u zavisnosti da li je infekcija laboratorijski potvrđena kod prethodno zaklanih pozitivnih grla) ne daju negativne rezultate. Kontrola se nakon toga vrši na 6 meseci, a u slučaju negativnog rezultata naredna na 12 meseci da bi se potom vratilo na standardni interval testiranja. U zaptima u kojima se potvrdi prisustvo infekcije, odmah se prelazi na pooštrenu interpretaciju tuberkulinske reakcije (de la Rua-Domenech i sar., 2006a).

Pojava tuberkuloze u nekom zapatu smatra se potvrđenom, kada su kod najmanje jedne pozitivne jedinke ustanovljene karakteristične patomorfološke promene ili u slučaju NVL, ako je iz pula uzoraka limfnih čvorova izolovana *M. bovis* (de la Rua-Domenech i sar. 2006b). Prema Aneksu B evropske Direktive 64/432/EEC, sve jedinke koje su reagovale pozitivno na tuberkulinskom intradermalnom testu, smatraju se inficiranim.

2.6.2. Gama interferon test (γ -IFN)

Gama interferon test je *in vitro* test za merenje ćelijski posredovanog imuniteta za koji se koristi puna, heparinisana krv goveda. Razvijen je krajem 80-tih godina prošlog veka u Australiji kao dopuna intradermalnoj tuberkulinizaciji, za primenu u završnoj fazi kampanje iskorenjivanja tuberkuloze goveda (Wood i sar., 1991; Wood i Jones, 2001), a od 1996 preporučena je kao pomoćna dijagnostička metoda i od strane OIE (OIE Terrestrial manual 1996). Od 1991. godine ovaj test odobren je kao zvanični metod za dijagnostiku tuberkuloze goveda u Australiji (Tweedle i Livingstone, 1994), a krajem 90-tih i u Novom Zelandu. γ -IFN test Bovigam (Prionics, Switzerland) koristi se kao dopunski test u kontroli i nadzoru tuberkuloze goveda u SAD (Bass i sar., 2013), a predstavlja i jedan od dva zvanično odobrena testa u rutinskoj dijagnostici tuberkuloze goveda u EU na osnovu direktive Council Directive 64/432/EEC, amended by (EC) 1226/2002 (Schiller i sar., 2011). Ukratko, γ -IFN test odvija se u dve faze, prva započinje na samoj farmi gde se punkcijom vene uzima krv u vakutajnere sa heparinom, u količini od oko 5 ml. Uzorke je potrebno što pre dostaviti u laboratoriju, gde se vrši inkubiranje na 37°C male količine heparinisane krvi sa bovinim i avijarnim PPD tuberkulinom, ili koktelom antigena, uz istovremenu inkubaciju i PBS-a koji služi kao negativna kontrola, u trajanju 18-24h. Stimulacija dodatim antigenima uzrokuje oslobađanje interferona od strane prevashodno T-limfocita. γ -IFN spada u citokine, koje prvenstveno izlučuju senzibilisani T-limfociti, i kao glavni faktor aktivacije makrofaga ima važnu ulogu u odbrani organizma od infekcije mikobakterijama iz tuberkuloznog kompleksa (Faye i sar., 2011). Posle 18-24 h inkubacije odliva se supernatant plazme koji se izdvaja iznad nataloženih eritrocita. U drugoj fazi testa količina nakupljenog gama interferona u plazmi kvantitativno se određuje upotrebom sendvič ELISA testa (Schiller i sar., 2010b). Količina sintetisanog γ -IFN meri se na osnovu promene boje i

izražava u jedinicama optičke gustine (eng. optical density OD) (Wood i Jones, 2001). Prema uputstvu proizvođača, na osnovu očitavanja optičke gustine kriterijum za pozitivnu reakciju, kada se stimulacija vrši bovinim PPD (PPDb), avijarnim PPD (PPDa) i PBS-om (Nil) kao negativnom kontrolom je sledeći $PPDbOD - NilOD \geq 0.1$ i $PPDbOD - PPDaOD \geq 0.1$.

Inkubaciju je najoptimalnije raditi 8h od uzorkovanja, a najkasnije 24h od uzimanja uzorka krvi. Potrebno je da uzorci krvi budu adekvatno uzeti, čuvani na odgovarajućoj temperaturi (10-26 °C) i u što kraćem roku transportovani u laboratoriju, jer odlaganje u obradi uzoraka znatno umanjuje osetljivost testa (Gormley i sar., 2004). Međutim, novija ispitivanja pokazuju da odlaganje inkubacije heparinisane krvi, posle uzorkovanja na 24h u odnosu na 8h, znatno povećava specifičnost metode (sa 85 na 97%), dok samo neznatno utiče na osetljivost (smanjenje sa 96 na 90%) što nema statističkog značaja (Schiller i sar., 2010b)

Waters i sar., (2007) ustanovili su da izloženost uzoraka temperaturi od 37° C u prva dva sata nakon uzorkovanja dovodi do znatnog smanjenja proizvodnje γ -IFN, dok nema velike razlike u sintezi γ -IFN kada su uzorci u tom periodu skladišteni na 4°C ili 22°C. Sa druge strane, odlaganje laboratorijske faze gama interferon testa za 24h u odnosu na 8h ima znatan negativan efekat na sintezu γ -IFN pri stimulaciji *M.bovis* PPD tuberkulinom, stoga autori preporučuju da se u svim fazama uzorkovanja i transporta krvi do laboratorije poštuje hladni lanac.

Na određeni način *in vitro* γ -IFN test je veoma sličan *in vivo* SICCT testu, jer se kod oba upoređuje razlika u ćelijski posredovanoj imunološkoj reakciji pri stimulaciji antigenima *M.bovis* i *M. avium* (Schiller i sar., 2010b). Već nakon 1-4 nedelje *post infectionem*, T-limfociti sintetišu merljive količine γ -IFN-a kada se stimulišu PPD tuberkulinom. Ukoliko je jedinka inficirana sa *M.avium* ili nekom od ambijentalnih mikobakterija sinteza γ -IFN-a će biti izraženija kada se T-ćelije inkubiraju sa avijarnim tuberkulinom. Grla su pozitivna na tuberkulozu kada je sinteza γ -IFN-a mnogo intenzivnija nakon stimulacije bovinim tuberkulinom u odnosu na avijarni i negativnu kontrolu. Iako proizvođač definiše tri moguća rezultata testa (pozitivan, negativan, avijarni pozitivan), radi lakšeg poređenja sa SICCT uvedena je i mogućnost sumnjive reakcije kada se rezultati tumače na sledeći način: pozitivna reakcija $B-N \geq 0,1$ i $B > A$; negativna reakcija $B-N < 0,05$ i $A-N < 0,1$; pozitivna reakcija na avijarni tuberkulin $A-N$

$\geq 0,1$ i $A > B$; sumnjiva reakcija $0,1 \geq B - N \geq 0,05$ i $B > A$ (Gonzales-Llamazares i sar., 1999). Jedna od prednosti γ -IFN testa je u tome što se kriterijumi interpretacije mogu prilagođavati lokalnim uslovima, odnosno epizootiološkoj situaciji, prevalenciji infekcije i fazi u kojoj se nalazi program kontrole tuberkuloze. Zato je za pravilnu upotrebu i tumačenje rezultata γ -IFN testa od presudnog značaja prilagoditi kriterijume i *cut-off* vrednosti za PPD B i PPD A lokalnoj epizootiološkoj situaciji (Faye i sar., 2011).

Tokom dve decenije, dijagnostičku vrednost gama interferon testa ispitivao je veći broj autora u različitim zemljama i pod različitim lokalnim epizootiološkim uslovima. Wood i sar., (1991) u Australiji vršili su ispitivanje na 6264 goveda i ustanovili da osetljivost testa iznosi 81,6% a specifičnost 99,4%. Prema rezultatima Neil i sar., (1994) nakon ispitivanja izvršenih na 2799 grla u Severnoj Irskoj utvrđena osetljivost testa je bila 84,3%, a Monaghan i sar., (1997) posle ispitivanja sprovedenih u Republici Irskoj navode da je utvrđena osetljivost testa 87,7%. U Brazilu Lilenbaum i sar., (1999) su ustanovili osetljivost testa od 100% i specifičnost 94,0%, dok Ameni i sar., (2000) u Etiopiji nalaze da ove vrednosti za osetljivost iznose 95,5% a za specifičnost 87,7%. Gormley i sar., (2004) ustanovili su da je od 767 goveda koja su nakon klanja označena kao pozitivna na tuberkulozu (prisustvo lezija i/ili izolacija *M.bovis*) 460 (60%) bilo prethodno identifikovano intradermalnim komparativnim tuberkulinskim testom (SICCT) pri standardnoj interpretaciji (pozitivna reakcija kada je zadebljanje na mestu aplikacije bovinog tuberkulina za 4 mm veće u odnosu na avijarni). Pri primeni pooštrenog načina interpretacije SICCT (pri kontroli u tuberkuloznim zapatima) za 570 grla (74%) je ustanovljena pozitivna reakcija. Osetljivost γ -IFN testa u ispitivanoj grupi životinja bila je značajno veća, jer je 679 grla (88%) dijagnostikovano kao pozitivno. Može se zaključiti da se na osnovu velikog broja istraživanja vršenih širom sveta, ustanovljena osetljivost testa kreće se od 73,0 do 100% (srednja vrednost 87,6%), dok specifičnost varira između 85,0 i 99,6% (Schiller i sar., 2010). Međutim, istraživanja u SAD koja su vršili Whipple i sar., (1995) ukazuju da je osetljivost γ -IFN testa bila od 55,4 do 94,7% u zavisnosti od kriterijuma odnosno metoda koji je korišćen za interpretaciju rezultata testa.

Brojna istraživanja koja su imala za cilj poređenje dijagnostičkih performansi intradermalnog tuberkulinskog testa i γ -IFN testa, pokazala su da γ -IFN ima veću

osetljivost, dok je specifičnost slična ili nešto niža u odnosu na SIT, a niža u odnosu na specifičnost pri izvođenju SICCT (Bezos i sar., 2014a). Međutim, pri paralelnoj primeni SICCT u pooštrenoj interpretaciji i γ -IFN testa mogućnost otkrivanja tuberkuloznih goveda je znatno veća u odnosu na bilo koji pojedinačni test, jer γ -IFN test upotrebljen paralelno sa tuberkulinizacijom snažno doprinosi otkrivanju maksimalnog broja inficiranih jedinki (Gormley i sar., 2004). Na rezultate testa u velikoj meri utiču karakteristike populacije goveda u kojoj se vrši ispitivanje, različite *cut-off* vrednosti koje se uzimaju za klasifikaciju jedinke kao inficirane, kvalitet PPD tuberkulina koji se u testu koristi kao antigen, ali i određivanje „zlatnog standarda“ prema kome se utvrđuje stvarni infektivni status jedinke (de la Rua-Domenech i sar., 2006a). Uticaj kvaliteta i potencije tuberkulina proizvedenog pod različitim okolnostima na osetljivost γ -IFN testa ispitivali su Whipple i sar., (2001) u SAD u komparativnoj studiji koristeći tuberkulin proizveden u Australiji i SAD. Iako su zabeležene razlike u OD vrednostima, konačna interpretacija testa je bila identična. γ -IFN test je osetljiv najmanje kao i kožni tuberkulinski test, ali je njime moguće otkriti znatan broj inficiranih goveda koja se ne dijagnostikuju rutinskom tuberkulinizacijom. Do ovoga najverovatnije dolazi usled toga što je γ -IFN testom moguće identifikovati goveda u ranijem stadijumu infekcije, odnosno već 14 dana od infekcije, a 60-120 dana ranije nego SCCIT (Lilenbaum i sar., 1999). γ -IFN pozitivna goveda koja na kožnom testu daju negativnu reakciju i stoga ne budu odmah upućena na klanje, imaju 7-9 puta veću verovatnoću da razviju pozitivnu reakciju i na intradermalnu tuberkulinizaciju u odnosu na grla koja su γ -IFN negativna i tuberkulin negativna (Gormley i sar., 2006; Pollock i sar., 2005). Gonzales Llamazares i sar. (1999), ustanovili su da od 171 goveda koja su bila pozitivna na γ -IFN testu, i upućena na sanitarno klanje kod 64 nije bilo potvrđeno prisustvo *M.bovis*. U poređenju sa intradermalnim tuberkulinskim testom gama interferon test ima određenih prednosti. Smatra se da je jednako osetljiv kao i pojedinačni tuberkulinski test, ali osetljiviji od komparativnog tuberkulinskog testa. Vreme potrebno da protekne od infekcije do pozitivnog odgovora na γ -IFN testu (1-5 nedelja) je neznatno kraće u odnosu na tuberkulinizaciju (3-6 nedelja). Moguće je ponavljanje testa u kratkom intervalu, gotovo bez odlaganja jer tuberkulin nije aplikovan i nema uticaja na imunološku reaktivnost, i desenzibilizaciju životinje (Schiller i sar., 2010b). Dalje kao prednost γ -IFN testa navodi se da nije potreban dvokratni odlazak na farmu, interpretacija testa je objektivnija i

standardizovana jer se sva merenja obavljaju u laboratoriji, a izbegnuti su i mnogi tehnički problemi vezani za tuberkulinizaciju (neadekvatna oprema, greška veterinara, mogućnost prevare).

Prethodno izvršena intradermalna tuberkulinizacija bez obzira da li je u pitanju cervikalna ili kaudalna aplikacija tuberkulina, ima uticaja na rezultate γ -IFN testa. Međutim, do sada objavljeni rezultati istraživanja većeg broja autora u velikoj meri su kontradiktorni. Prema Rothel-u i sar., (1992) prethodna tuberkulinizacija utiče na sintezu γ -IFN-a kod inficiranih goveda. Oni su ustanovili da OD vrednost γ -IFN testa postepeno raste između 7 i 59 dana nakon kaudalnog SIT. Ryan i sar. (2000)., ispitivali su Bovigam® test na prirodno inficiranim govedima 8 i 28 dana posle kaudalnog pojedinačnog tuberkulinskog testa (SIT) i došli do zaključka da se γ -IFN test može pouzdano koristiti nakon 8 dana od izvršenog SIT. U SAD Whipple i sar., (2001) ustanovili su da SIT pojačava sintezu γ -IFN-a tri dana nakon tuberkulinizacije i ovaj efekat traje 63 dana. Pri tome više OD vrednosti mogu se dobiti iz krvi koja je uzorkovana 3 dana posle tuberkulinizacije i testirana nakon 24 h čuvanja, u odnosu na krv koja je uzorkovana istovremeno sa SIT i odmah ispitana. Rezultati ovih istraživanja bili su osnov za propisivanje Protokola upotrebe Bovigam® γ -IFN testa od strane američkog Ministarstva poljoprivrede, prema kome se retestiranje goveda može obavljati 3-30 dana posle kaudalnog SIT. U dve odvojene studije koje su u Republici Irskoj sprovedi Doherty i sar., (1995) i Gormley i sar., (2004) autori nisu uspeli da dokažu značajnu razliku u koncentraciji γ -IFN nakon antigene stimulacije, prirodno inficiranih goveda pozitivnih na kožnom testu do 7 i 65 dana nakon prethodno izvršenog SICCT. Gormley i sar. (2004), navode da je moguće vršiti γ -IFN test već nakon tri dana od izvođenja SICCT bez uticaja na osetljivost *in vitro* testa. Pollock i sar., (2005); Waters i sar., (2004); Hughes i sar.,(2005); Schiller i sar., (2010b) kao nedostatke γ -IFN testa u odnosu na kožni test navode manju specifičnost, kao i činjenicu da mali broj inficiranih grla koja su pozitivno reagovala na kožnom testu ostaju neotkrivena pri izvođenju γ -IFN testa. Uticaj tuberkulinskog testa na *in vitro* sintezu γ -IFN, zavisi od toga da li je tuberkulin aplikovan u sklopu komparativnog cervikalnog tuberkulinskog testa ili tokom tuberkulinizacije u kožu repnog nabora. Kod SICCT testa nije ustanovljen nikakav efekat na proizvodnju gama interferona, dok je kod kaudalne aplikacije nakon nekoliko dana, ustanovljen snažan stimulišući efekat

(Schiller i sar., 2010b). Ograničenja u masovnoj upotrebi γ -IFN testa kao rutinske metode za dijagnostiku tuberkuloze goveda potiču od njegove relativno niže specifičnosti, što u zemljama i regionima u kojima je prevalencija tuberkuloze niska, može dovesti do uklanjanja i prinudnog klanja neprihvatljivo velikog broja neinficiranih grla (Bezoz i sar., 2014a).

Prilikom ispitivanja 1147 uzoraka krvi poreklom od goveda iz 21 različitog zapata u kojima prethodnih 5 godina nije bila utvrđena tuberkuloza, Gormley i sar., (2006) ustanovili su da je 60 grla bilo pozitivno u γ -IFN testu. Istovremeno svega jedno od ispitivanih goveda bilo je pozitivno na SICCT pri pooštrenom načinu interpretacije reakcije, što predstavlja specifičnost od 99,9% nasuprot 95% γ -IFN testa. Zato autori smatraju da γ -IFN test ne treba koristiti za rutinsko ispitivanje zapata goveda sa niskom prevalencijom tuberkuloze. Zamena PPD tuberkulina, izabranim antigenima kao što su ESAT-6 i CFP-10, prilikom izvođenja γ -IFN testa, ima veliki potencijal za poboljšanje specifičnosti Bovigam® testa (Schiller i sar., 2010a). Identifikacija i ekstrakcija specifičnih antigena, koji su karakteristični isključivo za *M.bovis*, a ne i za različite sojeve nepatogenih i ambijentalnih mikobakterija, može značajno poboljšati specifičnost ovog dijagnostičkog testa (Bezoz i sar., 2014a).

Rezultati nedavnih terenskih istraživanja sprovedenih u Velikoj Britaniji ukazuju da je upotreba peptidnih koktela sastavljenih od ESAT-6 i CFP-10 pokazala osetljivost od 86% i specifičnost od 99%, u odnosu na 97% osetljivosti i 94% specifičnosti kada se pri izvođenju γ -IFN testa koristio PPD tuberkulin (Vordermeier i sar., 2009). Istraživanja vršena u Meksiku u inficiranim i neinficiranim zapatima goveda, pokazala su veću specifičnost i osetljivost smeše ESAT-6/ CFP-10 proteina u odnosu na PPD tuberkulin kada su korišćeni prilikom *in vitro* γ -IFN testa (BOVIGAM®) ili *in vivo* SCCIT testa. Uz to proteinski koktel nije stimulisao produkciju γ -IFN kod testiranih jedinki poreklom iz zapata slobodnih od tuberkuloze, ali sa potvrđenim prisustvom infekcije uzročnikom paratuberkuloze (Flores-Villalva i sar., 2012). Postoji i veliki broj drugih antigena mikobakterija, na čijem se ispitivanju intenzivno radi kao što su CFP-10, MPB-70, Rv3615c i Rv0899, a prvi rezultati su ohrabrujući (Schiller i sar., 2011). Potraga za novim antigenima ili smešom antigena, koja bi zamenila PPD tuberkulin ima za cilj razvoj dijagnostičkih testova kojima bi bilo moguće razlikovati vakcinisane od inficiranih životinja (DIVA), što bi omogućilo uvođenje BCG vakcinacije goveda kao

mere prevencije tuberkuloze. Većina ovih DIVA testova izvodi se u *in vitro* uslovima uz upotrebu γ -IFN testa (Bezos i sar., 2014a). Takođe, na osnovu većeg broja ispitivanja druge generacije BOVIGAM® γ -IFN testa koji se na tržištu pojavljuje pod komercijalnim nazivom BOVIGAM® 2G (Prionics Switzerland), Schroeder i sar., (2012) ističu da upotreba peptidnih koktela ima prednost u odnosu na PPD tuberkulin usled veće specifičnosti, pri čemu je osetljivost nepromenjena.

U budućnosti trebalo bi raditi na razvoju γ -IFN testa koji bi bio primenljiv na veći broj životinjskih vrsta kao što su kamile, psi, mačke, što bi u velikoj meri doprinelo sveukupnoj kontroli tuberkuloze. Uz to, intenzivnija i široka primena γ -IFN testa u velikoj meri bi snizila i njegovu cenu zbog masovne proizvodnje (Schiller i sar., 2011).

Kao ograničavajući faktori za rutinsku upotrebu γ -IFN testa navode se i povišena verovatnoća pojave nespecifičnih reakcija kod mladih životinja (usled NK-ćelijske aktivnosti), neophodnost postojanja razvijene logističke infrastrukture (laboratorijski deo ispitivanja potrebno je započeti u roku od 24h) i visoka cena ispitivanja (Schiller i sar., 2010b; de Vos i sar., 2015). Zato većina istraživača smatra da je upotreba γ -IFN testa najsvrsishodnija, kada se koristi kao dopunski paralelni test u slučajevima pojave iznenadnih žarišta tuberkuloze ili u hronično inficiranim životinjama, zajedno sa kožnim tuberkulinskim testom, jer u tim situacijama uklanjanje malog broja lažno pozitivnih jedinki nije od presudnog značaja (Monaghan i sar., 1997; Schiller i sar., 2011). Uporedna primena kožnog tuberkulinskog testa i γ -IFN testa može podići ukupnu dijagnostičku osetljivost i do 20% u odnosu na primenu samo intradermalne tuberkulinizacije, što omogućuje brže uklanjanje većeg broja inficiranih grla iz tuberkulozom zahvaćenih životinja (Gormley i sar., 2006; Gonzalez Llamazares i sar., 1999). Kada se kombinuju rezultati tuberkulinskog testa i γ -IFN testa moguće je identifikovati 93% inficiranih životinja (Gormley i sar., 2004). U nekim državama u kojima je kožni tuberkulinski test predviđen za primarno testiranje populacije goveda, γ -IFN test se koristi kao dijagnostički test izbora pri retestiranju grla sa pozitivnom ili sumnjivom reakcijom u životinjama slobodnim od tuberkuloze ili regionima sa niskom prevalencijom (Buddle i sar., 2001; Wood i Jones, 2001). Ciljana upotreba γ -IFN testa u kombinaciji sa SICCT u hronično inficiranim životinjama goveda smanjuje rizik da inficirane životinje ostanu neotkrivene i ostanu u životinjskoj populaciji kao izvor infekcije za druga goveda i ljude. U Republici Irskoj upotreba γ -IFN testa kao dopune tuberkulinskog testa

rezervisana je za zapate za koje postoji velika verovatnoća prisustva inficiranih životinja. γ -IFN test je zvanično odobren za upotrebu kao dopunski test u SAD od 2001. godine, a u Evropskoj Uniji na osnovu Direktive 64/432/EEC iz 2002. godine kao dopunski test za paralelnu upotrebu sa tuberkulinskim kožnim testom u cilju otkrivanja maksimalnog broja inficiranih grla u tuberkulozom zahvaćenim zapatima (Gormley i sar., 2006). Prednost γ -IFN testa ogleda se u tome što se prag vrednosti za definisanje pozitivne reakcije može podešavati, čime se mogu menjati kako osetljivost tako i specifičnost testa (Monaghan i sar., 1997). U zapatima koji su masovno inficirani specifičnost testa je od sekundarnog značaja pa se osetljivost može podići na maksimum, u cilju identifikacije i uklanjanja što većeg broja zaraženih grla. Sa druge strane, kada se kampanja iskorenjivanja privodi kraju, interpretacija testa ide u pravcu povećanja specifičnosti, pri čemu je realno očekivati da će mali broj inficiranih grla ostati u zapatu (Gormley i sar., 2006).

2.6.3. Serološka dijagnostika

Iako se dijagnostika većine zaraznih i infektivnih bolesti zasniva na detekciji i ispitivanju humoralnog imunološkog odgovora, kod tuberkuloze merljiv nivo antitela pojavljuje se u cirkulaciji obolele životinje tek u stadijumu znatno uznapredovale infekcije ili pri infekciji visokim dozama uzročnika, a visina titra varira tokom bolesti (Neill i sar., 2001; Welsh i sar., 2005). Tako je antitela protiv ESAT-6 antigena moguće ustanoviti 12 nedelja nakon infekcije (Lyashchenko i sar., 1998), a protiv MPB70 tek posle 20 meseci. Ipak, postoje podaci i o ranom pojavljivanju cirkulišućih antitela prilikom eksperimentalne infekcije, tako Waters i sar., (2006) navode da je bilo moguće detektovati antitela protiv MPB83 proteina već 3-4 nedelje nakon inokulacije, te stoga ovaj protein predstavlja dobar izbor za dijagnostički antigen prilikom razvoja budućih seroloških testova. MPB83 imunodominantni antigen je glikozilovani lipoprotein ćelijske membrane mikobakterija, a ESAT-6 i CFP-10 su antigeni karakteristični za *M.bovis* i nisu ustanovljeni kod ambijentalnih mikobakterija ili BCG sojeva i zato predstavljaju dobre kandidate za razvoj DIVA testova (Vordermeier i sar., 2011). Razvoj seroloških testova, za detekciju humoralnog imunološkog odgovora, može predstavljati alternativnu „skrining“ metodu za utvrđivanje prisustva infekcije uzročnikom *M.bovis* u zapatima goveda ili kod divljači koja u nekim slučajevima

predstavlja značajan rezervoar infekcije. Nakon klanja grla pozitivnih na tuberkulinskom testu, kod mnogih jedinki nije moguće ustanoviti prisustvo karakterističnih lezija. U slučaju odsustva lezija patohistologija i kultivacija kao potvrdna metoda nailaze na poteškoće, te bi stoga ELISA-test mogao biti alternativni potvrdni metod. Međutim istraživanje Fraguas i sar., (2006) pokazalo je veoma nisku osetljivost ELISA testa 34,1%, i malu podudarnost sa rezultatima intradermalnog testa ($kappa$ indeks = 0.125). Iz tih razloga autori ne preporučuju upotrebu serološkog ELISA testa za potvrdu tuberkuloze na liniji klanja. U osnovi testovi zasnovani na utvrđivanju prisustva specifičnih antitela, imaju velik potencijal za upotrebu u dijagnostici tuberkuloze goveda, mada je prethodno neophodno razviti novu generaciju testova u kojima će u terenskim uslovima biti poboljšani osetljivost i specifičnost (Bezoz i sar., 2014a). Kombinovanje dijagnostičkih metoda koje se zasnivaju na reakciji kasne preosetljivosti, sa serološkim testovima povećava mogućnost otkrivanja inficiranih jedinki i omogućuje bolju kontrolu tuberkuloze (Schiller i sar., 2010b). Postoji veći broj radova o razvoju i primeni različitih seroloških testova za dijagnostiku tuberkuloze (Wood i Rothel 1994; Lin i sar., 1996; Surujballi i sar., 2002), u kojima se navodi da ELISA testovi imaju prednost u odnosu na tradicionalne dijagnostičke metode jer omogućuju ispitivanje velikog broja uzoraka za kratko vreme, jednostavni su za upotrebu, brzo se izvode, jeftini su i omogućavaju standardizaciju među različitim laboratorijama (Cho i sar., 2007). Naročita prednost ovih testova je kod nadzora nad infektivnim statusom različitih vrsta divljih životinja, gde je veoma značajno jednokratno uzorkovanje. Problem kod upotrebe seroloških testova je njihova relativno niska specifičnost i varijabilna osetljivost, čijem poboljšanju nije mnogo doprinela ni upotreba prirodnih ili rekombinantnih specifičnih antigena kao što su ESAT-6, MPB70. Iz tih razloga ulažu se veliki naponi za otkrivanje novih antigena koji bi unapredili ove testove (Schiller i sar., 2010b) .

Novija ispitivanja ukazuju na povećanje osetljivosti seroloških testova kada se uzorci krvi uzimaju u kratkom vremenskom periodu posle intradermalne tuberkulinizacije PPD tuberkulinom (Waters i sar., 2011). Iako je samo mali broj studija rađen na prirodno inficiranim govedima, rezultati ispitivanja upućuju da je potrebno nastaviti sa istraživanjima kako bi se ustanovilo optimalno vreme za uzimanje uzoraka nakon tuberkulinizacije (Bezoz i sar., 2014a). Istraživanja Casal i sar., (2015) su

pokazala da kombinovana upotreba intradermalne tuberkulinizacije i seroloških tehnika povećava broj otkrivenih pozitivnih jedinki. Imajući ovo u vidu, autori predlažu stratešku upotrebu serološkog ispitivanja uzoraka krvi goveda, 15 dana nakon tuberkulinizacije u zapatima sa potvrđenom tuberkulozom, u cilju identifikacije grla koja nisu reagovala na tuberkulinski test. Ipak, autori navode da čak i primenom kombinovanih dijagnostičkih metoda nije bilo moguće identifikovati sva *post mortem* potvrđena inficirana grla.

2.6.4. Ostali pomoćni dijagnostički testovi

Metoda fluorescentne polarizacije (FPA) primenjuje se u veterinarskoj medicini za dijagnostiku različitih zaraznih bolesti. FPA je korisna metoda u monitoringu zaraznih bolesti jer je brza, laka za upotrebu i ima visoku specifičnost i osetljivost. Specifičnost testa kada je korišćen u određivanju statusa zapata kao inficiranog ili neinficiranog bila je 99,9%. Ovo je veoma važno jer se u procesu nadzora i suzbijanja tuberkuloze goveda troši znatan deo vremena i sredstava na praćenje i rešavanje lažno pozitivnih reaktora (Jolley i sar., 2007). Ova metoda našla je primenu u Programu nadzora i eradikacije bruceloze koji su odobreni od strane Ministarstva poljoprivrede SAD, OIE, i regulatornog tela EU. Protein MPB 70 koji luči *M. bovis* i drugi članovi MTB- kompleksa je najznačajniji imunodominantni antigen (Lin i sar., 1996). Ovog proteina nema kod infekcija izazvanih vrstama *Mycobacterium avium* subsp. *avium* ili *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* takođe članovima roda *Mycobacterium* koji imaju epidemiološki značaj. FPA test zasniva se na detekciji antitela protiv *M. bovis* uz upotrebu celovitog molekula MPB 70 ili pomoću polipeptidnog trejsera koji potiče od MPB 70. Sekvenca peptida odgovara određenom redosledu aminokiselina u MPB 70 proteinu (aminokiseline 51-78), pokazujući najveću reaktivnost sa serumom pozitivnih grla, sa C-terminalnim lizinom dodatim da se poboljša rastvorljivost peptida. Trejser (F733), peptid 733 na N-terminalnom kraju obeležen je sa 6-karboksifluorescinom. Pozitivan FPA nalaz je pouzdan pokazatelj izloženosti određene populacije goveda uzročniku tuberkuloze, jer je FPA test specifičan za mikroorganizme iz MTB-kompleksa i ne daje unakrsnu reakciju sa *M. avium* subsp. *avium* ili *M. avium* subsp. *paratuberculosis*. Primenjujući FPA metod za nadzor u 9 različitih zapata goveda (inficiranih i neinficiranih) Jolley i sar., (2007) navode da su pravilno identifikovali

status u osam. Zapat koji je pogrešno naveden kao negativan je bio onaj u koji je infekcija unesena nedugo pre testiranja pa je pretpostavka da ima nisku prevalenciju pozitivnih grla, a neka goveda su u momentu testiranja verovatno bila u ranom stadijumu infekcije i titrom antitela ispod praga detekcije. Kao važnu autori smatraju činjenicu da nijedan zapat nije identifikovan kao lažno pozitivan. Pomoćne dijagnostičke metode koje se koriste da potvrde dijagnozu tuberkuloze su: detekcija specifičnih antitela ELISA testom, multi-antigen print immunoassay (MAPIA) sa upotrebom koktela antigena na nitroceluloznoj membrani, test proliferacije limfocita i test fluorescentne polarizacije. Međutim, upotreba većine ovih testova ostaje ograničena na eksperimentalne uslove ili veoma specifične epizootiološke situacije (de la Rua-Domenech i sar., 2006a).

2.6.5. Bakteriološka kultivacija i izolacija uzročnika

Definitivnu dijagnozu odnosno „zlatni standard“ predstavlja izolacija uzročnika iz kliničkog materijala ili uzoraka uzetih na *post mortem* pregledu. Pri primarnoj izolaciji, *M.bovis* najbolje raste na obogaćenim podlogama, ali rast je spor i kolonije se pojavljuju tek nakon više od 10 dana. To su aerobne ili mikroaerofilne bakterije, koje rastu na 37°C i pokazuju tendenciju končastog rasta u tečnim podlogama. Dodavanje piruvata pospešuje rast *M.bovis*, dok ga prisustvo glicerola u podlozi inhibira (Gormley i sar., 2014). Za izolaciju mikobakterija razvijen je čitav niz različitih medijuma, ali se sve mogu svrstati u tri osnovna tipa: prvi tip su podloge koje u osnovi sadrže jaja (Stonebrink-ova podloga) i Löwenstein–Jensen sa dodatkom piruvata. Drugi tip su podloge zasnovane na agaru, ponekad dodatno obogaćene serumom ili punom krvi, od kojih se najčešće upotrebljava Middlebrook 7H10 i 7H11, ili krvni agar B83. Treći tip podloga su tečne podloge kao npr. Middlebrook 7H9. Za pojavu kolonija *M.bovis* potrebno je nekoliko nedelja inkubacije na čvrstim podlogama. Intenzitet i brzina rasta zavise od vrste medijuma i količine bakterija u uzorku. Da bi se obezbedila maksimalna osetljivost na primarnoj izolaciji kod upotrebe čvrstih podloga, najbolje je koristiti veći broj različitih tipova podloga npr. podloge zasnovane na agaru za brz rast, i Stonebrink ili Löwenstein–Jensen sa dodatkom piruvata, za veću osetljivost i inhibiciju kontaminenata, uz zasejavanje na dve ili više podloga od svake vrste i period inkubacije od najmanje 12 nedelja za sve medijume (Corner i sar., 2012). Poboljšanja u pogledu

skraćivanja vremena potrebnog za izolaciju i povećanje broja uspešnih izolacija učinjena su uvođenjem sistema sa korišćenjem tečnih hranljivih podloga kao što su BACTEC 460, BACTEC MGIT 960 i Versa TREK sistem. U BACTEC 460 sistemu mikobakterije se detektuju radiometrijski, nakon dodavanja obrađenog uzorka u modifikovani Middlebrook 7H9 medijum, koji sadrži ^{14}C obeleženu palmitinsku kiselinu i smešu antibiotika. Porast mikobakterija meri se na osnovu oslobađanja $^{14}\text{CO}_2$ i detektuje na BACTEC 460 instrumentu. U MGIT 960 sistemu senzor koji je ugrađen u silikon na dnu test tube koja sadrži modifikovani Middlebrook 7H9 medijum, beleži narandžastu fluorescenciju koja nastaje usled razmnožavanja mikobakterija. Potpuno automatizovani Versa TREK sistem zasnovan je na merenju i registraciji promene pritiska usled proizvodnje ili potrošnje gasa u test tubi sa tečnim medijumom (Gormley i sar., 2014).

2.6.6. Molekularne metode dijagnostike

Pre pojave i razvoja molekularne dijagnostike identifikacija vrsta mikobakterija vršena je klasičnim bakteriološkim metodama koje su uključivale kombinaciju fenotipskih testova zasnovanih na kulturnim osobinama, kao što su morfološke karakteristike kolonija i stvaranje pigmenta, brzina rasta, optimalna temperatura i seriju biohemijskih testova (Gormley i sar., 2014). Upotreba molekularnih metoda koje su omogućile razlikovanje kliničkih izolata patogenih mikobakterija na nivou genotipa unela je revoluciju u razumevanje procesa prenošenja, širenja i patogeneze tuberkuloze (Barnes i Cave 2003).

U osnovi razvoja metoda molekularne dijagnostike leži ovladavanje tehnikom DNK sekvenciranja i korišćenja ovako dobijenih informacija u različitim procedurama, pomoću kojih se razlikuju pojedine vrste MTB-kompleksa međusobno, ali i različiti sojevi unutar iste vrste. Razvoj različitih metoda zasnovanih na PCR tehnici, radikalno je ubrzao identifikaciju *M.bovis* izolata, a otkriće metoda genotipizacije DNK, omogućilo je dobijanje odgovora na mnoga epidemiološka pitanja koja su do pre 25 godina bila otvorena (Collins 2011). Molekularna tipizacija koristeći se utvrđivanjem određenih genetskih markera, omogućuje traganje za izvorom zaraze, praćenje epidemijskog ili pandemijskog širenja pojedinih specifičnih sojeva, ili doprinosi rasvetljavanju evolucije izvesnih grupa bakterija (Gormley i sar., 2014).

Bez genotipizacije, nemoguće je utvrditi da li se izvor *M.bovis* infekcije u nekom zapatu nalazi unutar samog zapata, među životinjama u susednom zapatu ili je infekcija unešena kupovinom novih goveda ili kontaktom sa različitim divljim životinjama ili inficiranim ljudima. Iz ovih razloga određivanje sojeva metodom genotipizacije ima važnu ulogu u usmeravanju i dizajniranju programa eradikacije tuberkuloze goveda. Na fundamentalnom nivou genotipizacija izolata *M.bovis* koristi se za istraživanje filogenetskog razvoja različitih grupa sojeva, određivanje njihovog evolucionog obrasca, kretanje pojedinih sojeva unutar i izvan granica pojedinih država, njihove lokalne i globalne distribucije. Ovi podaci mogu imati veliki uticaj na međunarodnu trgovinu i formiranje zvaničnih stavova u pogledu kontrole i eradikacije tuberkuloze goveda (Milian-Suazo i sar., 2008).

2.6.6.1. PCR

U poslednje vreme, sve je zastupljenija upotreba različitih metoda koje se zasnivaju na PCR-tehnici, u primarnoj dijagnostici, ali i karakterizaciji različitih vrsta i sojeva mikobakterija. Naročita prednost ove metode povezana je sa brzinom izvođenja testa, jer je za dobijanje rezultata potrebno 1-2 dana, za razliku od klasične bakteriološke kultivacije za koju su potrebne nedelje (Collins 2011). Ipak PCR se do danas nije pokazao superiornim u pogledu osetljivosti, specifičnosti i pouzdanosti u odnosu na bakterijsku kultivaciju, prilikom dijagnostike tuberkuloze kod živih životinja. Uzrok može biti mali broj mikobakterija u kliničkim uzorcima, sporadično izlučivanje, neuspešna ekstrakcija DNK, ili prisustvo PCR inhibitora u uzorcima (de la Rua-Domenech i sar., 2006a). Iako PCR omogućuje mnogo brže postavljanje dijagnoze, negativan rezultat ne isključuje prisustvo infekcije. PCR ima važnu ulogu i u determinaciji i molekularnoj identifikaciji izolata dobijenih bakteriološkom kultivacijom, i kao potvrdna metoda za mikobakterije iz MTB-kompleksa (Collins 2011).

2.6.6.2. Genotipizacija

Metod restriktivne analize endonukleaza, tehnika zasnovana na analizi celokupnog genoma (eng. restriction endonuclease analysis REA) razvijena na Novom Zelandu od strane Collins-a i de Lisle, prva je korišćena za DNK karakterizaciju,

odnosno tipizaciju izolata *M.bovis*. Iako je metoda u početku bila upotrebljavana i u Irskoj za molekularnu diferencijaciju različitih sojeva *M.bovis*, ipak je širu primenu našla samo na Novom Zelandu (Collins 2011).

Tehnike koje se zasnivaju na parcijalnoj analizi genomskih razlika u mnogo su široj upotrebi, a jedna od najšire primenjenih je metoda spoligotipizacije. Spoligotipizacija je PCR metoda koja se koristi za detekciju i tipizaciju bakterija MTB-kompleksa. Metod je zasnovan na DNK polimorfizmu prisutnom u jednom specifičnom hromozomalnom lokusu tzv. direktno ponavljajućem regionu (eng.direct repeat region DR), koji je jedino prisutan kod bakterija iz MTB-kompleksa. DR lokus spada u CRISPR (eng. clustered regularly interspaced short palindromic repeats) familiju sekvenci.

Svaki DR region sastoji se od dva tipa kratkih sekvenci: sekvenci koje su identične i označavaju se sa DR kao i ceo region i sekvenci koje su sve različitog nukleotidnog sastava i nazvane su spejseri (eng.spacers) (Haddad i sar., 2004). DR region sastoji se od multipnih 36 bp DR lokusa, ispresecanih sa jedinstvenim oligonukleotidnim sekvencama koje su nazvane spejseri i imaju dužinu od 25-41 bp. Prisustvo ili odsustvo pojedinih spejsera je karakteristika vrste, odnosno soja i koristi se za njihovo diferenciranje (Gormley i sar., 2014). Spoligotipizacija je široko upotrebljavana PCR blotting tehnika reverzne hibridizacije, pomoću koje se ispituje genetski diverzitet DR lokusa i veoma je pogodna kako za klinička ispitivanja, tako i za izučavanje molekularne epidemiologije, evolucione i populacione genetike (Brudey i sar., 2006). Razlikovanje *M.bovis* od ostalih mikobakterija iz MTB-kompleksa, zasnovano je na varijabilnosti spejser sekvenci u DR regionu *M.bovis* u odnosu na druge članove MTB-kompleksa koji mogu inficirati životinje (Kamerbeek i sar., 1997). U slučaju *M.bovis*, spejseri 3, 9, 16 i 39-43 uvek nedostaju (Haddad i sar.,2004). Spoligotipizacijom se ustanovljava prisustvo ili odsustvo 43 specifične DNK spejser sekvence (eng. DNA spacer sequences) u DR hromozomskom regionu MTB-kompleks bakterija: *Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis*, *M. caprae*, i *M. africanum*. Spoligotipni obrazac je evoluciona karakteristika pojedinačnih sojeva i loza na filogenetskom stablu, i može se koristiti za epidemiološko praćenje (Ruettinger i sar., 2012). Spoligotipni signal dobijen hibridizacijom, moguće je digitalizovati i prevesti u numerički kod (Dale i sar., 2001), što je dovelo do formiranja međunarodnih baza

podataka SpolDB4.0 i Mbovis.org, za identifikaciju spoligotipnih obrazaca izolata bakterija MTB-kompleksa širom sveta. Spoligotipizacija je metoda koja kombinuje tehniku hibridizacije i PCR-a, pomoću kojih je moguće odrediti spoligotipni obrazac svakog pojedinačnog izolata, što zapravo predstavlja utvrđivanje prisustva ili odsustva svake od 43 jedinstvene oligonukleotidne sekvence u direktno ponavljajućim regionima hromozoma (Smith i sar., 2011). Svaki spoligotip dobija jedinstvenu oznaku i biva deponovan u međunarodnoj bazi podataka (www.Mbovis.org). Baza podataka je nastala 2003. godine kao odgovor na potrebu za zvaničnom međunarodnom nomenklaturom spoligotipova, koji dobijaju jedinstvene oznake na osnovu svog specifičnog binarnog koda. U bazi se nalaze podaci za članove MTB-kompleksa kojima nedostaje RD9 (eng.region of difference), što uključuje: *M. africanum*, oryx bacillus, dassie bacillus, *M. microti*, *M. pinnipedii*, *M. caprae*, *M. bovis* i *M. bovis* BCG). Oznaka spoligotipnog obrasca sastoji se od prefiksa SB i kombinacije četiri cifre. Krajem 2013. godine u bazi su bili deponovani podaci o 1660 različitih spoligotipova, uz informacije o geografskom poreklu izolata, datumu izolacije i dr. Implementacija zajedničke nomenklature olakšala je poređenje dobijenih izolata između pojedinih laboratorija, što je od velikog značaja za naučno-istraživački rad (Gormley i sar., 2014). U cilju poboljšanja osetljivosti i diferencijacije različitih sojeva, razvijena je i membrana druge generacije, koja u odnosu na klasičnu koja sadrži 43 oligonukleotidna spejsera, poseduje i 25 dodatnih. Dodatni spejseri unapredili su diferencijaciju *M.bovis* sojeva, ali ne i *M.caprae*, koji pokazuju znatno manju tendenciju varijabilnosti u DR regionu (Javed i sar., 2007).

Spoligotipizacija je molekularna tehnika genotipizacije zasnovana na PCR metodi, koja se danas najviše koristi za diferencijaciju različitih sojeva *M.bovis* izolovanih kod goveda ili drugih životinjskih vrsta (Durr i sar., 2000). Posebne karakteristike spoligotipnih obrazaca odnosno spoligotipni „potpis“ mogu se koristiti kao indikatori izvesnih sojeva ili klastera u okviru *M. tuberculosis*, *M. caprae* i *M. bovis* (Smith 2012).

Za finiju diferencijaciju različitih sojeva *M.bovis* uz spoligotipizaciju paralelno se koristi i analiza visoko polimorfnih VNTR (eng.variable number tandem repeat) lokusa. VNTR tipizacija zasniva se na PCR amplifikaciji ciljnih lokusa pomoću specifičnih parova prajmera, koja je praćena gel-elektroforezom. Radi se ustvari, na

utvrđivanju visoko varijabilnih minisatelitskih ponavljajućih regiona, koji su prisutni na različitim lokacijama u genomu. Rezultat se iskazuje kao brojčani niz koji predstavlja broj ponavljanja u svakom od lokusa. Iako VNTR metoda obezbeđuje mogućnost identifikacije većeg broja varijacija u odnosu na spoligotipizaciju, u praksi se spoligotipizacija pokazala kao pogodnija metoda za analizu globalne rasprostranjenosti sojeva *M.bovis* (Smith i sar., 2011).

Spoligotipizacija iako od velike koristi u identifikaciji *M.caprae* izolata, ne pruža dovoljno mogućnosti za njihovo međusobno razlikovanje, a IS 6110 RFLP je visoko diskriminirajuća metoda pošto *M.caprae* obično poseduju dve do osam IS 6110 kopija, ali je skupa, tehnički veoma zahtevna uz znatan utrošak vremena, a za samo izvođenje su potrebne velike količine DNK (Prodinger i sar., 2005).

Standardna metoda genotipizacije izolata *M. tuberculosis* u humanoj medicini je, analiza polimorfizma dužine restrikcionih fragmenata (eng. restriction-fragment-length polymorphism RFLP) i distribucije insercionih sekvenci IS6110 u različitim sojevima. Sojevi ili vrste mikobakterija koje imaju manje od šest IS6110 insercionih mesta, nemaju dovoljno izražen polimorfizam, pa je u ovim slučajevima za tačnu identifikaciju potrebno primeniti i dodatne metode genotipizacije. Genotipizacija zasnovana na polimorfizmu IS6110 fragmenata, zahteva vreme, jer je neophodno obezbediti dovoljnu količinu DNK uzročnika, što se postiže presejavanjem i kultivacijom izolata na hranljivim podlogama. Genom *M. tuberculosis* sadrži veliki broj mikobakterijskih rasutih ponavljajućih jedinica (eng. mycobacterial interspersed repeat units MIRU), pri čemu neki izolati sadrže identične ponavljajuće jedinice, dok se drugi razlikuju u sekvenci i dužini ovih fragmenata. Najveći broj rasutih ponavljajućih sekvenci nalazi se u intergenskim regionima, za koje se smatra da nemaju nikakvu funkcionalnu ulogu u bakterijskom genomu. MIRU metod genotipizacije zasnovan na PCR tehnici koju prati gel elektroforeza omogućuje da se odredi broj i veličina ponavljajuće jedinice u svakom od 12 pojedinačnih MIRU fragmenata čija veličina varira od 46-101 bp. U svakom od 12 lokusa smešteno je 2-12 alela, što prema matematičkim proračunima daje mogućnost od oko 20 miliona različitih kombinacija. Mogućnost razlikovanja izolata na molekularnom nivou upotrebom MIRU genotipizacije gotovo je identična kao kod metoda genotipizacije zasnovanih na određivanju IS6110 polimorfizma. Prednost je što se MIRU analiza može vršiti automatizovano, čime se omogućuje ispitivanje velikog

broja sojeva, rezultati se dobijaju u elektronskoj formi i lako skladište u kompjuterskim bazama podataka (Supply i sar., 2001). MIRU genotipizacija je tehnički manje zahtevna u odnosu na RFLP i može se primeniti direktno na kulturi mikobakterija, bez prethodne purifikacije DNK, a ukupan broj MIRU-a po genomu je oko 40-50 (Gormley i sar.,2014). MIRU genotipizacija pokazala je odličnu sposobnost razlikovanja (diskriminacije) među pojedinim MTBC izolatima dobijenim od pacijenata širom sveta i u analizama bolničkih i drugih epidemija, međutim za razlikovanje pojedinih sojeva *M. bovis* prednost imaju druge metode zasnovane na ispitivanju promenljivog broja tandem ponavljajućih sekvenci (VNTR) (Prodinger i sar., 2005).

Genotipizacija i molekularna epidemiologija u humanoj medicini imaju veliki značaj u kliničkoj praksi. Rezultati dobijeni primenom molekularnih metoda dijagnostike mogu se koristiti i za dokazivanje laboratorijske kontaminacije kliničkih uzoraka. Prema istraživanjima oko 3% pacijenata kod kojih je navodno izolovan uzročnik tuberkuloze *M. tuberculosis* zapravo nemaju tuberkulozu, nego je pozitivan nalaz posledica unakrsne kontaminacije (Barnes i sar., 2003). Genotipizacija omogućuje razlikovanje pojedinih sojeva u pogledu osetljivosti na određene antituberkulozne lekove, što je bitno za razlučivanje da li se radi o razvoju rezistencije prvobitnog uzročnika, reinfekciji novim sojem ili laboratorijskoj unakrsnoj kontaminaciji. Takođe, metode genotipizacije mogu se koristiti za procenu ponovne pojave tuberkuloze kod ranije dijagnostikovanih slučajeva. Genotipizacija izolata iz obe kliničke epizode i njihovo poređenje pokazuju da li se radi o reaktivaciji ili reinfekciji, što u velikoj meri može uticati na izbor terapijskog protokola, ali i ukazati na moguće uzroke neuspeha prethodnog lečenja.

Rezultati genotipizacije izolata u kombinaciji sa epidemiološkim istraživanjima u slučajevima iznenadne pojave velikog broja inficiranih jedinki, u velikoj meri pomažu da se utvrdi da li se radi o postojanju žarišta infekcije ili o koincidenciji pojave velikog broja različitih slučajeva. Postoji veoma široka genotipska varijabilnost izolata *M.tuberculosis* poreklom od epidemiološki međusobno ne povezanih pacijenata, dok su sa druge strane mikobakterije izolovane iz patološkog materijala pacijenata inficiranih od zajedničkog izvora genotipski identične (Rodwell i sar.,2010). Stoga kada se veći broj slučajeva tuberkuloze pojavi za kratko vreme u vidu klastera, a izolati imaju identične ili usko povezane genotipe, smatra se da je reč o skorašnjim infekcijama

odnosno o pojavi žarišta. Kada se radi o pojavi slučajeva kod kojih postoji jasna razlika u genotipu izolata, najverovatnije je reč o reaktivaciji infekcije stečene u prošlosti (Alland i sar., 1994). Praktična primena molekularnih metoda tipizacije u veterinarskoj medicini, naročito je korisna kod rasvetljavanja puteva širenja *M.bovis* između zapata goveda i uloge divljih životinja kao rezervoara infekcije (Haddad i sar., 2004).

2.7. MOLEKULARNA EPIDEMIOLOGIJA TUBERKULOZE

Molekularna karakterizacija (genotipizacija) bakterija iz MTB-kompleksa dobijenih izolacijom od različitih vrsta životinja može biti od suštinskog značaja za razumevanje dinamike interspecijskog širenja tuberkuloze, kao i rizika za ljude (Moonan i sar., 2009).

Molekularne tehnike genotipizacije, koje omogućuju diferencijaciju izolata na molekularnom nivou, nalaze svoju primenu u utvrđivanju i proučavanju puteva i dinamike širenja tuberkuloze u populaciji goveda, između pojedinih žarišta, kao i između domaćih i divljih životinja i čoveka, pomažući da se ustanovi izvor infekcije (Haddad i sar., 2004), što kao krajni cilj ima kreiranje što efikasnijih programa kontrole i suzbijanja tuberkuloze. Na osnovu istraživanja u oblasti molekularne epidemiologije u humanoj medicini, postalo je evidentno da se dinamika širenja tuberkuloze, veoma razlikuje u pojedinim sredinama i državama. U državama gde pojava beskućništva predstavlja socio-ekonomski problem, prihvatilišta za odrasle su žarišta širenja infekcije. U drugim slučajevima to su bolnice i centri za medicinsku pomoć dok su negde zatvori identifikovani kao mesta posebnog rizika (Alland i sar., 1994; Barnes i sar. 1997). Dugo je preovladavalo mišljenje da su svi sojevi *M. tuberculosis* podjednako virulentni. Međutim, populacijski orijentisanom genotipizacijom, ustanovljeno je da relativno mali procenat sojeva uzrokuje neproporcionalno velik broj infekcija (Barnes i sar., 1997), što je ukazivalo da se određeni sojevi mnogo efikasnije šire u odnosu na druge. Rezultati većeg broja istraživanja, ukazali su da različiti sojevi *M. tuberculosis* imaju sebi svojstvene specifične načine interakcije sa domaćinom, što u velikoj meri utiče na njihov potencijal širenja. Tako najrašireniji sojevi pripadaju tzv. Peking grupi, i uzročnici su epidemija tuberkuloze širom sveta čineći dominantnu familiju sojeva u najvećem delu Azije, Severne Amerike i Evrope (Brudey i sar., 2006). Mikobakterije svrstane u Peking familiju imaju najveći potencijal širenja, lako se šire aerosolom, efikasnije uspostavljaju infekciju i češće progrediraju ka klinički manifestnoj tuberkulozi. Isoniazid-rezistentni sojevi *M. tuberculosis*, slabije su virulentni u odnosu na sojeve osetljive na antituberkulozne lekove, pa tako istraživanja na nivou molekularne epidemiologije sprovedena u Holandiji i San Francisku u SAD, pokazuju da isoniazid-rezistentni sojevi imaju 40-80% slabije izražen potencijal klasterizacije u

odnosu na osetljive sojeve (Garcia-Garcia i sar., 2000). Iako sojevi rezistentni na pojedine ili sve antituberkulozne lekove imaju smanjen potencijal širenja, mora biti prisutna velika opreznost, jer pacijenti inficirani ovim sojevima, dugo ostaju infektivni, a značaj i posledice po javno zdravlje u slučaju tuberkuloze uzrokovane MDR (eng. multi drug resistant) sojevima su mnogo ozbiljnije (Barnes i Cave 2003). Do nedavno je smatrano da imunokompetentne jedinke inficirane vrstom *M.tuberculosis*, nakon preboleivanja, postaju rezistentne na infekciju drugim sojevima. Stoga su pacijenti sa rekurentnim epizodama tuberkuloze tretirani kao da je u pitanju reaktivacija bolesti izazvana prvobitnim uzročnikom. Razvojem molekularne epidemiologije, ovi stavovi su revidirani, jer je nedvosmisleno ustanovljeno, istraživanjima sprovedenim u Južnoj Africi i Evropi da je u 16 do 75% slučajeva ponovljene tuberkuloze uzročnik egzogena reinfekcija a ne reaktivacija (Bandera i sar., 2001). Procenat slučajeva povezanih sa reinfekcijom bio je veći u populacijama sa visokom incidencijom tuberkuloze u kojima je povećan i rizik od izloženosti novoj infekciji. Nemogućnost prirodne infekcije da indukuje dovoljno snažan imunološki odgovor, koji bi prevenirao reinfekciju, delimično može objasniti i relativnu neefikasnost BCG vakcine (Barnes i Cave 2003).

Zato je za uspešnu kontrolu i suzbijanje tuberkuloze od velike važnosti na lokalnom nivou identifikovati rizičnu populaciju kao i žarišta infekcije. Do nedavno u medicinskim krugovima, vladalo je stanovište da je 90% slučajeva tuberkuloze u industrijalizovanim zemljama, posledica u prošlosti stečene infekcije. Međutim, nove metode genotipizacije, daju drugačiju sliku i istraživanja pokazuju da je između 20 i 50% slučajeva tuberkuloze u gradovima zapravo posledica nedavne infekcije (Barnes i sar., 1997). Genetskom analizom svih 50 izolata *M.bovis*, poreklom od tuberkuloznih pacijenata u Velikoj Britaniji u periodu 1997-2000, ustanovljeno je 50 različitih spoligotipova (Gibson i sar., 2004), od čega 15 spoligotipova dotad nije zabeleženo kod goveda. Ovi rezultati upućuju na zaključak, da do infekcije nije došlo nedavno, nego se verovatno radilo o reaktivaciji iz starih lezija, čemu dodatno govori u prilog činjenica da je 72% inficiranih ljudi bilo starije od 50 godina, tako da izolati verovatno predstavljaju spoligotipove koji su tada kružili u zaptima goveda. Na osnovu MIRU tipizacije moguće je razlikovati poreklo uzročnika u pojedinim žarištima tuberkuloze goveda, diferencirati serije izolata dobijene tokom određenog vremenskog perioda u regionima sa endemski prisutnom tuberkulozom, porediti izolate poreklom od ljudi i životinja i

doprineti rasvetljavanju filogenetske pozicije *M.caprae* u odnosu na ostale članove MTBC na evolucionom stablu (Prodinger i sar., 2005). Ispitivanje genetskog polimorfizma, može ukazati na međusobnu povezanost pojedinih izolata, ili je sa druge strane negirati. Tako npr. preliminarni rezultati ispitivanja izvršenih u Španiji, ukazuju da izolati *M.bovis* i *M.caprae* iz različitih životinjskih vrsta, nisu povezani sa MDR sojevima izolovanim kod ljudi. Ovo navodi na zaključak da su rezervoari rezistentnih sojeva *M.bovis* ljudi, a razvoj rezistencije najverovatnije je posledica neadekvatne terapije, najčešće kombinacijom izoniazida i rifampicina (Romero i sar., 2007)

Glavne prepreke široj upotrebi molekularnih metoda genotipizacije su složenost samih metoda zasnovanih na *IS6110* ispitivanju, dug vremenski period potreban za dobijanje rezultata i velike troškove. Ipak MIRU analiza je najverovatniji kandidat za široku upotrebu u budućnosti jer pomoću nje mogu da se identifikuju i diferenciraju klaster slučajevi tuberkuloze u žarištima već nekoliko dana po dobijanju pozitivnog rezultata na bojenju po Ziehl-Nielseenu ili kultivacije mikobakterija (Barnes i Cave, 2003).

Molekularna tipizacija uzročnika tuberkuloze goveda, u Velikoj Britaniji verovatno je najsvеobuhvatnije urađena u odnosu na bilo koji drugi patogen bilo gde u svetu. Nacionalna laboratorija u Vejbridžu, poseduje podatke o spoligotipizaciji 56000 izolata od kojih je 41000 genotipizovana i VNTR metodom (Smith i sar., 2011). Na osnovu analize podataka, zaključeno je da se populacija mikroorganizama u Velikoj Britaniji, sastoji od malog broja međusobno povezanih genotipova, koji su veoma retko ustanovljeni u kontinentalnom delu Evrope. Nasuprot tome, sojevi prisutni u kontinentalnom delu Evrope nikada nisu ustanovljeni u Velikoj Britaniji. Gotovo 99% izolata *M.bovis* u Velikoj Britaniji pripada istom klonalnom kompleksu, kome nedostaje 11. spejser u spoligotipnom obrascu i ima specifičan gubitak dela hromozomalne DNK označen kao RDEu1 po čemu je i dobio oznaku Europe1(Eu1), i redak je u ostalim delovima Evrope. Eu1 klonalni kompleks *M.bovis*, ima globalni značaj budući da je dominantan u velikom broju država na različitim kontinentima, kao što su SAD, Australija, Argentina, Novi Zeland, Južna Koreja, Kanada. U centralnoj i Zapadnoj Africi većina izolovanih sojeva pripada klonalnom kompleksu koji je označen kao Afrika 1 (Af1), a karakteriše ga nedostatak spejsera 30. U Istočnoj Africi najrasprostranjeniji je klonalni kompleks označen kao Afrika 2, a prisutni su i drugi kao

recimo Afrika 5 itd. Ekspanzija pojedinih klonalnih kompleksa, može biti povezana sa selektivnim pritiskom i boljom adaptacijom na pojedine vrste bovida, budući da u Istočnoj Africi dominira Bos Indicus (zebu, azijsko goveče), dok je u Zapadnoj Africi široko rasprostranjeno evropsko goveče Bos taurus. Sojevi koji pripadaju ovom klonalnom kompleksu retko se sreću u drugim delovima kontinenta. Međutim, kada je u tipizaciju uključen i VNTR metod ustanovljeno je da svaki region ima posebnu populaciju *M.bovis* mikroorganizama, pa je skoro 60% lokalnih izolata imalo jedinstvenu genetsku građu (Brudey i sar., 2006). Precizna dijagnostika i molekularna identifikacija i determinacija uzročnika *M.bovis/M.caprae* predstavlja ključ za razumevanje porekla infekcije, načina širenja i utiče na kreiranje programa kontrole i eradikacije oboljenja u populaciji goveda i drugih domaćih i divljih životinja (Gormley i sar. 2014).

Sekvenciranje čitavog genoma, sada je relativno jeftina i dostupna tehnika, pa će filogenetske analize i proučavanje molekularne epidemiologije i epizootiologije dobijenih izolata u bliskoj budućnosti biti na tome zasnovani, čime će biti obezbeđene pouzdane informacije o filogenetskoj povezanosti sojeva i načinima prenošenja i širenja infekcije (Rodriguez-Campos i sar., 2014).

3. CILJ I ZADACI RADA

Tuberkuloza goveda najčešće protiče u hroničnom toku i dugo ostaje skrivena, sa slabo izraženim ili nespecifičnim kliničkim znacima. Međutim, za sve to vreme inficirane jedinke rasejavaju mikobakterije u spoljašnju sredinu i predstavljaju izvor zaraze kako za druge životinje tako i čoveka. Iako se tuberkuloza goveda sistematski suzbija u većini razvijenih država gotovo ceo jedan vek, pokazalo se da je veoma teško potpuno iskoreniti oboljenje, a najnoviji podaci ukazuju na porast prevalencije inficiranih zapata goveda u Evropskoj Uniji, kako u državama zvanično slobodnim od tuberkuloze, tako i u onim u kojima je program eradikacije u toku. U Srbiji na nivou nacionalnog zapata goveda tuberkuloza ima malu prevalenciju, i relativno se retko dijagnostikuju pozitivna grla. Izuzetak su nekoliko žarišta u Južnobačkom okrugu u kojima je tuberkuloza u populaciji goveda enzootski prisutna, sa prevalencijom koja je na početku sprovođenja mera suzbijanja iznosila i do 15%, od ukupno ispitanih grla.

Ciljevi ove doktorske disertacije su obuhvatili izolaciju, bakteriološku identifikaciju i molekularnu karakterizaciju *Mycobacterium tuberculosis* kompleks bakterija uzročnika tuberkuloze goveda u Vojvodini. Pored toga, cilj je bio i utvrđivanje osetljivosti izolovanih sojeva na odabrane antituberkulozne antibiotike koji se koriste u terapiji tuberkuloze ljudi u našoj zemlji, kao i uporedno ispitivanje osetljivosti i specifičnosti γ -IFN testa u dijagnostici tuberkuloze sa klasičnim mikrobiološkim metodama izolacije i identifikacije uzročnika. Na osnovu podataka o raznolikosti klastera odnosno sojeva koji su prisutni u našoj zemlji utvrdiće se i međusobna veza sa sojevima i genotipovima klasifikovanim na osnovu molekularnih karakteristika u susednim zemljama i Evropi. Na osnovu dobijenih podataka uradiće se epizootiološke karte sa utvrđenom incidencijom i prevalencijom oboljenja kod goveda u Vojvodini.

Za ostvarenje postavljenih ciljeva ove doktorske disertacije definisani su sledeći zadaci:

1. Da se izvrši izolacija, identifikacija i molekularna karakterizacija uzročnika tuberkuloze goveda u Vojvodini.
2. Da se utvrdi osetljivost izolovanih sojeva na antituberkulotike (etambutol, streptomycin, rifampicin, izoniazid) koji se koriste za terapiju ljudi u našoj zemlji.

3. Da se izvrši uporedno ispitivanje osetljivosti i specifičnosti γ -IFN testa u odnosu na komparativni intradermalni tuberkulinski test i druge klasične metode dijagnostike tuberkuloze.
4. Da se izradi epizootiološka karta sa utvrđenom incidencijom i prevalencijom oboljenja u Vojvodini.

4. MATERIJAL I METODE

4.1. MATERIJAL

Za ispitivanja su korišćeni sledeći materijali:

- 1) Goveda- 71 životinja iz 25 gazdinstava u Vojvodini (lociranih u Južnobačkom i Sremskom okrugu), većinom ženskog pola, različite starosti, ali ne mlađa od 12 meseci, pretežno domaće šareno goveče u tipu simentalca. Izabrana grla su prilikom tuberkulinizacije, sprovedene od strane nadležne veterinarske službe, pokazala sumnjivu ili pozitivnu reakciju na tuberkulin B.
- 2) Uzorci pune krvi sa heparinom kao antikoagulansom, ukupno 71 uzorak. Uzorci krvi su uzeti aseptičnom punkcijom *v.jugularis* i transportovani u laboratoriju u roku 6-8 časova od uzorkovanja.
- 3) Uzorci tkiva 49 goveda koja su bila pozitivna na komparativnom intradermalnom tuberkulinskom testu i/ili prilikom izvođenja gama interferon testa. Goveda su poticala iz zapata lociranih u 4 opštine Južnobačkog okruga i dve opštine u Sremskom okrugu. Nakon klanja uzorkovani su limfni čvorovi, kao i delovi plućnog parenhima na kojima su uočene promene. Uzorci su čuvani na temperaturi frižidera (4-8°C) i u roku od 24-48h dostavljeni u laboratoriju Instituta za plućne bolesti u Sremskoj Kamenici. Kod goveda kod kojih prilikom patomorfološkog pregleda nisu ustanovljene makroskopski vidljive promene, uzorkovani su retrofaringealni, medijastinalni, cervikalni i bronhijalni limfni čvorovi.
- 4) Tuberkulin B PPD (sadrži 30000IU prečišćenog tuberkuloproteina u 1ml-jačina minimum 3000ij/doza) (*Veterinarski Zavod Zemun*)
- 5) Tuberkulin A (sadrži 20000IU tuberkuloproteina ptičijeg tipa u 1ml-jačina minimum 2000IJ/doza) (*Veterinarski Zavod Zemun*)
- 6) Kutimer i makaze
- 7) Bovigam-gama interferon set kit za goveda (*Prionics, Švajcarska*):
komponenta 1-mikrotitar ploča sa 24 bazenčića čije je dno prekriveno antitelima specifičnim za goveđi gama interferon
komponenta 2- liofilizovana pozitivna kontrola
komponenta 3- liofilizovana negativna kontrola

- komponenta 4- zeleni plazma puferizovani rastvarač
- komponenta 5- pufer za ispiranje 20x koncentrovan
- komponenta 6- antitela protiv goveđeg γ -interferona konjugovana enzimom
- komponenta 7a- plavi rasvarač, puferizovani rastvarač konjugata 5x koncentrovan
- komponenta 7b- plavi rastvarač, puferizovani rastvarač konjugata
- komponenta 8- puferizovani rastvor enzima
- komponenta 9-hromogeni rastvor, 100x koncentrovan
- komponenta 10-rastvor za zaustavljanje dejstva enzima
- 8) Bovigam Bovine PPD
 - 9) Bovigam Avian PPD
 - 10) Podloge po *Löwenstein-Jensenu*
 - 11) izonijazid (H) (*Sigma Chemicals Co., USA*)
 - 12) rifampicin(R) (*Sigma Chemicals Co., USA*)
 - 13) etambutol (E) (*Sigma Chemicals Co., USA*)
 - 14) streptomycin (S) (*Sigma Chemicals Co., USA*)
 - 15) 2% NaOH
 - 16) 1% hlorovodonična kiselina
 - 17) Karbol fuksin
 - 18) Fenol ftalein
 - 19) 3% kiseli alkohol
 - 20) 10% puferizovani formalin
 - 21) Hematoksilin i eozin boja (*Sigma-Aldrich*)
 - 22) parafin
 - 23) Pozitivna kontrola 1. (*M. tuberculosis* soj H37Rv)
 - 24) Pozitivna kontrola 2. (*M. bovis* BCG P3)
 - 25) Oligonukleotidni prajmeri za PCR amplifikaciju (*Isogen Bioscience BV, Maarsen, Holandija*)
- prajmer Dra (biotinizovan) sekvenca GGTTTTGGGTCTGACGAC
- prajmer DRb sekvenca CCGAGAGGGGACGGAAAC
- 26) Spoligo-membrana (*Isogen Bioscience BV, Maarsen, Holandija*)
 - 27) ECL reagensi za detekciju (*Amersham Biosciences USA*)
 - 28) Rentgen filmovi (*Amersham Biosciences, USA*)

- 29) 20x SSPE (*Gibco BRL Life Technologies Inc.*)
- 30) SDS visokoprečišćeni (*BDH Laboratory Supplies*)
- 31) Super Taq DNK polimeraza (*HT Biotechnology Ltd., Cambridge, UK*)
- 32) Streptavidin-POD-konjugat (*Boehringer, Nemačka*)
- 33) Dejonizovana voda
- 34) Tris-EDTA pufer (*Sigma*)
- 35) Automatske višekanalne i jednokanalne mikropipete varijabilnog volumena (*Eppendorf, Nemačka*)
- 36) Miniblotter 45 (*Immunetics Cambridge MA 02139*)
- 37) PCR-aparat-termocikler ("*Eppendorf*")
- 38) Spektrofotometar Multiscan MCC 340
- 39) Laminar ("*Angelantoni, Italija*")
- 40) Centrifuga 5702 ("*Eppendorf*")
- 41) Šejker REAX top ("*Heidolph*")
- 42) Termostat ("*Sutjeska*")
- 43) Mikrotom
- 44) Mikroskop ("*Olympus*")
- 45) Godišnji epizootiološki izveštaji i drugi epizootiološki podaci dobijeni od Veterinarskih specijalističkih instituta "Zrenjanin", "Pančevo", "Sombor", "Subotica" i Naučnog instituta za veterinarstvo "Novi Sad"
- 46) Terenski epizootiološki zapisnici
- 47) Zapisnici Republičke veterinarske inspekcije
- 48) Izveštaj Odseka za obeležavanje i registraciju životinja-Uprava za veterinu Ministarstva poljoprivrede i zaštite životne sredine

Sav materijal neophodan za izvođenje spoligotipizacije obezbeđen je zahvaljujući ljubaznosti prof. dr Wolfgang-a Prodinger-a sa Medicinskog fakulteta u Innsbuku, Austrija, Katedra za mikrobiologiju, higijenu i socijalnu medicinu, (Dept. für Hygiene, Mikrobiologie und Sozialmedizin Sektion Hygiene und Medizinische Mikrobiologie Medizinische Universität Innsbruck) u čijoj laboratoriji su ispitivanja i izvršena.

4.2. METODE

4.2.1. Tuberkulinizacija

Dijagnostička metoda komparativne intradermalne tuberkulinizacije (retuberkulinizacija) uz simultano aplikovanje tuberkulina B i tuberkulina A, vršena je u terenskim uslovima, odnosno na gazdinstvima na kojima su goveda uzgajana. Sva goveda podvrgnuta retuberkulinizaciji su prilikom tuberkulinizacije, sprovedene od strane nadležne veterinarske službe, pokazala sumnjivu ili pozitivnu reakciju na tuberkulin B. Između prethodno izvršene tuberkulinizacije i retuberkulinizacije kod svih životinja proteklo je minimalno 50, a maksimalno 70 dana.

Postupak:

Tuberkulin B aplikovan je sa leve strane vrata, za oko širinu šake ispred lopatice i 10-tak centimetara ispod dorzalne linije vrata. Mesto aplikacije površine oko 5-6 kvadratnih centimetara je pripremljeno šišanjem makazama, bez dezinfekcije. Pri izboru mesta aplikacije vodilo se računa, da ne postoje ozlede, kraste ili druge promene na koži. Pre aplikacije tuberkulina, kutimetrom je izmerena debljina kožnog nabora sa preciznošću od 0,5 mm, što je beleženo u odgovarajuću tuberkulinsku listu. Ubrizgavanje tuberkulina u kožu vršeno je u sredinu pripremljenog polja, lagano, pomoću insulinskog šprica i igle u količini od 0,1 ml. Provera uspešnosti aplikacije rađena je palpacijom, pri čemu je prisustvo malog difuznog čvora veličine do zrna pirinča smatrano za adekvatno izvedenu tuberkulinizaciju. Tuberkulin A aplikovan je na opisani način sa desne strane vrata. Očitavanje reakcije vršeno je po isteku 72 ± 6 časova. Prilikom očitavanja merena je debljina kožnog nabora, i vršena procena kvaliteta eventualno prisutnog otoka adspekcijom i palpacijom. Takođe palpирani su i preskapularni limfni čvorovi sa obe strane i vršeno poređenje njihove veličine, konzistencije i pokretljivosti. Reakcije su procenjivane prema sledećim kriterijumima: Pozitivna reakcija: ako je zadebljanje kožnog nabora na mestu aplikacije tuberkulina B veće od 4 mm, a pozitivna reakcija na goveđi tuberkulin je za više od 4 mm veća u odnosu na reakciju na avijarni tuberkulin i/ili je prisutan otok na mestu aplikacije tuberkulina B difuzan, temperiran i testaste konzistencije, bolan, sa ili bez nekroze sa eksudacijom. Preskapularni limfni čvor sa leve strane sa inflamatornom reakcijom.

Sumnjiva reakcija: ako je pozitivna ili sumnjiva reakcija (2-4mm) na goveđi tuberkulin, veća od reakcije na avijarni tuberkulin za 1-4mm, a nisu prisutni opisani klinički znaci.

Nespecifična- kada je zadebljanje kožnog nabora na mestu aplikacije avijarnog tuberkulina veće za 4 i više mm od zadebljanja na mestu aplikacije tuberkulina B, koje je manje od 4mm.

Negativna reakcija- ako je zadebljanje kožnog nabora na mestu aplikacije tuberkulina B manje od 4 mm, i manje je od zadebljanja na mestu aplikacije tuberkulina A. Prisutan otok je ograničen, tvrd, bezbolan i netemperiran.

4.2.2. Patomorfološki pregled

Patomorfološki pregled trupova 60 tuberkulin pozitivnih goveda, poslatih na sanitarno klanje izvršen je u četiri klanice koje su tokom perioda istraživanja bile određene od strane Uprave za veterinu, Ministarstva poljoprivrede, vodoprivrede i šumarstva, za prijem ovih grla. Patomorfološki pregled jednog uginulog goveda izvršen je u terenskim uslovima, neposredno pored jame grobnice.

Prilikom pregleda trupova i organa zaklanih goveda, tražene su promene karakteristične za tuberkulozu. U slučaju postojanja promena, limfni čvorovi su aseptično odvajani od okolnog tkiva u celini, a delovi organa, su odsecani sa marginom od 5 cm zdravog tkiva oko promene. Cilj aseptičnog uzimanja uzoraka je da se spreči ili znatno redukuje mogućnost kontaminacije tkiva fecesom, zemljom i drugim nečistoćama koje mogu sadržati atipične mikobakterije ili druge mikroorganizme, koji pri kultivaciji mogu prerasti i otežeti ili onemogućiti izolaciju uzročnika tuberkuloze. Ovako uzeti uzorci pakovani su u sterilne plastične vreće i transportovani u prosekturu NIV“Novi Sad“ za dalju obradu. Ukoliko promene nisu bile odmah vidljive, vršeno je zasecanje i pregled presečenih površina tkiva. Patomorfološki pregled trupova i organa izvršen je detaljno, metodom adspekcije, palpacije i zasecanjem, a obuhvatao je sledeće limfne čvorove i organe:

Glava- limfni čvorovi sa leve i desne strane: submandibularni, parotidni, medijalni i lateralni retrofaringealni i tonzile

Grudna duplja- kaudalni i kranijalni medijastinalni limfni čvorovi, traheobronhijalni limfni čvorovi u levom i desnom plućnom krilu. Plućno tkivo.

Abdominalna duplja- jetra i hepatični limfni čvor, slezina, mezenterijalni limfni čvorovi čitavom dužinom gastrointestinalnog trakta, bubrezi sa pripadajućim limfnim čvorovima.

Trupovi- na obe polovine trupa pregledani su sledeći limfni čvorovi: cervikalni, preskapularni, subilijačni, unutrašnji ilijačni, medijalni ilijačni, duboki ingvinalni, išijadični i supramamarni.

Nalaz makroskopski vidljivih lezija u obliku fokalno prisutnih tuberkula odnosno granulomatoznog inflamatornog bujanja različitog prečnika, uvećanje limfnih čvorova praćeno kazeoznom nekrozom i kalcifikacijom, sa ili bez fibrozne inkapsulacije, smatrano je pozitivnim nalazom.

4.2.3. Patohistološki pregled

Uzorci limfnih čvorova i pluća veličine 2x1x0,5 cm za histopatološka ispitivanja su fiksirani u 10% neutralnom formalinu u trajanju od 48 - 72 časa. Posle fiksacije tkivo je obrađivano u automatskom tkivnom procesoru (dehidracija kroz seriju alkohola, prosvetljavanje u ksilolu, impregnacija parafinom) i uklopljeno u parafinske blokove. Parafinski isecci dobijeni sečenjem u mikrotomu, debljine 3 do 5µm bojeni su hematoksilin-eozinom (HE) i posmatrani pod mikroskopom. Ispitivanja su vršena u laboratoriji za patološku morfologiju Departmana za veterinarsku medicinu, Poljoprivradnog fakulteta u Novom Sadu i laboratoriji za patološku morfologiju Naučnog Instituta za veterinarstvo“Srbija“ u Beogradu.

4.2.4. Izolacija i bakteriološka identifikacija mikobakterija

Od ukupno 49 zaklanih i uginulih goveda uzorkovan je materijal (limfni čvorovi i delovi plućnog tkiva) za bakteriološku izolaciju. Uzorci su čuvani na temperaturi frižidera (4-8°C) i u roku od 24-48h dostavljeni u Laboratoriju za mikobakterije Instituta za plućne bolesti Vojvodine u Sremskoj Kamenici.

Za izolaciju mikobakterija iz uzoraka primenjeno je standardno-kulturelno ispitivanje mikobakterija(1).

Pre zasejavanja uzorci-delovi organa (oko 5 grama) su sterilnim makazama sitno izrezani i usitnjeni u tarioniku. Nakon toga su u cilju dekontaminacije obrađivani sa 2% natrijum hidroksidom u toku 15 minuta, i centrifugirani 15 minuta na 3000xg. Dobijeni

sediment je neutralizovan sa 1% hlorovodoničnom kiselinom u prisustvu fenol ftaleina kao indikatora, i zasejavan na dve Lowenstein- Jensen podloge (LJ). Podloge su inkubirane na 37°C i posmatrane jednom nedeljno u toku tri meseca. Registrovano je vreme pojave prvih vidljivih kolonija (1,2)

Obrađeni uzorci su pregledani i na prisustvo acidorezistentnih bacila (ARB) mikroskopskim pregledom obojenog razmaza po Ziehl-Neelsenu (Z-N). Ukratko, preparat je fiksiran prevlačenjem preko plamena, mikroskopska pločica je potom prelivena karbol fuksinom i zagrevana par minuta do pojave pare. Preparat je potom ispran vodom, a za odbojavanje je korišćen 3% kiseli alkohol. Po odbojavanju, preparat je prelišen kontrastnom bojom, metilenskim plavim u trajanju 30 sekundi. Posle toga preparati su isprani i osušeni. (1)

Izolovane mikobakterije su identifikovane do nivoa vrste primenom standardnih biohemijskih testova. (3)

Biohemijska identifikacija je rutinski uključivala sekreciju i nakupljanje niacina, redukciju nitrata, testove hidrolize Tween- 80 posle 3 i 10 dana, prisutnost aril sulfataze posle 3 i 14 dana i aktivnost semikvantitativne katalaze.

1.Koneman EW,Allen SD,Janda WM,Schreckenberger PC, Win WC.Color atlas and text book of diagnostic microbiology.5th ed.Philadelphia:Lippincott;1997.p.893-952

2.Savić B,Vuković D,Stefanović G, Vukelić A,Tomić Lj,Kurucin T.Vodič za mikrobiološku dijagnostiku tuberkuloze. Ministarstvo zdravlja Republike Srbije, Beograd, 2007.

3.Vitebsky FG,Kruczak-Filipov P.Identification of mycobacteria by conventional methods.Clin Lab Med 1996;16:569-601

4.2.5. Ispitivanje osetljivosti izolata na antituberkulotike

Za ispitivanje osetljivosti izolovanih sojeva mikobakterija na antituberkulotike primenjen je standardizovani metod proporcija (4). Ovaj metod smatra se „zlatnim standardom“. Osetljivost izolovanih sojeva ispitana je na kritične koncentracije antimikrobnih sredstava: izonijazid (H) 0,2 µg/ml, rifampicin(R) 40,0 µg/ml, etambutol (E) 2,0 µg/ml i streptomycin (S) 4,0 µg/ml podloge. Rezultati testa osetljivosti izdavani su nakon inkubacije od 4 nedelje na 37°C. Zavisno od porasta ispitivanog soja na podlozi sa inkorporisanim antimikrobnim sredstvom u poređenju sa porastom soja na

kontrolnim podlogama bez antituberkulotika soj je klasifikovan u dve terapijske kategorije: osetljiv (S) i rezistentan (R).

4.Schwoebel V,Lambregts-van Weezenbak CS,moro MI, Drobniowski F,Hoffner SE, Raviglione MC.Standardization of antituberculosis drug resistance surveillance in Europe. EUR Respir J.2000;16(2):364-71.

4.2.6. Ekstrakcija i priprema DNK

Genomska DNK za izvođenje PCR metode dobijena je tako što su dva puta vrhom eze pokupljene izolovane mikobakterije sa podloge po Levenštajn-Jensenu, prenete u Eppendorf mikrotube i resuspendovane u 200 µl 1xTris-EDTA pufera. Ovako pripremljene bakterije inkubirane su 15 minuta na temperaturi od 90°C. Minitube sa suspenzijom su nakon toga centrifugirane na 13000 rpm 2 minuta. Posle odbacivanja supernatanta, zaostali talog je resuspendovan u 500 µl 150mM NaCl. Ovaj postupak je ponovljen dva puta. Konačno dobijeni talog resuspendovan je u 25 µl 1xTris-EDTA za dalje ispitivanje.

4.2.7. Spoligotipizacija

Metod spoligotipizacije zasniva se na PCR amplifikaciji DR (direct repeat) lokusa i njihovoj hibridizaciji sa membranom koja sadrži set od 43 kovalentno vezana oligonukleotida (eng. spacer sequences) koji potiču od *M. tuberculosis* referentnog soja H37Rv (37spejsera) i *M. bovis* BCG soja P3 (6 spejsera). Razlike u spoligotipnom obrascu najčešće su posledica delecije direktno ponavljajućih varijabilnih sekvenci (eng. direct variable repeats) u DR regionu bakterijske DNK.

Priprema membrane:

Oligonukleotidne sekvence sadržane na membrani dobijene su od DNK sekvenci DR regiona sojeva *M.tuberculosis* H37Rv i *M.bovis* BCG P3. Sve spejser-olinukleotidne sekvence su spojene sa 5' terminalnom aminogrupom, pomoću koje se mogu kovalentno vezati za aktiviranu negativno punjenu membranu. Amplifikacija spejsera postiže se upotrebom prajmera DRa i DRb, koji omogućavaju amplifikaciju celokupnog DR regiona. PCR produkti su obeleženi biotinom, jer je DRa prajmer biotinizovan.

Postupak:

1) DNK uzorci su rastvoreni do tražene koncentracije. Kao pozitivna kontrola korišćena je hromozomalna DNK *M. tuberculosis* soj *H37Rv* i *M. bovis BCG P3*. Kao negativna kontrola korišćena je voda.

2) Priprema reakcione mešavine :

0,2 µl primer DRa (20 pmol)

0,2 µl primer DRb (20 pmol)

2,5 µl dNTP-mixture (2.5 mM svaki dNTP, konačna konc. 0.2 mM svaki dNTP)

2,5 µl 10x koncentrovani Super Tth pufer

0,25 µl Super Tth polymerase (5 units/µl)

33-x µl MQ voda (do ukupnog volumena of 50 µl)

Priprema reakcione smeše (tzv. master mix) vršena je u posebnoj laboratoriji bez prisustva ispitivanih uzoraka DNK.

3) Od ovako pripremljene "master" smeše uzeto je 23 µl i ubačeno u ependorf mikrotubu zajedno sa 2 µl ispitivane DNK (10ng), čemu je dodata 1 kap mineralnog ulja.

4) Mikrotube su uložene u PCR-aparat za amplifikaciju uz izvođenje sledećih temperaturnih ciklusa:

3 min 96°C

1 min 96°C

1 min 55 °C 35x

30 sec 72 °C

5 min 72 °C

PCR hibridizacija i detekcija

Izvršena je hibridizacija PCR produkata markiranih biotinom na pričvršćene oligo-spejsere poznate sekvence. Prisustvo spejsera nakon inkubacije sa streptavidin-peroksidazom uočava se na film plastici u vidu crnih kvadratića.

Postupak:

1) Prethodno zagrejani koncentrovani puferi pripremljeni su za rad razređivanjem demineralizovanom vodom na sledeći način:

50 ml 2xSSPE/0.1% + 2,5 ml 20%SDS, 60°C, (WB1)

50 ml 2xSSPE/0.5% + 12,5 ml 20%SDS, 60°C, (WB2)

50 ml 2xSSPE/0.5% + 12,5 ml 20%SDS, 42°C, (WB3)

50 ml 2xSSPE, sobna temperatura, (WB4)

- 2) 20 µl PCR produkata uneto je u 150 µl WB1
- 3) Izvršena je denaturacija rastvorenih PCR produkata na temperaturi od 99°C u trajanju od 15 minuta, posle čega je odmah izvršeno hlađenje velikom količinom suvog leda.
- 4) Pranje membrane 2x10 minuta na temperaturi od 60°C u rastvoru WB1 uz mućkanje
- 5) Postavljanje membrane sa uloškom u minibloter, tako da se prorezi (eng. slots) odnosno rovovi miniblotera nalaze vertikalno u odnosu na položaj nanesenih oligonukleotida
- 6) Uklanjanje rezidualne tečnosti sa proreza miniblotera aspiracijom-ovaj postupak je od velikog značaja
- 7) Ispunjavanje rovova sa 140 µl razređenog produkta (mora biti urađeno bez stvaranja mehurića vazduha) i hibridizacija 60 minuta na 60°C na horizontalnoj površini bez trešenja. Poslednji kanal (rov) punjen je puferom.
- 8) Uklanjanje uzoraka iz miniblotera aspiracijom i vađenje membrane pomoću pincete
- 9) Pranje membrane 2x u rastvoru WB2 u trajanju od 10 minuta na temperaturi od 60°C
- 10) Postavljanje membrane na oblu bocu, namotane na način koji obezbeđuje da se spoligotipi nalaze sa unutrašnje strane, uz istovremeno hlađenje
- 11) Dodavanje 5 µl streptavidin-peroksidaza konjugata (500U/ml) u 15 ml WB3 rastvora i inkubiranje membrane u ovom rastvoru u obloj boci (eng. rolling bottle) 60 minuta na 42°C. Konjugat je sipan kroz sredinu do dna boce, tako da ne kvasi membranu
- 12) Pranje membrane 2x u trajanju po 10 minuta na temperaturi od 42°C u WB3 rastvoru
- 13) Pranje membrane 2x po 5 minuta na sobnoj temperaturi u rastvoru WB 4
- 14) Inkubiranje membrane u ECL rastvoru za detekciju luminescencije 30 sekundi u rasvoru za detekciju 1 i 1 minut u rastvoru za detekciju 2

15) Prekrivanje membrane plastičnom folijom i izlaganje svetloosetljivom filmu 20 minuta

4.2.8. *Mycobacterium bovis* γ - Interferon test

Postupak izvođenja ispitivanja:

Neposredno pre izvođenja komparativnog intradermalnog tuberkulinskog testa uzeti su uzorci krvi od goveda koja su prilikom tuberkulinizacije, sprovedene od strane nadležne terenske veterinarske službe, pokazala sumnjivu ili pozitivnu reakciju na tuberkulin B. Od prethodne tuberkulinizacije proteklo je najmanje 50 dana. Krv je uzorkovana u vakumete sa dodatkom litijum-heparina u količini od 5-7 ml, aseptičnom punkcijom *v.jugularis*. Uzorci su čuvani na temperaturi 18-25°C i transportovani u roku 6-8 časova od uzorkovanja u laboratoriju za serologiju Naučnog instituta za veterinarstvo „Novi Sad” .

U mikrotitar ploču sa ravnim dnom, odliveno je za svaki uzorak u 3 udubljenja (bunarčića) po 1,5 ml krvi sa heparinom, pri čemu je u prvo udubljenje dodato 100 μ l avijarnog PPD tuberkulina, u drugo 100 μ l bovinog PPD tuberkulina a u treći bunarčić dodato je 100 μ l PBS-a. Nakon poklapanja bunarčića, mikrotitar ploča je odložena u termostat na inkubiranje pri temperaturu od 37°C u trajanju od 24h. Posle inkubacije i centrifugiranja mikrotitar ploče, pažljivo je mikropipetom odliveno oko 500 μ l plazme koja je prebačena u endorf mikrotube, spremna za izvođenje ELISA testa. Posle otapanja i rekonstitucije liofilizovanih reagenasa, u svih 24 bunarčića koji sadrže konjugat antitela na dnu, dodato je po 50 μ l zelenog razređivača (Green diluent). Za svaki uzorak određena su 3 udubljenja u koja je prethodno već nasut zeleni razređivač, a zatim je dodato sledeće: u prvo udubljenje 50 μ l uzorka plazme u koji je na punu krv dodat PBS, u drugo udubljenje 50 μ l uzorka plazme u koji je na punu krv dodat avijarni PPD u treće udubljenje 50 μ l uzorka plazme u koji je na punu krv dodat bovini PPD. Ovako pripremljeni uzorci inkubirani su u termostatu 1^h na sobnoj temperaturi 24^oC. Posle inkubacije, bunarčići su isprani 6 puta sa 200 μ l prethodno pripremljene Wash solucije (potrebna količina broj udubljenja X 2.7 ml), a zatim prosušeni na papirnoj vati. Posle sušenja u sva udubljenja je dodato 100 μ l prethodno pripremljenog konjugata, što je postignuto razređivanjem koncentrovanog konjugata sa plavim razređivačem (Blue diluent) u razmeri 1:100 (1+99). Ploča je prekrivena folijom i inkubirana u termostatu 1

h na temperaturi od 24 °C. Po završenoj inkubaciji svi bunarčići su isprani 6X200 µl sa prethodno pripremljenim rastvorom za ispiranje (eng. Wash solution), a zatim prosušeni na papirnoj vati. U sva udubljenja dodato je 100 µl sveže pripremljenog enzimskog substrata –(hromogen), koji je pripremljen tako što je koncentrovani substrat razređen razređivačem substrata u razmeri 1:100 (1+99). Posle inkubacije u termostatu u režimu bez svetlosti, koja je trajala 30 minuta na temperaturi 24°C, u sva udubljenja dodato je po 50 µl Stop rastvora. Rezultat je očitavan na spektrofotometru uz upotrebu filtera od 450 nm. Pre interpretacije dobijenih rezultata ispitivanih uzoraka, izvršena je validacija reakcije na pozitivnoj i negativnoj kontroli, po sledećoj formuli: negativni bovini IFN γ kontrola <0.130

pozitivna bovini IFN γ kontrola <0.700

Izračunavanje rezultata ispitivanih uzoraka krvne plazme, vršeno je po sledećoj formuli:

POZITIVNO

OD PPDB – OD PBS \geq 0.1 i OD PPDB - OD PPD A \geq 0.1

NEGATIVNO

OD PPDB – OD PBS < 0.1 ili OD PPDB - OD PPD A < 0.1

Za sumnjive reakcije, kod kojih je potrebno ponoviti testiranje kako bi se smanjila mogućnost pojave lažno negativnih rezultata smatrali smo one, kod kojih je bila ustanovljena značajno visoka OD vrednost za oba PPD tuberkulina (avijarni i bovini), ali je pri poređenju rezultat bio neznatno ispod granične vrednosti od 0,1, odnosno 0,1 \geq OD PPDB-OD PBS \geq 0,05 i OD PPDB > OD PPDA.

4.2.9. Obrada signala (zapisa) dobijenih spoligotipizacijom

Za proveru i poređenje dobijenih spoligotipova naših izolata koristili smo dve relevantne baze podataka dostupne na internetu: www.mbovis.org i http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVIT_ONLINE, u kojima smo unošenjem binarnog koda, mogli da uporedimo spoligotipni obrazac naših izolata sa spoligotipovima koji su do sada prijavljeni i dostupni u ovim bazama podataka. Na ovaj način bilo je moguće proveriti naše spoligotipove u smislu identifikacije vrste MTB-kompleks izolata, odnosno klastera, međunarodnog kodiranja i utvrditi raširenost datog spoligotipa u regionu i šire. Vebsajt www.mbovis.org i baza podataka pokrenuti su u cilju međunarodne standardizacije nomenklature u molekularnoj genotipizaciji *Mycobacterium bovis*

sojeva. Vebsajt je lociran na serveru Univerziteta u Saseksu, Velika Britanija (University of Sussex), a podržan od strane DEFRA i VLA Weybridge. U bazi se prikupljaju podaci o svim sojevima koji ne pripadaju *M.bacterium tuberculosis sensu stricto* a definisani su kao sojevi *M.tuberculosis* kompleksa kojima nedostaje hromozomski region RD9 (Brosch i sar., 2002). U databazu su stoga uključeni podaci o spoligotipnim obrascima dobijenim od izolata *M. Africanum* (Zapadno Afrički tip), *M. microti* sojeva povezanih sa oboljenjem kod lama, zatim *Mycobacterium bovis* subsp. *caprae* comb. nov, povezan sa infekcijom koza i goveda kao i spoligotipovi klasičnih sojeva *M.bovis*.

Baza podataka [http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVIT ONLINE](http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVIT_ONLINE), sa onlajn pristupom, obezbeđena je od strane Pasterovog zavoda iz Gvadalupe, Francuska (fr. Institut Pasteur de Guadeloupe) i sadrži izveštaje o ukupno 7105 spoligotipnih obrazaca (što odgovara 58,180 kliničkih izolata) grupisanih u 2740 zajedničkih tipova odnosno međunarodnih spoligotipova (eng. spoligotype international types -SIT) i 4364 zasebnih spoligotipnih obrazaca.

4.2.10. Statistička obrada podataka

Ispitivanje nivoa podudarnosti, odnosno specifičnosti i osetljivosti poređenih testova (komparativna tuberkulinizacija i γ -IFN test) analizirano je *kappa*-metodom. Ova metoda je pogodna za obradu podataka kada se dobijaju rezultati „pozitivno-negativno“, a ne kvantitativne vrednosti.

5. REZULTATI

Rezultati istraživanja su u cilju bolje preglednosti, lakše obrade i analize podataka prikazani tabelarno (od 1 do 35), grafički, kartografski, slikama i šematski. Objašnjenja ovako predstavljenih rezultata data su u tekstu koji prethodi pomenutom tabelarnom, grafičkom i dr. prikazu. Pri tome, rezultati ispitivanja su iznošeni prema redosledu postavljenih zadataka. U prvom delu izneti su rezultati direktne mikroskopije preparata obojenih po Ziehl-Neelsenu i izolacije mikobakterija na podlogama po Löwenstein-Jensenu uz bakteriološku identifikaciju. U ovom delu prikazani su i rezultati molekularne identifikacije i genetske tipizacije dobijenih MTB-kompleks izolata, metodom spoligotipizacije na membrani kao i njihovo poređenje sa do sada ustanovljenim i objavljenim spoligotipovima u relevantnim međunarodnim bazama podataka. Takođe, ovde su prezentovani i rezultati patomorfološkog i patohistološkog pregleda uginulih ili goveda koja su bila upućena na sanitarno klanje, a prethodno su bila pozitivna na nekom od primenjenih testova za *ante mortem* dijagnozu tuberkuloze. U drugom delu izneti su rezultati ispitivanja osetljivosti dobijenih izolata MTB-kompleks bakterija na antituberkulotike (etambutol, streptomycin, rifampicin, izoniazid) koji se koriste za terapiju ljudi u našoj zemlji. U trećem delu prikazani su rezultati dijagnostičkog ispitivanja živih goveda na prisustvo infekcije uzročnikom tuberkuloze primenom komparativnog tuberkulinskog testa i γ -IFN testa, kao i međusobno poređenje i vrednovanje oba testa. U četvrtom delu prikazani su podaci o incidenciji i prevalenciji infekcije kod goveda u Vojvodini, za period 2010-2015. godine, pri čemu su posebno detaljno prikazani i analizirani podaci o incidenciji i kretanju infekcije u ustanovljenim tuberkuloznim žarištima na teritoriji Južnobačkog okruga u periodu od 2006-2015. godine.

5.1.1. Rezultati direktnog mikroskopskog pregleda i izolacije mikobakterija

Na prisustvo bakterija MTB-kompleksa ispitani su uzorci tkiva (pluća i limfni čvorovi) 49 goveda koja su prilikom izvođenja komparativnog tuberkulinskog testa imala pozitivnu reakciju. Kod 40 grla prilikom patomorfološkog pregleda na liniji klanja su ustanovljene promene koje mogu ukazivati na tuberkulozu. Direktnim mikroskopskim pregledom preparata obojenih po Ziehl-Neelsen-u, prisustvo

acidorezistentnih štapićastih bakterija (ACR) ustanovljeno je u uzorcima tkiva 14 goveda (28,6%). Kultivacijom na podlogama po Löwenstein-Jensen-u, iz uzoraka tkiva 19 (38,7%) goveda izolovane su bakterije MTB-kompleksa.

Kod 4 jedinice u uzorcima limfnih čvorova ustanovljeno je prisustvo acidorezistentnih bakterija, ali izolacija nije uspela usled kontaminacije ili drugih razloga. Izolovane bakterije su na osnovu fenotipskih karakteristika i primenom standardnih biohemijskih testova identifikovane do nivoa vrste. Na osnovu ovako izvršene tipizacije svi izolati su svrstani u vrstu *M. bovis*. Rezultati ispitivanja prikazani su u tabeli 1.

Tabela 1. Rezultati direktnog mikroskopskog pregleda i izolacije MTB-kompleks bakterija iz uzoraka tkiva 49 goveda pozitivnih na komparativnom tuberkulinskom testu

Govedo Br.	Opština	Naselje	Direktna mikroskopija	Izolacija	Bakteriološka tipizacija
1	Žabalj	Žabalj	-	+	<i>M.bovis</i>
2	Žabalj	Žabalj	+	+	<i>M.bovis</i>
3	Žabalj	Žabalj	-	-	-
4	Žabalj	Žabalj	-	-	-
5	Žabalj	Žabalj	-	-	-
6	Žabalj	Žabalj	-	-	-
7	Žabalj	Žabalj	+	+	<i>M.bovis</i>
8	Žabalj	Žabalj	-	-	-
9	Žabalj	Žabalj	-	-	-
10	Žabalj	Žabalj	-	-	-
11	Žabalj	Žabalj	-	-	-
12	Žabalj	Žabalj	-	-	-
13	Titel	Gardinovci	-	+	<i>M.bovis</i>
14	Titel	Gardinovci	+	+	<i>M.bovis</i>
15	Titel	Gardinovci	-	-	-
16	Titel	Gardinovci	-	-	-
17	Titel	Gardinovci	-	+	<i>M.bovis</i>
18	Titel	Gardinovci	+	-	kontaminacija
19	Titel	Gardinovci	-	-	-
20	Titel	Gardinovci	-	-	-
21	Titel	Gardinovci	-	+	<i>M.bovis</i>
22	Titel	Gardinovci	-	-	-
23	Titel	Gardinovci	-	+	<i>M.bovis</i>

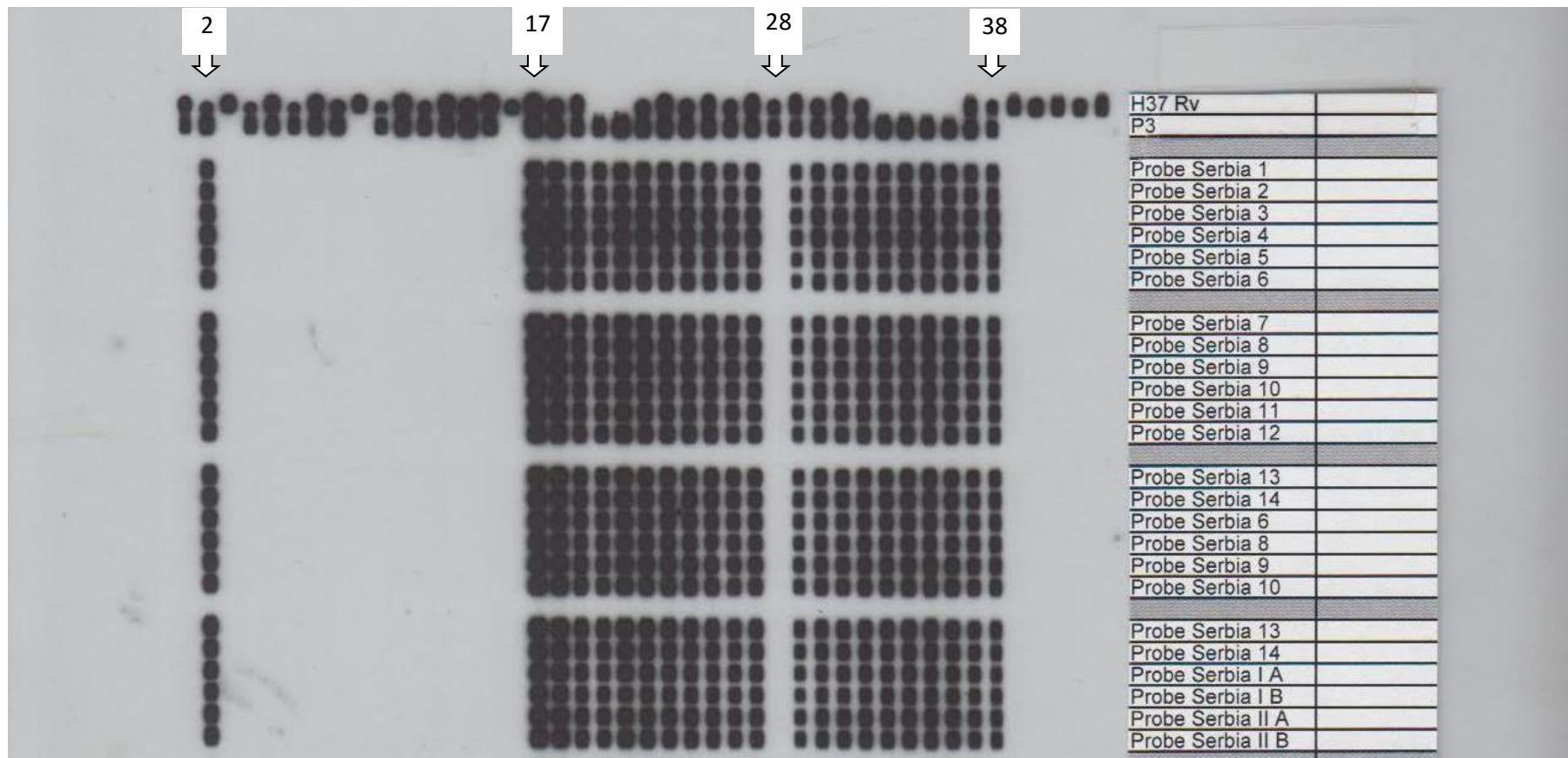
Govedo Br.	Opština	Naselje	Direktna mikroskopija	Izolacija	Bakteriološka tipizacija
24	Titel	Gardinovci	-	-	-
25	Titel	Gardinovci	-	-	-
26	Titel	Gardinovci	-	-	-
27	Titel	Gardinovci	+	-	-
28	Titel	Mošorin	-	-	-
29	Titel	Mošorin	+	+	<i>M.bovis</i>
30	Titel	Mošorin	-	-	-
31	Titel	Vilovo	+	+	<i>M.bovis</i>
32	Temerin	Temerin	+	+	<i>M.bovis</i>
33	Novi Sad	Kovilj	-	-	-
34	Novi Sad	Kovilj	-	-	-
35	Novi Sad	Kovilj	-	+	<i>M.bovis</i>
36	Novi Sad	Kovilj	-	-	-
37	Novi Sad	Kovilj	-	+	<i>M.bovis</i>
38	Novi Sad	Kovilj	+	-	kontaminacija
39	Novi Sad	Kovilj	+	+	<i>M.bovis</i>
40	Novi Sad	Kovilj	+	+	<i>M.bovis</i>
41	Novi Sad	Kovilj	-	-	-
42	Novi Sad	Kovilj	-	-	-
43	Novi Sad	Kovilj	-	-	-
44	Novi Sad	Kovilj	-	-	kontaminacija
45	Indija	Beška	+	+	<i>M.bovis</i>
46	Indija	Beška	-	+	<i>M.bovis</i>
47	Indija	Beška	+	+	<i>M.bovis</i>
48	Indija	Beška	-	+	<i>M.bovis</i>
49	Stara Pazova	Golubinci	+	-	-

5.1.2. Rezultati molekularne identifikacije MTB-kompleks izolata metodom spoligotipizacije

Identifikacija različitih mikobakterija u okviru MTB-kompleksa, metodom spoligotipizacije zasniva se na ispitivanju prisustva ili odsustva određene specifične kombinacije 43 spejsera koji su razasuti između velikog broja visoko konzerviranih ponavljajućih sekvenci unutar hromozomskog direktno ponavljajućeg regiona (DR region). Metodom PCR spoligotipizacije u cilju detekcije i genotipizacije *M.tuberculosis kompleksa* ispitano je 18 izolata mikobakterija kod kojih je postupak

ekstrakcije DNK bio uspešan. Izolati su dobijeni iz uzoraka limfnih čvorova i tkiva pluća, nakon klanja goveda pozitivnih na komparativnom tuberkulinskom testu ili paralelno i na γ -IFN testu, a primenom standardnih bakterioloških metoda klasifikovani su kao *M.bovis*. Sva ispitivana goveda su poticala iz individualnih gazdinstava (ukupno 16), lociranih u četiri opštine Južnobačkog okruga i jednoj Sremskog okruga. Za epizootiološku jedinicu uzet je zapat goveda, a ne pojedinačna životinja, tako da svaki uzorak predstavlja jedan zapat, osim u slučaju Sremskog okruga gde su iz dva pozitivna zapata dobijena po dva izolata. Uzorci su obeleženi na sledeći način: opština Novi Sad, naseljeno mesto Kovilj, zapati 1, 2, 3; opština Žabalj, naseljeno mesto Žabalj, zapati 9, 10, 11,; opština Temerin, naseljeno mesto Temerin, zapat označen brojem 13; opština Titel, naseljeno mesto Gardinovci zapati 4, 5, 6, 7, 8, naseljeno mesto Vilovo, zapat 12 i naseljeno mesto Mošorin zapat 14. Dva gazdinstva na kojima su uzgajana goveda iz Sremskog okruga locirana u opštini Inđija, u naseljenom mestu Beška, označena su rimskim brojevima i to: prvi zapat sa dva uzorka I A i I B, i drugi zapat II A i II B. Broj goveda na pojedinim gazdinstvima varirao je od 10 do 70 grla.

Rezultati spoligotipizacije kod svih izolata poreklom od goveda iz Južnobačkog i Sremskog okruga pokazuju odsustvo spejsera 1 i niza spejsera od 3 sve do 16, kao i spejsera 28 što je karakteristično za *Mycobacterium caprae*. Odsustvo spejsera 28, i niza spejsera od 39 do 43, kod svih izolata ukazuje da pripadaju istom klasteru, odnosno imaju „klasičan“ *Mycobacterium caprae* S1 spoligotip kako je opisano od strane Prodinger i sar., (2005). Dobijeni rezultati spoligotipizacije predstavljeni su na slici 1.

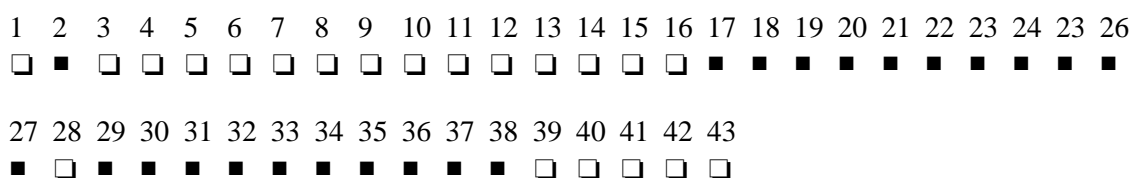


Slika 1. Spoligotipovi dobijeni od 18 goveda inficiranih sa *Mycobacterium caprae* iz Vojvodine. Red 1 *M.tuberculosis* H37Rv ; red 2 *M.bovis* BCG P3, redovi 3-26 spoligotipovi goveda iz Vojvodine (18 različitih izolata). Sterlicama su obeleženi značajni spejseri, a evidentno je odsustvo spejsera 1, 3-16 i 28, što je karakteristično za *M.caprae*.

Pri izvođenju standardne spoligotipizacije na membrani, svaki od 43 spejsera, stvara (emituje) signal koji se manifestuje kao zatamnjeno polje kvadratastog oblika (ukoliko je prisutan) na rentgen filmu ili ostaje prazno mesto ukoliko je spejser odsutan. Dobijeni signal smo pretvorili u binarni kod, odnosno u niz od 43 jedinica i nula, pri čemu je broj 1 predstavljao prisustvo, a 0 odsustvo određenog spejsera. Kada je ovaj princip primenjen na spoligotipni obrazac naših izolata dobijen je sledeći binarni kod:

010000000000000011111111110111111111100000

Šematski prikaz 1. – binarni spoligotip 18 ispitivanih izolata MTB-kompleksa iz Vojvodine



Brojevi pojedinačnih spejsera prikazani su u prvom redu, prazni ili zatamnjeni kvadratići ukazuju na odsustvo, odnosno prisustvo specifične oligonukleotidne sekvence (spejsera).

Dobijeni podaci binarnog koda automatski su upoređeni sa već postojećim podacima unetim u spoligotipnu bazu podataka na adresi www.mbovis.org i dobijene su internacionalno merodavne oznake spoligotipnog obrasca odnosno klastera naših izolata. Svaki spoligotipni obrazac dobija jedinstveni SB broj, oktalnu i Hex code oznaku uz identifikaciju vrste MTB-kompleksa kojoj pripada.

Nakon unošenja binarnog spoligotipnog koda naših izolata u bazu podataka: 010000000000000011111111110111111111100000 dobijena je spoligotipna oznaka SB0418 i Hexcode 20-00-1F-7E-FF-60. Rezultati identifikacije prikazani su u tabeli 2. Prema informacijama dostupnim u ovoj bazi podataka izolati su identifikovani kao *M. bovis subsp. caprae*, a izolati identičnog spoligotipa ustanovljeni su u Belgiji.

Tabela 2. Identifikacija ispitivanih izolata MTB-kompleksa metodom spoligotipizacije u *mbovis.org* bazi podataka

Broj uzoraka	region	Vrsta životinje	Oktalni kod	M. bovis org baza podataka		
				SB obrazac	HEX code	vrsta
14	JBO	govedo	2000037773776000	0418	20-00-1F-7E-FF-60	<i>M. caprae</i>
4	Srem	govedo	2000037773776000	0418	20-00-1F-7E-FF-60	<i>M. caprae</i>

*JBO - Južnobački okrug

Binarni kod naših izolata automatski je upoređen i sa podacima prisutnim u 2012. SITVIT WEB Database, najvećoj svetskoj bazi podataka o genotipskim markerima (spoligotipovi, MIRU, VNTR) za *Mycobacterium tuberculosis* kompleks, na adresi http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVIT_ONLINE. Prema podacima generisanim u SITVIT bazi, izolati *M. caprae*, spoligotipnog obrasca ST 647, pored naše zemlje ustanovljeni su u periodu od 1995. godine do danas još u Austriji, Belgiji, Češkoj, Nemačkoj, Francuskoj, Velikoj Britaniji, Hrvatskoj, Mađarskoj, Italiji, Holandiji, Hondurasu i Ukrajini. Rezultati analize spoligotipova naših izolata u SITVIT bazi podataka su prikazani u tabeli 3.

Tabela 3. Identifikacija ispitivanih izolata MTB-kompleksa metodom spoligotipizacije u SITVIT bazi podataka

Broj uzoraka	Region	Vrsta životinje	Oktalni kod	SITVIT baza podataka		
				ST No	vrsta	soj(lineage)
14	JBO*	govedo	2000037773776000	647	<i>M. caprae</i>	CAP
4	Srem	govedo	2000037773776000	647	<i>M. caprae</i>	CAP

*JBO - Južnobački okrug

Uporedni prikaz automatske analize binarnog koda naših izolata u www.mbovis.org i http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/SITVIT_ONLINE, sa utvrđenom vrstom i sojem prikazan je u tabeli 4.

Tabela 4. Zbirni prikaz rezultata 18 ispitivanih goveđih MTB-kompleks izolata metodom klasične spoligotipizacije na membrani

Broj uzoraka	Region	Vrsta životinje	Oktalni kod	Rezultat u SITVIT bazi podataka			Rezultat u <i>M. bovis</i> org bazi podataka		
				ST broj	vrsta	Soj (lineage)	SB broj	HEX code	vrsta
14	JBO	govedo	2000037773776000	647	<i>M.caprae</i>	CAP	0418	20-00-1F-7E-FF-60	<i>M. caprae</i>
4	Srem	govedo	2000037773776000	647	<i>M.caprae</i>	CAP	0418	20-00-1F-7E-FF-60	<i>M. caprae</i>

*JBO - Južnobački okrug

5.1.3. Rezultati patomorfološkog pregleda goveda na liniji klanja

Na prisustvo makroskopski vidljivih tuberkuloznih lezija patomorfološki je pregledano ukupno 60 trupova tuberkulin pozitivnih goveda na liniji klanja, kao i leš jedne uginule krave sa razvijenom kliničkom slikom tuberkuloze. Od ukupno pregledanih 61 trupa zaklanih i ugunulih životinja, kod 40 (65,6%) su ustanovljene patomorfološke promene koje mogu ukazivati na infekciju uzročnikom tuberkuloze. Lezije su varirale od kazeo-purulentnih koje su konfluirale i zahvatale velike delove plućnog parenhima, do granulomatoznih, pri čemu su granulomi bili različitog prečnika, nekad ne većeg od 1 cm, pojedinačni ili multipni sa centralnom kazeizacijom i mineralizacijom. Kod 21 (34,4%) grla nisu uočene promene karakteristične za tuberkulozu. Kod 32 (52,5%) goveda, tuberkulozne lezije ustanovljene su na dva ili više mesta, dok su kod 8 (13,1%) ustanovljene samo pojedinačne lezije. Rezultati patomorfološkog pregleda, kao i raširenost i distribucija ustanovljenih lezija, u cilju optimizacije *post mortem* dijagnostičke procedure prikazani su u tabelama 5 i 6.

Tabela 5. Rezultati patomorfološkog pregleda zaklanih i uginulih životinja

Broj pregledanih trupova	Pozitivan p/a nalaz	%	Negativan p/a nalaz	%	Multiple lezije	%	Pojedinačne lezije	%
61	40	65,6	21	34,4	32	52,5	8	13,1

*p/a-patoanatomski

Rezultati patomorfološkog pregleda ukazuju da su kod najvećeg broja tuberkuloznih goveda kod kojih su bile prisutne makroskopski vidljive lezije one bile lokalizovane na limfnim čvorovima, i to najčešće medijastinalnim 27 (67,5%), bronhijalnim 19 (47,5%) i retrofaringealnim 15 (37,5%), dok su promene na plućnom tkivu uočene kod 11 (27,5%) od ukupno 40 grla sa ustanovljenim patomorfološkim promenama. Od 8 grla kod kojih su ustanovljene samo pojedinačne promene kod 5 grla promene su bile lokalizovane na medijalnim retrofaringealnim limfnim čvorovima, kod dva na medijastinalnim, a kod jednog grla tuberkulozne lezije ustanovljene su na mezenterijalnim limfnim čvorovima crevne ploče. Lokalizacija i raširenost tuberkuloznih lezija u pojedinim tkivima prikazana je u tabeli 6.

Tabela 6. Lokalizacija i distribucija lezija u tkivima i organima

Lokalizacija tuberkuloznih promena	broj grla	%
Submandibularni lč*	3	7,5
Cervikalni lč	8	20,0
Retrofaringealni lč	15	37,5
Medijastinalni lč	27	67,5
Bronhijalni lč	19	47,5
Pluća	11	27,5
Mezenterijalni lč	1	2,5
Supramamarni lč	1	2,5
Ukupan broj trupova sa uočenim lezijama 40		

*lč - limfni čvor

5.1.4. Rezultati patohistološkog pregleda

Na prisustvo karakterističnih tuberkuloznih lezija pregledani su isečci tkiva 40 goveda koja su bila pozitivna na komparativnom intradermalnom tuberkulinskom testu ili paralelno i na gama interferon testu. Kod ovih grla su prilikom patomorfološkog pregleda uočene promene koje su kompatibilne sa tuberkulozom, a pregledom su obuhvaćeni limfni čvorovi i/ili delovi pluća. Za svako grlo dobijeni rezultat je označen kao pozitivan, negativan ili nejasan. Rezultati patohistološkog ispitivanja pokazali su kod 35 grla pozitivan patohistološki nalaz na tuberkulozu. Kod pozitivnih grla ustanovljene su sledeće patohistološke dijagnoze: *Lymphadenitis tuberculosa*, *Lymphadenitis caseosa tuberculosa*, *Lymphadenitis caseosa tuberculosa et partim calcificata*, *Tuberculosis fibro-caseosa et calcificata pulmonum*, *Pneumonia caseosa tuberculosa*, *Tuberculosis miliaris pulmonum*.

Kod jednog grla (CS7102337035) kod koga je patohistološki nalaz označen kao nejasan, u plućnom tkivu ustanovljena su bronhopneumonična žarišta granulomskog tipa sa epitelioidnim i Langhansovim ćelijama i sa nekrozom koja je većinom izgledala kazeozno. U granulomima i oko njih uočeno je prisustvo obilja granulocita, eozinofila, limfocita i plazmocita, što nije tipična slika za tuberkulozu. U limfnom čvoru ustanovljen je nespecifični limfadenitis sa sinus-histiocitozom. Na osnovu iznetog patohistološka diferencijalna dijagnoza obuhvatala je tuberkulozu u kombinaciji sa nespecifičnom ili verminoznom pneumonijom ili pseudotuberkulozu.

Kod 4 grla, nisu ustanovljene patohistološke promene karakteristične za tuberkulozu, pri čemu su u materijalu poreklom od dva grla ustanovljeni znaci gnojnog bronhitisa i

bronhopneumonije sa obilnim peribronhijalnim limfocitnim infiltratom i hiperplazijom limfnog tkiva, koja je bila okružena nespecifičnim zapaljenskim infiltratom. Ovakav patohistološki nalaz odgovarao je nespecifičnoj bronhopneumoniji. Kod dva goveda pregledom isečaka pluća na kojima su makroskopski ustanovljene tvrde čvoraste mase, histološki je ustanovljena narušena struktura usled prisustva prostranih ognjišta u kojima su bile vidljive nematodne larvice, prisustvo makrofaga i velikog broja granulocita uz obilje eozinofila, što odgovara verminoznoj pneumoniji.

5.2. Rezultati ispitivanja osetljivosti izolovanih mikobakterija na odabrane antituberkulotike

Osetljivost na odabranu paletu antituberkuloznih lekova (etambutol, rifampicin, izoniazid i streptomycin) koji se u našoj zemlji najčešće primenjuju u terapiji ljudi obolelih od tuberkuloze, uključujući i lekove „prve linije“, ispitana je kod 5 od ukupno 19 dobijenih izolata. Svi izolati dobijeni su kultivacijom iz organa i tkiva na kojima su bile uočljive karakteristične tuberkulozne lezije. Izolati su poticali od goveda iz pet zapata (veličine 10-70 grla) lociranih na teritoriji četiri opštine u Južnobačkom i jednoj u Sremskom okrugu. Ispitivani izolati su obeleženi rednim brojevima 1-5 (1-Novi Sad, 2-Titel, 3-Žabalj, 4-Temerin, 5-Indija). Na osnovu rezultata ispitivanja ustanovljeno je da su svi izolati bili osetljivi na etambutol, streptomycin, rifampicin i izoniazid, odnosno ni u jednom slučaju nije ustanovljena rezistencija na neki od antituberkuloznih lekova. Rezultati ispitivanja su prikazani u tabeli 7.

Tabela 7. Rezultati testa osetljivosti na odabrane antituberkulotike

Oznaka izolata	Vrsta izolata	Osetljivost izolata na antituberkulotike			
		izoniazid	rifampicin	etambutol	streptomycin
1	<i>M.caprae</i>	S*	S	S	S
2	<i>M.caprae</i>	S	S	S	S
3	<i>M.caprae</i>	S	S	S	S
4	<i>M.caprae</i>	S	S	S	S
5	<i>M.caprae</i>	S	S	S	S

*S- osetljiv

5.3. Rezultati dijagnostičkog ispitivanja goveda primenom intradermalnog komparativnog tuberkulinskog testa i γ -IFN testa i njihovog poređenja

Nakon sprovedene tuberkulinizacije uz primenu bovinog tuberkulina (monotest), od strane nadležne veterinarske službe, goveda kod kojih je utvrđena sumnjiva ili

pozitivna tuberkulinska reakcija, po isteku 50 do 60 dana ponovo su tuberkulinisana primenom komparativnog tuberkulinskog testa uz prethodno uzorkovanje krvi za γ -IFN test. Ispitivanjem je obuhvaćeno 71 govedo iz 25 gazdinstava u Vojvodini (lociranih u Južnobačkom i Sremskom okrugu). Tokom dijagnostičkog ispitivanja metodom pojedinačnog testa tuberkulinom B, pozitivne reakcije ustanovljene su kod 51 grla (71,8%), a sumnjive kod 20 (28,2%). Komparativnim tuberkulinskim testom uz simultanu aplikaciju avijarnog i bovinog PPD tuberkulina kod istih goveda pozitivna reakcija utvrđena je kod 48 grla (67,6%), a negativna kod 14 (19,7%). Kod 7 (9,9%) grla ustanovljena je sumnjiva reakcija, dok je kod 2 (2,8%) goveda reakcija protumačena kao nespecifična, odnosno pozitivna na avijarni tuberkulin. Primenom *M.bovis* γ -IFN testa u 42 (59,1%) pregledana uzorka krvi goveda ustanovljene vrednosti ukazivale su na infekciju sa *M.bovis*, u 6 (8,5%) uzoraka krvi ustanovljena je sumnjiva reakcija, odnosno granične *cut off* vrednosti za OD između pozitivne i negativne kontrole koje su ostavljale nedoumicu, a 21 (29,6%) uzorak je bio negativan. Rezultati ispitivanja predstavljeni su u tabeli 8.

Tabela 8. Rezultati tuberkulinskog i *M.bovis* γ -IFN testa kod ispitivanih goveda

Red. broj	Br. ušne markice	Rezultat monotesta	Komparativna tuberkulin.			γ - interferon test
			Avijarni	Bovini	Ocena	ocena
1.	CS7160259282	poz	0	2	neg	neg
2.	CS7110259265	poz	3	7,5	poz	poz
3.	CS7160258254	sum	3,5	11,5	poz	sum
4.	CS7140259259	poz	1	5	poz	poz
5.	CS7120263648	poz	1	18	poz	neg
6.	CS7160793896	poz	1	11,5	poz	poz
7.	CS7170263644	poz	2	6	poz	poz
8.	CS7170261982	poz	2	18,5	poz	poz
9.	CS7100239261	poz	1,5	4	sum	neg
10.	7116239869	poz	2	9	poz	poz
11.	CS7140256741	poz	2	11,5	poz	poz
12.	CS7160256735	poz	1	20	poz	poz
13.	CS7190256734	poz	0	8,5	poz	poz
14.	CS7110256733	poz	0	5	poz	poz
15.	CS7120254880	sum	1	11	poz	poz
16.	CS7130256732	poz	0	5,5	poz	poz
17.	CS7190252825	poz	1	5	poz	poz
18.	CS7150256731	poz	2	12	poz	poz
19.	CS7180252835	poz	0	14,5	poz	poz
20.	CS7140254884	poz	2	17	poz	poz

Red. broj	Br. ušne markice	Rezultat monotesta	Komparativna tuberkulin.			γ- interferon test
			Avijarni	Bovini	Ocena	ocena
21.	CS7110254885	poz	1	17,5	poz	poz
22.	CS7170262929	poz	3	29	poz	poz
23.	CS7140261993	sum	0	5,5	poz	neg
24.	CS7150252827	poz	0	3	sum	neg
25.	CS7120252824	poz	0	0	neg	neg
26.	CS7111691272	sum	0	1	neg	neg
27.	CS7150254888	sum	0	4,5	poz	neg
28.	CS7170254887	poz	0	7	poz	neg
29.	CS7110254866	sum	0	0	neg	neg
30.	CS7120254899	sum	1	1	neg	neg
31.	CS7170252850	poz	0	13	poz	sum
32.	CS7180254877	sum	0	5	poz	sum
33.	CS7140252823	poz	0	6,5	poz	sum
34.	CS7150252832	poz	1	4,5	poz	sum
35.	CS7110800658	sum	1	1	neg	neg
36.	RS7122830196	sum	1	2	neg	neg
37.	CS7180798065	sum	3	6,5	poz	poz
38.	CS7101359085	sum	3	4	sum	poz
39.	CS7102337035	poz	2	9	poz	poz
40.	CS7120797900	poz	0	3	sum	poz
41.	CS7181359067	sum	0,5	0	neg	neg
42.	CS7161348904	sum	0,5	2,5	sum	poz
43.	CS7181359086	sum	0	0	neg	poz
44.	CS7152185497	poz	0,5	0	neg	poz
45.	CS7132185455	sum	0	0,5	neg	poz
46.	CS7171439079	poz	2	11	poz	poz
47.	CS7190180046	poz	3	12,5	poz	poz
48.	CS7131439062	poz	1	7	poz	neg
49.	CS7191427546	poz	0	5	poz	poz
50.	CS7121439067	poz	0	8,5	poz	poz
51.	CS7101427541	poz	0	6	poz	poz
52.	CS7130252828	poz	4	10	poz	poz
53.	CS7190254853	poz	7	3	nes	poz
54.	CS7161691222	poz	6	7	sum	poz
55.	RS7132613475	poz	1	10	poz	poz
56.	CS7101147536	sum	2	7	poz	poz
57.	CS7101432892	poz	2	7	poz	poz
58.	CS7121439053	sum	1	15	poz	poz
59.	CS7131433135	poz	9	1	nes	mav
60.	CS7160804461	sum	1	5	poz	neg
61.	CS7120795425	poz	0	0	neg	neg
62.	CS7181428481	poz	1	30	poz	sum
63.	CS7140795429	sum	0	0	neg	neg

Red. broj	Br. ušne markice	Rezultat monotesta	Komparativna tuberkulin.			γ - interferon test
			Avijarni	Bovini	Ocena	ocena
64.	CS7112319465	poz	1	4	poz	neg
65.	CS7111439063	poz	0	12	poz	neg
66.	CS7141439052	poz	1	1	neg	mav
67.	CS7142315828	poz	0	8	poz	poz
68.	CS7152316808	poz	1,5	5	poz	poz
69.	CS7191433364	poz	0	5	poz	poz
70.	CS7112312402	poz	5	6	sum	neg
71.	CS7142308615	poz	0	11	poz	poz

poz=pozitivna reakcija; sum=sumnjiva reakcija; neg=negativna reakcija; nes=nespecifična reakcija; mav-negativna reakcija; reakcija na *M.avium*

Rezultata komparativnog tuberkulinskog testa i γ -IFN testa analizirani su posebno, za svaki od 71 ispitivanog uzorka, a dobijene su sledeće vrednosti: 67,6% goveda bilo je pozitivno na komparativnom tuberkulinskom testu, dok je 59,1% bilo pozitivno na γ -IFN testu. Procenat sumnjivih reakcija na γ -IFN testu i komparativnom tuberkulinskom testu neznatno se razlikovao 8,4% naspram 9,9%. Ukupno 2 (2,8%) goveda su bila pozitivna na avijarni PPD tuberkulin pri izvođenju γ -IFN testa, dok su takođe 2 grla imala pozitivnu reakciju na avijarni tuberkulin pri izvođenju komparativne tuberkulinizacije.

Tabela 9. Uporedni prikaz rezultata dobijenih komparativnom tuberkulinizacijom i upotrebom γ -IFN testa

γ -IFN (%)	Komparativna tuberkulinizacija (%)				
	Pozitivna	Negativna	Sumnjiva	Avijarni	Ukupno
Pozitivna	34 (47,9)	3 (4,2)	4 (5,6)	1(1,4)	42 (59,1)
Negativna	8 (11,2)	10 (14,1)	3 (4,2)	0	21 (29,6)
Sumnjiva	6 (8,4)	0	0	0	6 (8,4)
Avijarni	0	1 (1,4)	0	1 (1,4)	2 (2,8)
Ukupno	48 (67,6)	14 (19,7)	7 (9,9)	2 (2,8)	71 (100)

Pri pooštrenom tumačenjem tuberkulinske probe u zaraženim zaptima sve sumnjive reakcije dobijene na bilo kojem od dva testa svrstavane su u pozitivne, a reakcije na avijarni tuberkulin u negativne. Ovako modifikovana izračunata prevalencija pozitivnih reaktora za komparativni tuberkulinski test iznosila je 77,4%, a za γ -IFN test 67,6%. Izračunavanje podudarnosti dobijenih rezultata reakcije kasne preosetljivosti sa dva dijagnostička testa: komparativnom tuberkulinizacijom i γ -IFN testom, izvršeno je uz pomoć -Kappa statističke analize (κ). Ukupna podudarnost oba

testa iznosila je 0,79; odnosno saglasnost rezultata oba testa ustanovljena je u 78,8% ispitanih uzoraka, pri čemu je ustanovljen visok nivo proporcije pozitivne podudarnosti $r = 0,85$, dok je utvrđena proporcija saglasnosti negativnog nalaza bila $r = 0,62$ (CI 95%). *Kapa* analizom dva poređena dijagnostička testa izračunata je vrednost $\kappa = 0,48$ što ukazuje na umerenu (srednju) saglasnost testova (Viera i sar., 2005). Rezultati su prikazani u tabeli 9.

Tabela 10. Uporedni prikaz podudarnosti rezultata dobijenih komparativnom tuberkulinizacijom i upotrebom γ -IFN testa (reakcije na avijarni tuberkulin svrstane su u negativne, a sumnjive reakcije oba testa uključene su u pozitivne)

γ -IFN (%)	Komparativna tuberkulinizacija (%)		
	Pozitivna	Negativna	Ukupno
Pozitivna	44 (61,9)	4 (5,6)	48 (67,6)
Negativna	11 (15,5)	12 (16,9)	23 (32,4)
Ukupno	55 (77,5)	16 (22,5)	71 (100)

Kada se dobijeni rezultati dva testa kombinuju, odnosno koriste paralelno, pri čemu se inficiranim smatra svako grlo koje je pozitivno na bilo kojem od dva testa, ukupan broj dijagnostikovanih pozitivnih goveda bio je 63 (88,7%). Rezultati paralelne primene komparativnog tuberkulinskog testa i γ -IFN testa prikazani su u tabeli 11.

Tabela 11. Broj inficiranih goveda otkriven primenom pooštrenog očitavanja komparativnog tuberkulinskog testa i/ili γ -IFN testa (sve sumnjive reakcije na bilo koji od dva testa tumačene su kao pozitivne)

Rezultat dijagnostičkog ispitivanja	Broj ispitanih grla (No=71)
Komp.tub. test poz.	55 (77, 5%)
γ - IFN poz.	48 (67, 6%)
Komp.tub. i/ili γ -IFN pozitivni	63 (88, 7%)

5.3.1. Rezultati ispitivanja osetljivosti γ -IFN testa kod goveda sa potvrđenom dijagnozom tuberkuloze klasičnim metodama dijagnostike

Osetljivost γ -IFN testa proverena je na 18 goveda kod kojih je *post mortem* na osnovu izolacije *M. bovis*, pozitivnog patohistološkog pregleda ili nalaza acidorezistentnih bakterija (ACR) na direktnoj mikroskopiji potvrđena tuberkuloza. Kod 11 goveda (61,1%) tuberkuloza je potvrđena izolacijom kulture *M.bovis*, dok je kod 6 (33,3%) grla ustanovljen pozitivan patohistološki nalaz, a kod jednog grla (5,5%) direktnim mikroskopskim pregledom utvrđeno je prisustvo ACR (izolacija nije dovršena usled kontaminacije). Ovo grlo potiče iz istog zapata (zapat 4) kao i dva grla

kod kojih je tuberkuloza dokazana patohistološki ili izolacijom, pa je nalaz acidorezistentnih bakterija u uzorku limfnog čvora smatran dovoljnim za potvrdu tuberkuloze. Goveda su poticala iz 13 različitih gazdinstava lociranih na teritoriji pet opština (Titel, Žabalj, Temerin, Novi Sad i Stara Pazova) i sedam naseljenih mesta (Mošorin, Žabalj, Vilovo, Gardinovci, Kovilj, Temerin i Golubinci) i sva su bila starija od 12 meseci. Gazdinstva 1-17 locirana su u regionu, gde je tuberkuloza goveda bila enzootski prisutna, sa relativno visokom prevalencijom inficiranih zapata u odnosu na ostale delove Vojvodine, dok je u slučaju zapata 18 dijagnoza postavljena prvi put u opštini Stara Pazova. Goveda su pre upućivanja na sanitarno klanje bila dijagnostički pregledana primenom komparativnog tuberkulinskog testa i γ -IFN testa. Od ukupno 18 potvrđenih slučajeva pozitivan γ -IFN test, ustanovljen je kod 15 grla, kod jednog grla dobijen je sumnjiv rezultat, dok su dva grla bila negativna.

Sumnjiva reakcija, sa graničnom *cut off* vrednošću, je radi lakše statističke obrade uvrštena u pozitivne, tako da dobijeni rezultat pokazuje da je od ukupno 18 potvrđeno tuberkuloznih goveda, nekom od navedenih *post mortem* metoda koje su u ovom istraživanju uzete za „zlatni standard“ γ -IFN test bio pozitivan u 16 slučajeva. Osetljivost γ -IFN testa korišćenog u dijagnostičke svrhe bila je 90% (Se = potvrđeno pozitivni/potvrđeno pozitivni+lažno negativni). Rezultati ispitivanja prikazani su u tabeli 12.

Tabela 12. Rezultati ispitivanja osetljivosti γ -IFN testa kod goveda sa *post mortem* potvrđenom dijagnozom tuberkuloze

Redni broj	Br. ušne markice goveda	Opština	Oznaka gazdinstva	Rezultat γ -IFN testa	Potvrдна metoda
1	CS7142308615	Titel	1	+	Izolacija
2	CS7101147536	Žabalj	2	+	Izolacija
3	CS7121439053	Žabalj	2	+	p/h
4	RS7132613475	Žabalj	2	+	p/h
5	CS7101432892	Žabalj	3	+	Izolacija
6	CS7150254888	Titel	4	-	Izolacija
7	CS7140254884	Titel	4	+	p/h
8	CS7170254887	Titel	4	-	ACR
9	CS7130252828	Titel	5	+	Izolacija
10	CS7150252832	Titel	6	S	Izolacija
11	CS7180252835	Titel	6	+	p/h
12	CS7170262929	Titel	7	+	Izolacija
13	CS7190252825	Titel	8	+	Izolacija
14	CS7120254880	Titel	9	+	Izolacija
15	CS7180798065	Temerin	10	+	Izolacija

16	CS7102337035	Novi Sad	11	+	Izolacija
17	CS7152316808	Žabalj	12	+	p/h
18	CS7101359085	St.Pazova	13	+	p/h
Ukupno pozitivno				16(88,8%)	18(100%)

+ pozitivno;- negativno; S sumnjivo; ACR acidorezistentne bakterije; p/h patohistološki

5.4. Rezultati ispitivanja incidencije i prevalencije tuberkuloze goveda u Vojvodini

U periodu od 2010. do 2015. godine u Vojvodini je dijagnostičkom ispitivanju na tuberkulozu metodom intradermalne tuberkulinizacije PPD tuberkulinom B bilo podvrgnuto ukupno 1.515.863 goveda. Broj registrovanih gazdinstava na kojima su uzgajana goveda na teritoriji Vojvodine u posmatranom periodu varirao je između 18.500-19000. U 2015. godini ukupan broj aktivnih gazdinstava na kojima su se uzgajala goveda u Vojvodini iznosio je 18.619, od čega je 2262 zapata goveda bilo locirano na teritoriji Južnobanatskog epizootiološkog područja (VSI "Pančevo"), 4269 zapata bila su registrovana na teritoriji Srednjebanatskog i Severnobanatskog epizootiološkog područja (VSI „Zrenjanin“), 2912 gazdinstava bilo je smešteno na teritoriji Zapadnobačkog epizootiološkog područja (VSI „Sombor“), a 2966 zapata goveda na teritoriji Severnobačkog epizootiološkog područja (VSI „Subotica“). Na epizootiološkom području koje je pod nadzorom NIV „Novi Sad“, bilo je ukupno registrovano 6210 gazdinstava na kojima su uzgajana goveda, od čega 2586 u Južnobačkom okrugu i 3624 u Sremskom okrugu. U analiziranom periodu pozitivna reakcija je ustanovljena kod 204 (0,013%) grla od ukupno ispitanih 1.515.863. Tokom 2010. godine od ukupno tuberkulinisanih 247.044 goveda pozitivna reakcija ustanovljena je kod 31 (0,013%), pri čemu su 3 pozitivna grla ustanovljena na teritoriji Zapadnobačkog okruga u 2 zapata goveda, a 28 pozitivnih grla na teritoriji Južnobačkog okruga u 14 različitih gazdinstava. U 2011. od ukupno 258.019 tuberkulinisanih goveda pozitivna reakcija ustanovljena je kod 33 (0,013%), od čega su 3 pozitivna grla dijagnostikovana na teritoriji Severnobačkog okruga u dva gazdinstva, 14 na teritoriji Zapadnobačkog u tri zapata, a 16 Južnobačkog okruga u 12 zapata goveda. U 2012. godini od ukupno ispitanih 256.712 životinja pozitivna tuberkulinska proba bila je ustanovljena kod 45 (0,018%) grla, od čega je po 1 pozitivno grlo bilo ustanovljeno u Severnobačkom i Južnobanatskom okrugu, 4 u Srednjebanatskom okrugu u tri zapata, 11 u Zapadnobačkom epizootiološkom okrugu u 4 zapata, a 28 u Južnobačkom okrugu

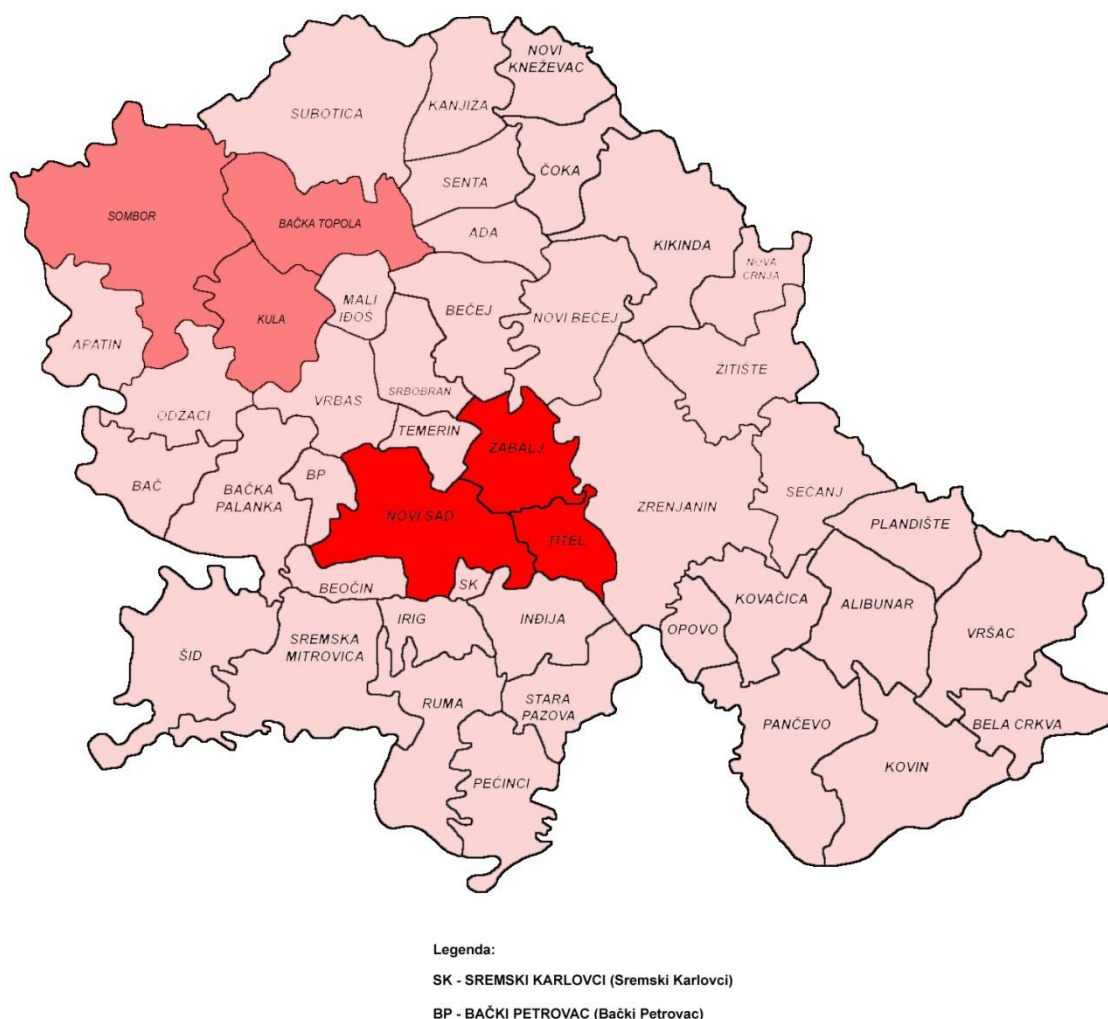
u 14 zapata goveda. U 2013. godini, od ukupno tuberkulinisanih 248.520 goveda, pozitivna su bila 42 (0,017%) grla, od toga po 1 pozitivno grlo ustanovljeno je u Severnobačkom, Sremskom i Severnobanatskom regionu, 12 u Zapadnobačkom regionu u tri gazdinstva, a 27 pozitivnih ustanovljeno je u Južnobačkom epizootiološkom području u 15 gazdinstava. Tokom 2014. godine prisustvo infekcije tuberkulozom ispitano je 252.938 goveda, pri čemu je ustanovljeno 35 (0,014%) pozitivnih grla. Pozitivna grla ustanovljena su samo na teritoriji Zapadnobačkog (17) u 4 gazdinstva i Južnobačkog (18) epizootiološkog područja u 14 gazdinstava. U 2015. godini od ukupno ispitanih 252.630 goveda, pozitivna tuberkulinska reakcija ustanovljena je kod 18 grla (0,007%), a pozitivna grla bila su na teritoriji Zapadnobačkog (6) u 2 zapata i Južnobačkog (12) epizootiološkog područja u 9 zapata. Analizom ispitivanog perioda od 6 godina može se zaključiti da je incidencija tuberkuloze na nivou celokupnog stada goveda u Vojvodini stabilno niska. U posmatranom periodu od 2010-2015. godine incidencija na nivou obolelih jedinki nije znatnije varirala i kretala se u rasponu od minimalnih 0,007 u 2015. do maksimalnih 0,018 u 2012. godini. Budući da svi otkriveni slučajevi u toku godine, zapravo predstavljaju nove slučajeve, jer se na osnovu Pravilnika o utvrđivanju mera za rano otkrivanje, dijagnostiku, sprečavanje širenja, suzbijanje i iskorenjivanje zarazne bolesti tuberkuloza goveda, načinu njihovog sprovođenja, kao i načinu utvrđivanja statusa gazdinstva slobodnog od tuberkuloze goveda („Sl. Glasnik RS“ br. 51/09), sva test pozitivna grla smatraju zaraženim i uklanjaju u roku od 30 dana od postavljanja dijagnoze, dobijeni rezultati predstavljaju apsolutnu incidenciju oboljenja na nivou inficirane jedinice.

Po broju pozitivnih reaktora, u ispitivanom periodu ističu se dva epizootiološka regiona: Zapadnobački sa 63 (30,88%) od ukupno 204 tuberkuloznih goveda i Južnobački u kome je dijagnostikovano 129 (63,24%) test pozitivnih grla. Potrebno je istaći da su sva tuberkulozna grla u Zapadnobačkom epizootiološkom području poticala iz ukupno 9 različitih zapata lociranih na teritoriji tri opštine (Bačka Topola, Sombor i Kula), u kojima su pozitivni reaktori registrovani intermitentno u toku ispitivanog perioda. Sličan trend prisutan je i u Južnobačkom okrugu, gde se tuberkuloza više godina intermitentno javlja u oko 45% od ukupnog broja pozitivnih zapata u posmatranom periodu. U ostalim epizootiološkim područjima registrovani su pojedinačni slučajevi, bez tendencije ponavljanja. Rezultati ovih ispitivanja zbirno su

prikazani u tabeli 13. Prevalencija je određivana na nivou inficiranih zapata, odnosno predstavljala je broj zapata koji su u toku godine bili pod merama restrikcije usled pojave tuberkuloze u odnosu na ukupan broj testiranih zapata. U posmatranom periodu procenat inficiranih zapata kretao se od 0,06-0,012% od ukupnog broja registrovanih gazdinstava za uzgoj goveda na teritoriji Vojvodine.

Tabela 13. Zbirni prikaz broja tuberkulinisanih goveda u Vojvodini u periodu 2010-2015. godine i broja pozitivnih reaktora

Godina	Ukupno tuberkulinisanih goveda	Broj pozitivnih reaktora	%
2010	247.044	31	0,013
2011	258.019	33	0,013
2012	256.712	45	0,018
2013	248.520	42	0,017
2014	252.938	35	0,014
2015	252.630	18	0,007
Ukupno	1.515.863	204	0,013



Kartogram 1. Raširenost i incidencija tuberkuloze na teritoriji Vojvodine, crveno su označene opštine sa najvećim brojem inficiranih jedinki i zapata

5.4.1. Rezultati ispitivanja incidencije i prevalencije tuberkuloze goveda u Južnobačkom okrugu u periodu 2006-2015. godine

Južnobački upravni region se proteže na 4016 km² i predstavlja oko 18,2% teritorije Autonomne pokrajine Vojvodine, a čine ga teritorije deset opština. U sastav Južnobačkog epizootiološkog područja, ulaze teritorije sledećih opština: Novi Sad, Titel, Žabalj, Beočin, Bečej, Temerin, Srbobran, Bač, Bački Petrovac i Bačka Palanka. Broj registrovanih goveda tokom analiziranog perioda varirao je od oko 46-62000 grla, po čemu ovo epizootiološko područje spada u regione sa najgušćom populacijom ovih životinja u Srbiji. Na teritoriji koja se nalazi između desne obale reke Tise i leve obale Dunava, a proteže se u tri različite opštine (Žabalj, Titel, Novi Sad) veliki broj stada

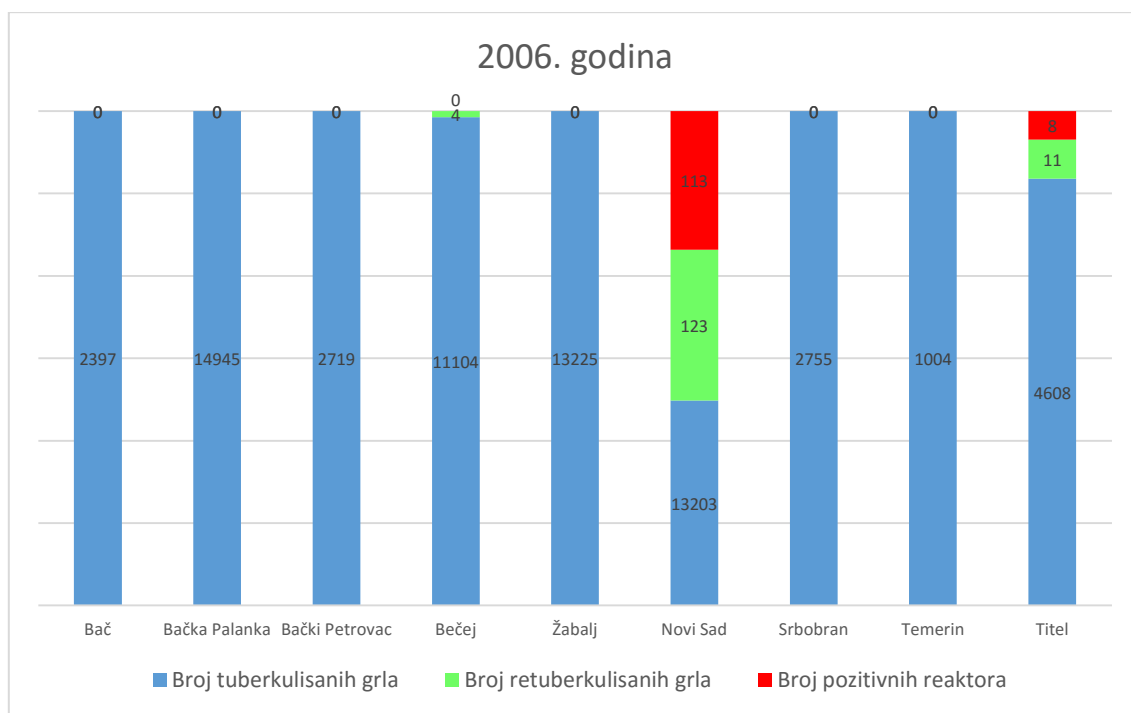
goveda drži se u slobodnom pašnom odgoju u sistemu krava-tele. Goveda su preko cele godine na ispaši osim kratkog perioda tokom zime, kada se najčešće vraćaju na farmu i mešaju sa muznim grlima koja se uzgajaju u gazdinstvima. Upravo na ovim lokalitetima identifikovano je nekoliko žarišta tuberkuloze u kojima je oboljenje enzootski prisutno. Rezultati ispitivanja incidencije i prevalencije tuberkuloze goveda u Južnobačkom okrugu za period 2006-2015. prikazani su u tabelama (14-34).

Iako je ukupna incidencija tuberkuloznih grla na nivou Južnobačkog okruga niska, ispod 0,1%, u poslednjih šest godina, dijagnostičkom tuberkulinizacijom goveda u pojedinim naseljenim mestima ustanovljen je veći broj inficiranih grla nego u svim ostalim delovima Vojvodine zajedno. Tokom 2006. godine nakon uvođenja obaveznog obeležavanja goveda usnim markicama, pozitivna reakcija na tuberkulin B ustanovljena je kod 121 grla u dva naseljena mesta i ukupno 28 dvorišta. U naseljenom mestu Kovilj (opština Novi Sad) od ukupno pregledanih 750 grla, 113 goveda iz 20 zapata je bilo tuberkulozno, što predstavlja prevalenciju od 15,1% na nivou inficiranih jedinki. U pojedinim gazdinstvima utvrđena prevalencija inficiranih grla kretala se od 11,1 do 59,2% od ukupnog broja životinja, a prevalencija na nivou zaraženih zapata inosila je 22% (20 inficiranih zapata od ukupno 91 pregledanih). U naseljenom mestu Gardinovci (opština Titel) od ukupno 482 pregledana grla pozitivno na TBC bilo je 8 (1,65%), koja su poticala iz 8 različitih gazdinstava, a prevalencija na nivou zapata bila je 15,3%.

Tabela 14. Broj tuberkulinisanih i pozitivnih grla u Južnobačkom okrugu u 2006. godini

Opština	Broj tuberkulisanih grla	Broj retuberkulisanih grla	Broj pozitivnih reaktora	%
Bač	2397	0	0	0
Bačka Palanka	14945	0	0	0
Bački Petrovac	2719	0	0	0
Bečež	11104	4	0	0
Žabalj	13225	0	0	0
Novi Sad	13203	123	113	0,86
Srbobran	2755	0	0	0
Temerin	1004	0	0	0
Titel	4608	11	8	0,17
Ukupno	65960	138	121	0,18

Grafikon 1. Incidencija tuberkuloze goveda u Južnobačkom epizootiološkom području u 2006. godini



Kartogram 2. Geografska raširenost tuberkuloze goveda u Južnobačkom okrugu tokom 2006. godine

Tabela 15. Prikaz broja pozitivnih grla i zaraženih dvorišta po opštinama i naseljenim mestima u 2006. godini

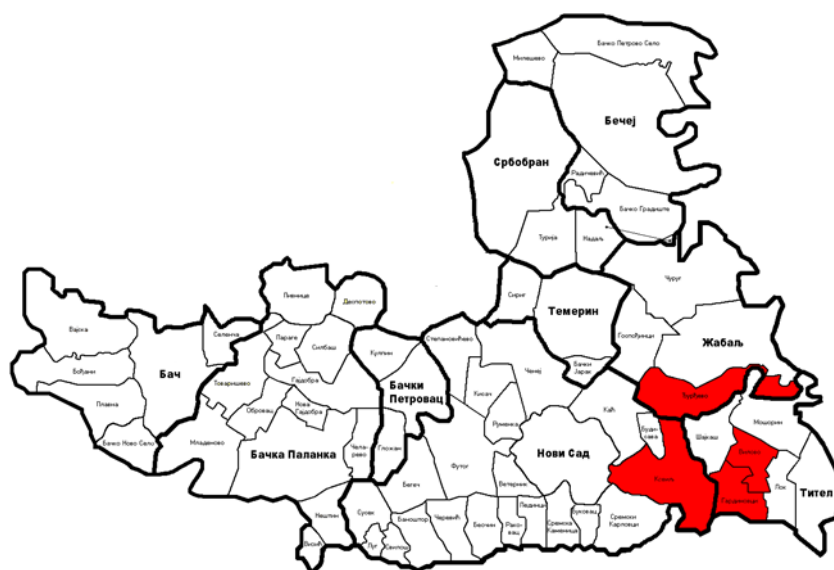
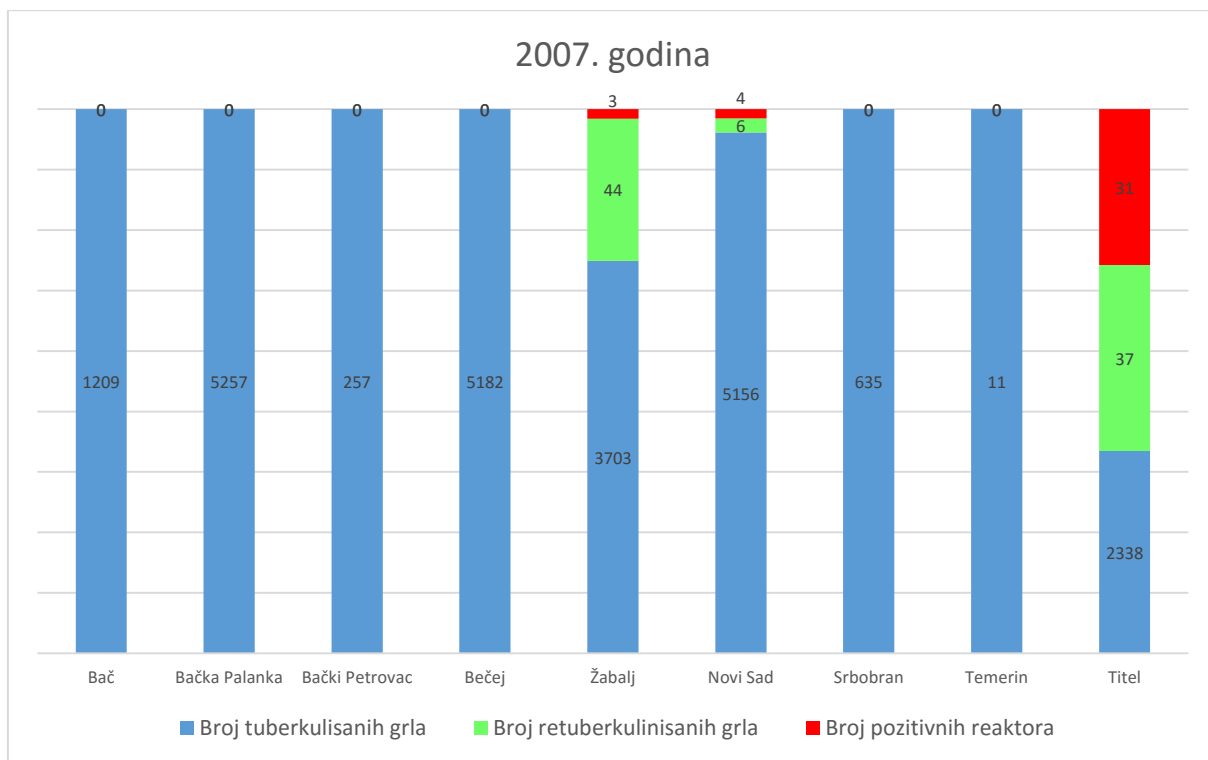
Opština	Naseljeno mesto	Broj pozitivnih reaktora	Broj zaraženih zapata
Novi Sad	Kovilj	113	20
Titel	Gardinovci	8	8
Ukupno	2	121	28

U 2007. godini na teritoriji Južnobačkog okruga ukupno je tuberkulinisano 23.748 goveda, pri čemu je tuberkuloza ustanovljena u 3 opštine i 4 naseljena mesta u ukupno 23 zapata goveda. Po incidenciji pojave tuberkuloze ističe se područje opštine Titel gde je od ukupno pregledanih 2338 grla tuberkuloza dijagnostikovana kod 31 (1,33%) u dva naseljena mesta i 18 gazdinstava.

Tabela 16. Broj tuberkulinisanih i pozitivnih grla u Južnobačkom okrugu u 2007. godini

Opština	Broj tuberkulinisanih grla	Broj retuberkulinisanih grla	Broj pozitivnih reaktora	%
Bač	1209	0	0	0
Bačka Palanka	5257	0	0	0
Bački Petrovac	257	0	0	0
Bečej	5182	0	0	0
Žabalj	3703	44	3	0,08
Novi Sad	5156	6	4	0,08
Srbobran	635	0	0	0
Temerin	11	0	0	0
Titel	2338	37	31	1,33
Ukupno	23748	87	38	0,16

Grafikon 2. Incidencija tuberkuloze goveda u Južnobačkom epizootiološkom području u 2007. godini



Kartogram 3. Geografska raširenost tuberkuloze goveda u Južnobačkom okrugu tokom 2007. godine

Tabela 17. Prikaz broja pozitivnih grla i zaraženih dvorišta po opštinama i naseljenim mestima u 2007. godini

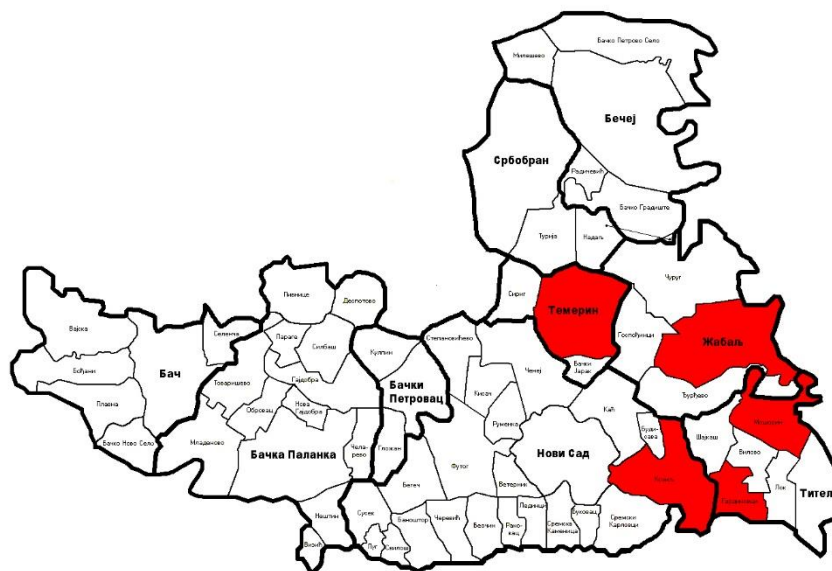
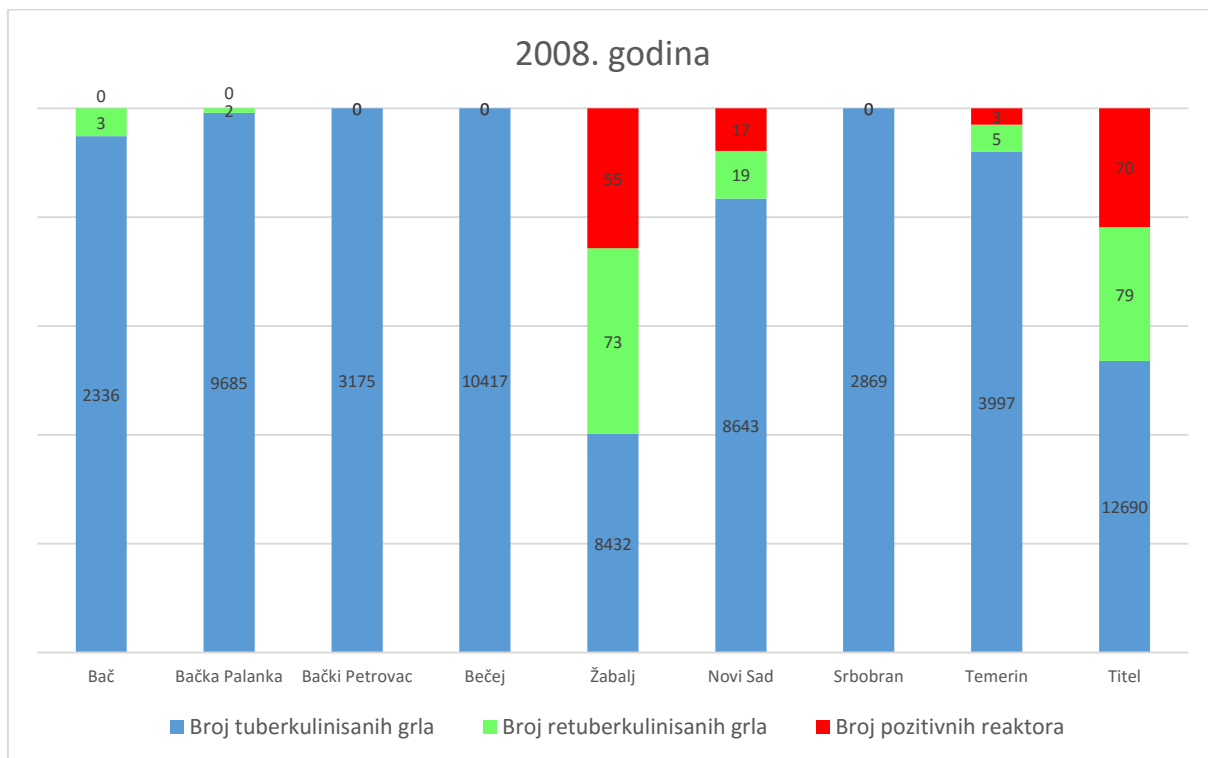
Opština	Naseljeno mesto	Broj pozitivnih reaktora	Broj zaraženih zapata
Novi Sad	Kovilj	4	3
Titel	Gardinovci	30	17
	Vilovo	1	1
Žabalj	Đurđevo	3	2
Ukupno	4	38	23

U 2008. godini dijagnostičkom ispitivanju na tuberkulozu podvrgnuto je 62.244 goveda na teritoriji Južnobačkog okruga, pri čemu je ustanovljeno ukupno 145 (0,23%) pozitivnih reaktora. Pozitivna grla ustanovljena su u četiri opštine, 5 naseljenih mesta i 22 različita zapata goveda. Evidentan je značajan broj novootkrivenih inficiranih grla u opštinama Žabalj, gde je u 7 zapata goveda ustanovljeno 55 pozitivnih jedinki i Titel sa ukupno 70 pozitivnih grla u 2 naseljena mesta i 8 gazdinstava. U ovoj godini prvi put je identifikovan pozitivan zapat u opštini Temerin.

Tabela 18. Broj tuberkulinisanih i pozitivnih grla u Južnobačkom okrugu u 2008. godini

Opština	Broj tuberkulisanih grla	Broj retuberkulisanih grla	Broj pozitivnih reaktora	%
Bač	2336	3	0	0
Bačka Palanka	9685	2	0	0
Bački Petrovac	3175	0	0	0
Bečej	10417	0	0	0
Žabalj	8432	73	55	0,65
Novi Sad	8643	19	17	0,20
Srbobran	2869	0	0	0
Temerin	3997	5	3	0,08
Titel	12690	79	70	0,55
Ukupno	62244	181	145	0,23

Grafikon 3. Incidencija tuberkuloze goveda u Južnobačkom epizootiološkom području u 2008. godini



Kartogram 4. Geografska raširenost tuberkuloze goveda u Južnobačkom okrugu tokom 2008. godine

Tabela 19. Prikaz broja pozitivnih grla i zaraženih dvorišta po opštinama i naseljenim mestima u 2008. godini

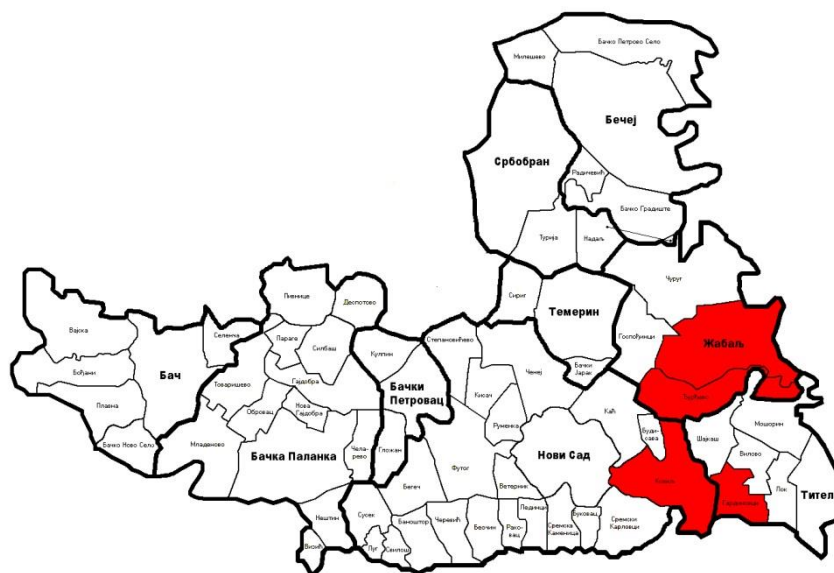
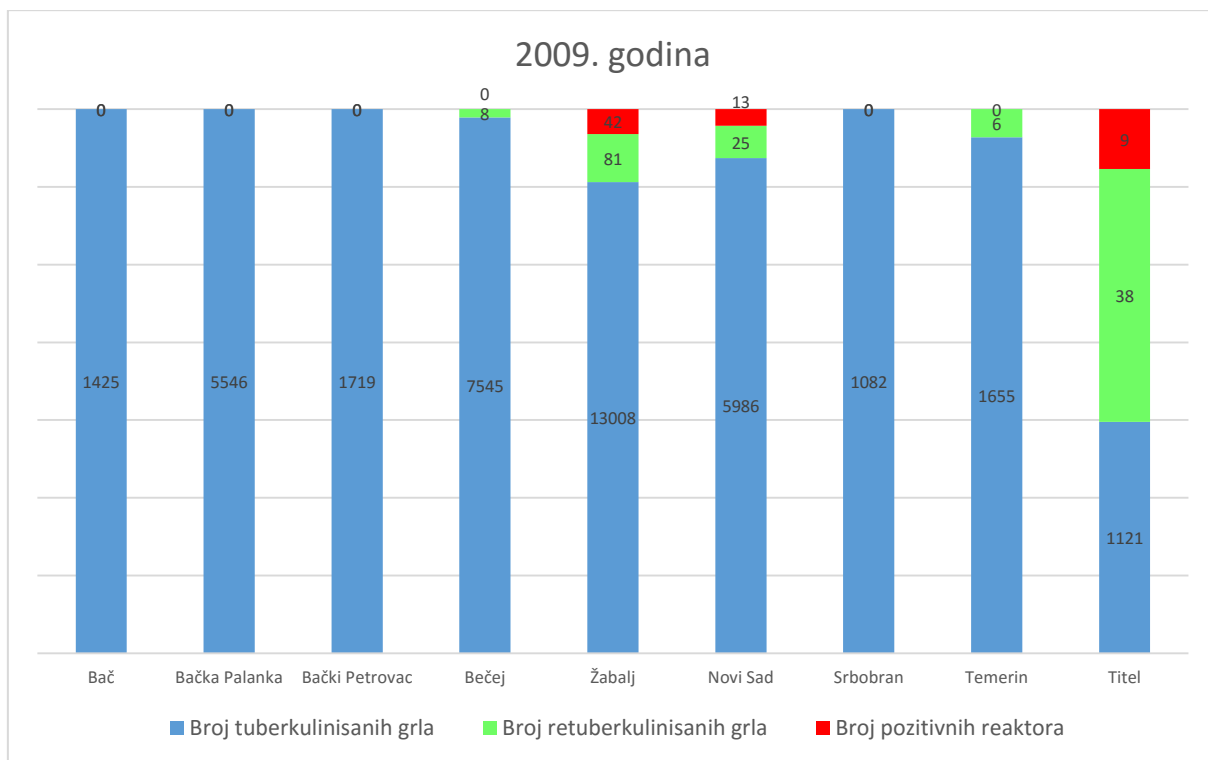
Opština	Naseljeno mesto	Broj pozitivnih reaktora	Broj zaraženih zapata
Novi Sad	Kovilj	17	6
Temerin	Temerin	3	1
Titel	Gardinovci	2	2
	Mošorin	68	6
Žabalj	Žabalj	55	7
Ukupno	5	145	22

U toku 2009. godine na teritoriji Južnobačkog okruga ukupno je dijagnostičkom metodom tuberkulinizacije ispitano 39.087 grla goveda. Od broja ispitanih pozitivna reakcija je ustanovljena kod 64 (0,16%) grla u tri opštine i 28 dvorišta. Najveći broj pozitivnih jedinki utvrđen je u dva žarišta u naseljenim mestima Žabalj gde je ustanovljeno 41 pozitivno grlo u 10 zapata i Kovilj sa 13 pozitivnih grla u 9 gazdinstava. U Kovilju većinom se radilo o gazdinstvima u kojima je i prethodnih godina bila ustanovljena tuberkuloza, ali je usled uklanjanja pozitivnih reaktora u sklopu mera suzbijanja zaraze broj novootkrivenih grla bio mali.

Tabela 20. Broj tuberkulinisanih i pozitivnih grla u Južnobačkom okrugu u 2009. godini

Opština	Broj tuberkulisanih grla	Broj retuberkulisanih grla	Broj pozitivnih reaktora	%
Bač	1425	0	0	0
Bačka Palanka	5546	0	0	0
Bački Petrovac	1719	0	0	0
Bečej	7545	8	0	0
Žabalj	13008	81	42	0,32
Novi Sad	5986	25	13	0,22
Srbobran	1082	0	0	0
Temerin	1655	6	0	0
Titel	1121	38	9	0,8
Ukupno	39087	158	64	0,16

Grafikon 4. Incidencija tuberkuloze goveda u Južnobačkom epizootičkom području u 2009. godini



Kartogram 5. Geografska raširenost tuberkuloze goveda u Južnobačkom okrugu tokom 2009. godine

Tabela 21. Prikaz broja pozitivnih grla i zaraženih dvorišta po opštinama i naseljenim mestima u 2009. godini

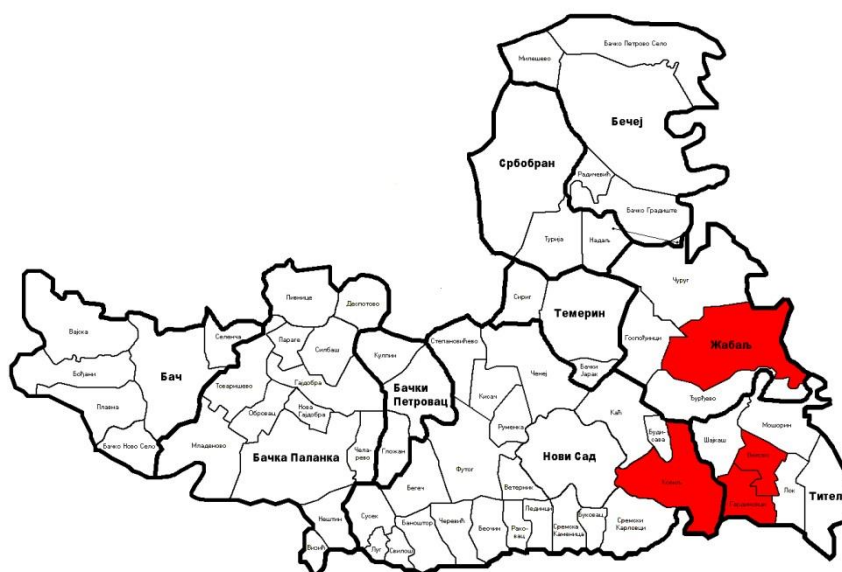
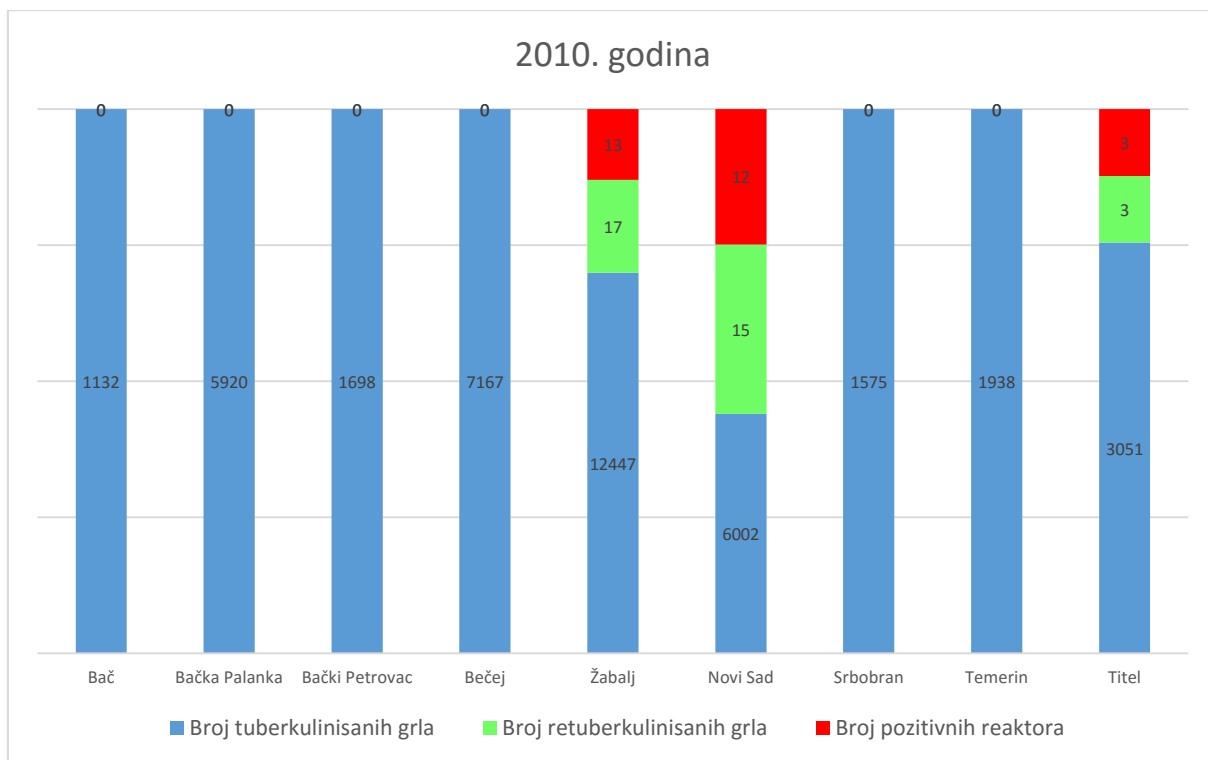
Opština	Naseljeno mesto	Broj pozitivnih reaktora	Broj zaraženih zapata
Novi Sad	Kovilj	13	9
Titel	Gardinovci	9	8
Žabalj	Žabalj	41	10
	Đurđevo	1	1
Ukupno	4	64	28

U toku 2010. godine na teritoriji Južnobačkog okruga ukupno je na prisustvo tuberkuloze dijagnostički ispitano 40.930 grla goveda. Od broja ispitanih pozitivna reakcija je ustanovljena kod 28 (0,07%) grla u tri opštine i 14 zapata goveda. Najveći broj pozitivnih jedinki utvrđen je u dva žarišta u naseljenim mestima Žabalj gde je ustanovljeno 13 pozitivnih grla u 5 zapata i Kovilj sa 12 pozitivnih grla u 6 gazdinstava. Tuberkuloza je po prvi put ustanovljena u 1 zapatu goveda u naseljenom mestu Vilovo, i 1 u naseljenom mestu Gardinovci. U Kovilju i Žablju većinom se radilo o gazdinstvima u kojima je prethodnih godina vršeno suzbijanje tuberkuloze.

Tabela 22. Broj tuberkulinisanih i pozitivnih grla u Južnobačkom okrugu u 2010. godini

Opština	Broj tuberkulinisanih grla	Broj retuberkulinisanih grla	Broj pozitivnih reaktora	%
Bač	1132	0	0	0
Bačka Palanka	5920	0	0	0
Bački Petrovac	1698	0	0	0
Bečej	7167	0	0	0
Žabalj	12447	17	13	0,10
Novi Sad	6002	15	12	0,20
Srbobran	1575	0	0	0
Temerin	1938	0	0	0
Titel	3051	3	3	0,10
Ukupno	40930	35	28	0,07

Grafikon 5. Incidencija tuberkuloze goveda u Južnobačkom epizootičkom području u 2010. godini



Kartogram 6. Geografska raširenost tuberkuloze goveda u Južnobačkom okrugu tokom 2010. godine

Tabela 23. Prikaz broja pozitivnih grla i zaraženih dvorišta po opštinama i naseljenim mestima u 2010. godini

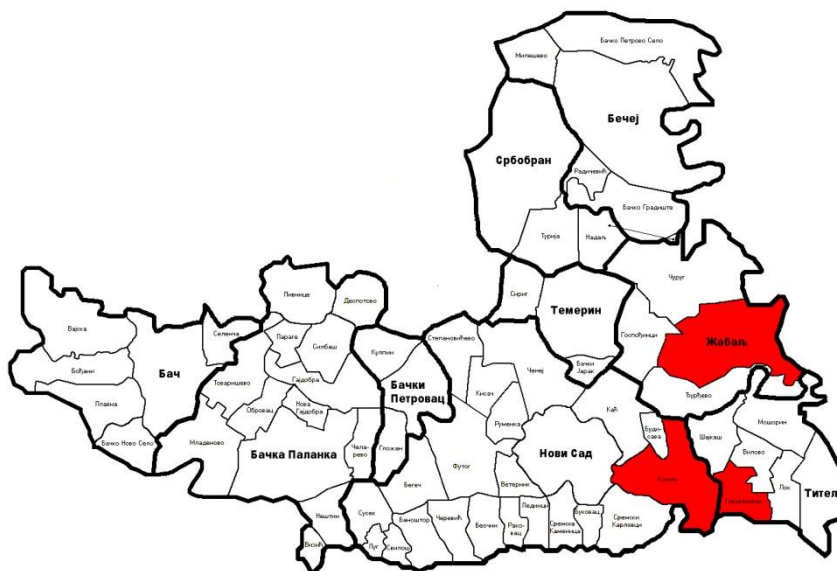
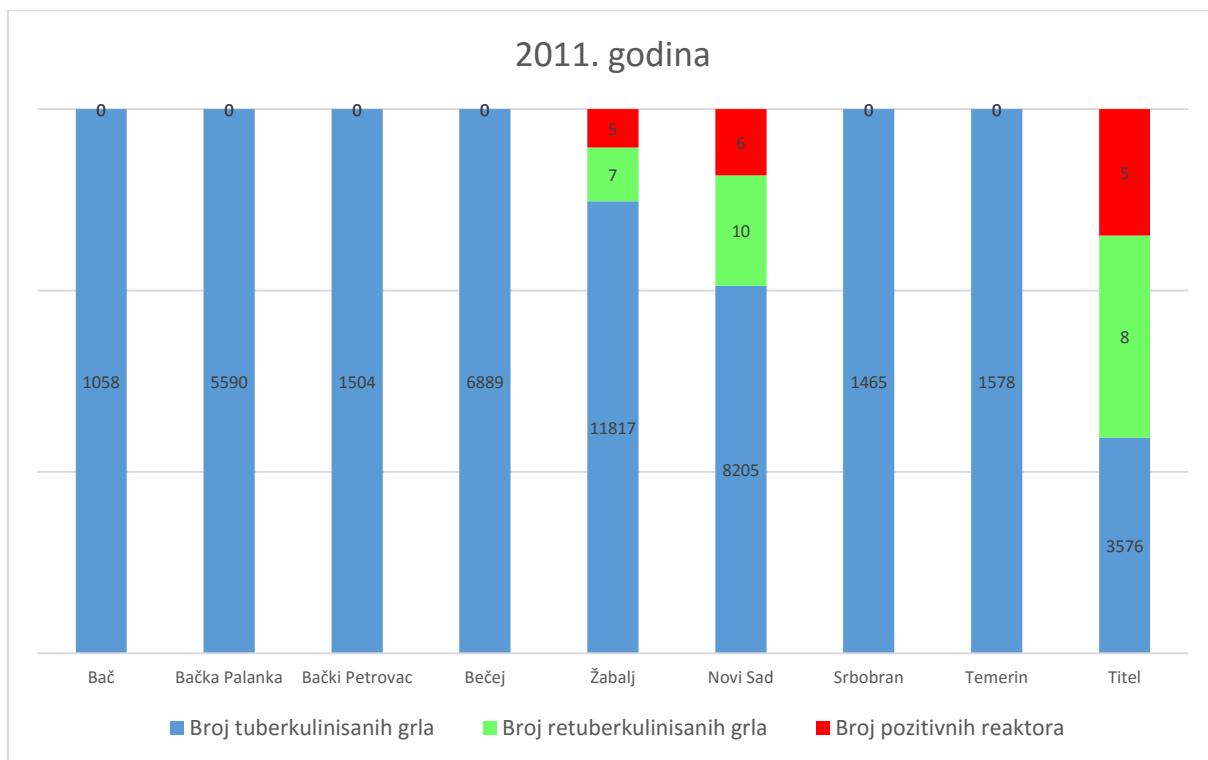
Opština	Naseljeno mesto	Broj pozitivnih reaktora	Broj zaraženih zapata
Novi Sad	Kovilj	12	6
Titel	Gardinovci	2	2
	Vilovo	1	1
Žabalj	Žabalj	13	5
Ukupno	4	28	14

U 2011. godini dijagnostičkom ispitivanju na tuberkulozu podvrgnuto je 41.682 goveda na teritoriji Južnobačkog okruga, pri čemu je ustanovljeno ukupno 16 (0,04%) pozitivnih reaktora. Pozitivna grla ustanovljena su u tri opštine, 3 naseljena mesta i 12 zapata goveda. Primetan je značajan pad incidencije infekcije, međutim u 4 zapata uočeno je održavanje infekcije u niskom intenzitetu.

Tabela 24. Broj tuberkulinisanih i pozitivnih grla u Južnobačkom okrugu u 2011. godini

Opština	Broj tuberkulinisanih grla	Broj retuberkulinisanih grla	Broj pozitivnih reaktora	%
Bač	1058	0	0	0
Bačka Palanka	5590	0	0	0
Bački Petrovac	1504	0	0	0
Bečej	6889	0	0	0
Žabalj	11817	7	5	0,04
Novi Sad	8205	10	6	0,07
Srbobran	1465	0	0	0
Temerin	1578	0	0	0
Titel	3576	8	5	0,14
Ukupno	41682	25	16	0,04

Grafikon 6. Incidencija tuberkuloze goveda u Južnobačkom epizootiološkom području u 2011. godini



Kartogram 7. Geografska raširenost tuberkuloze goveda u Južnobačkom okrugu tokom 2011. godine

Tabela 25. Prikaz broja pozitivnih grla i zaraženih dvorišta po opštinama i naseljenim mestima u 2011. godini

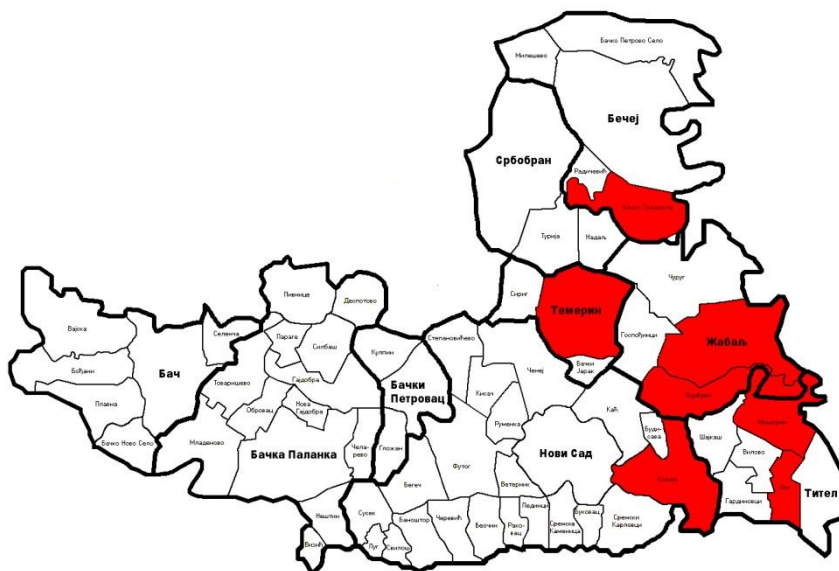
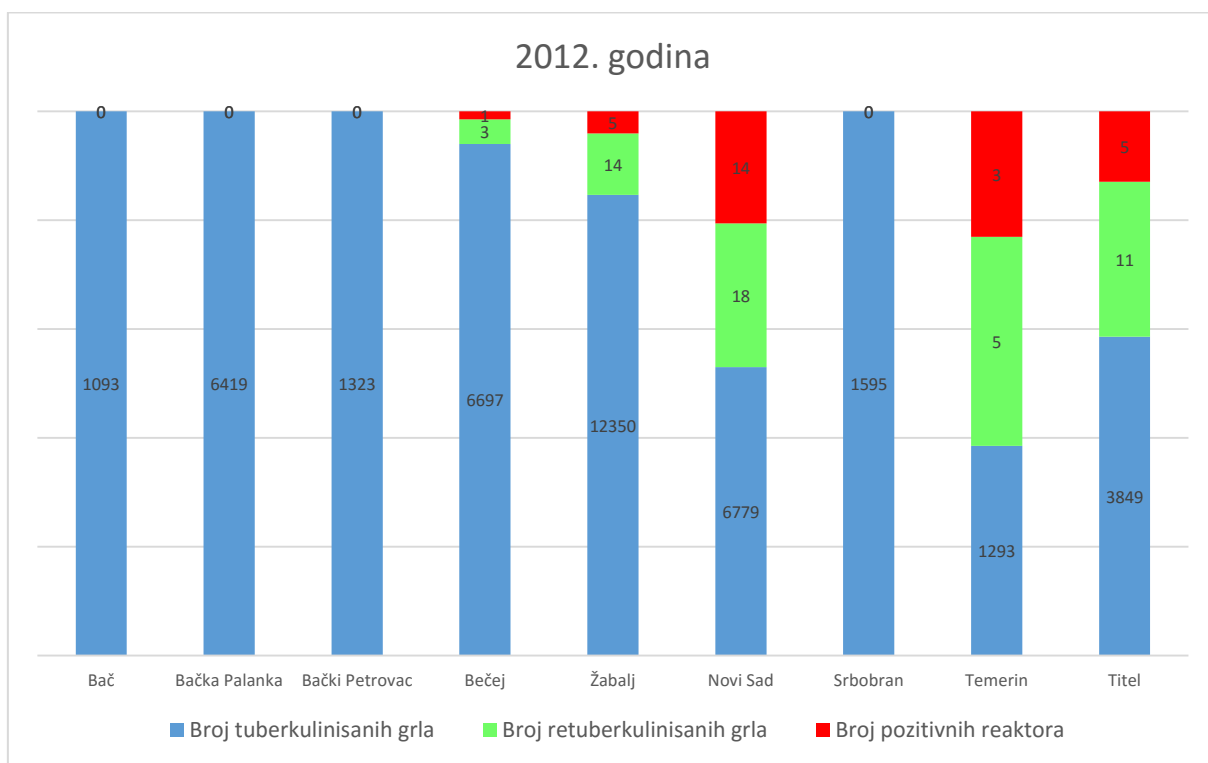
Opština	Naseljeno mesto	Broj pozitivnih reaktora	Broj zaraženih zapata
Novi Sad	Kovilj	6	6
Titel	Gardinovci	5	3
Žabalj	Žabalj	5	3
Ukupno	3	16	12

U toku 2012. godine ukupno je na prisustvo tuberkuloze dijagnostički ispitano 41.398 grla goveda. Od broja ispitanih pozitivna reakcija je ustanovljena kod 28 (0,07%) grla u 5 opština, 7 naseljenih mesta i 14 zapata goveda. Najveći broj pozitivnih jedinki ponovo je utvrđen u dva žarišta, u naseljenim mestu Kovilj (14), Žabalj (5) i Titel (5), prvi put pozitivno grlo ustanovljeno je u opštini Bečej, naseljenom mestu Bačko Gradište, dok se u Temerinu radilo o istom dvorištu u kojem je tuberkuloza već dijagnostikovana 2008. godine.

Tabela 26. Broj tuberkulinisanih i pozitivnih grla u Južnobačkom okrugu u 2012. godini

Opština	Broj tuberkulinisanih grla	Broj retuberkulinisanih grla	Broj pozitivnih reaktora	%
Bač	1093	0	0	0
Bačka Palanka	6419	0	0	0
Bački Petrovac	1323	0	0	0
Bečej	6697	3	1	0,02
Žabalj	12350	14	5	0,04
Novi Sad	6779	18	14	0,21
Srbobran	1595	0	0	0
Temerin	1293	5	3	0,23
Titel	3849	11	5	0,13
Ukupno	41398	51	28	0,07

Grafikon 7. Incidencija tuberkuloze goveda u Južnobačkom epizootiološkom području u 2012. godini



Kartogram 8. Geografska raširenost tuberkuloze goveda u Južnobačkom okrugu tokom 2012. godine

Tabela 27. Prikaz broja pozitivnih grla i zaraženih dvorišta po opštinama i naseljenim mestima u 2012. godini

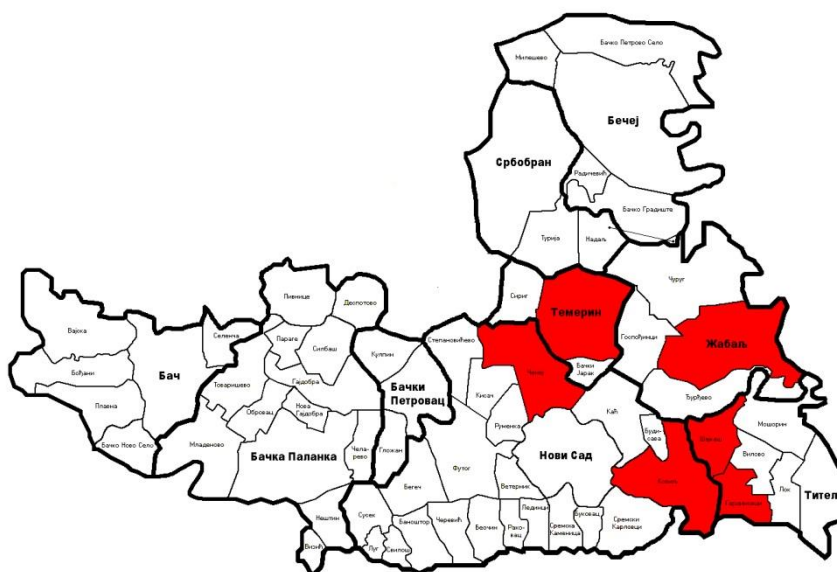
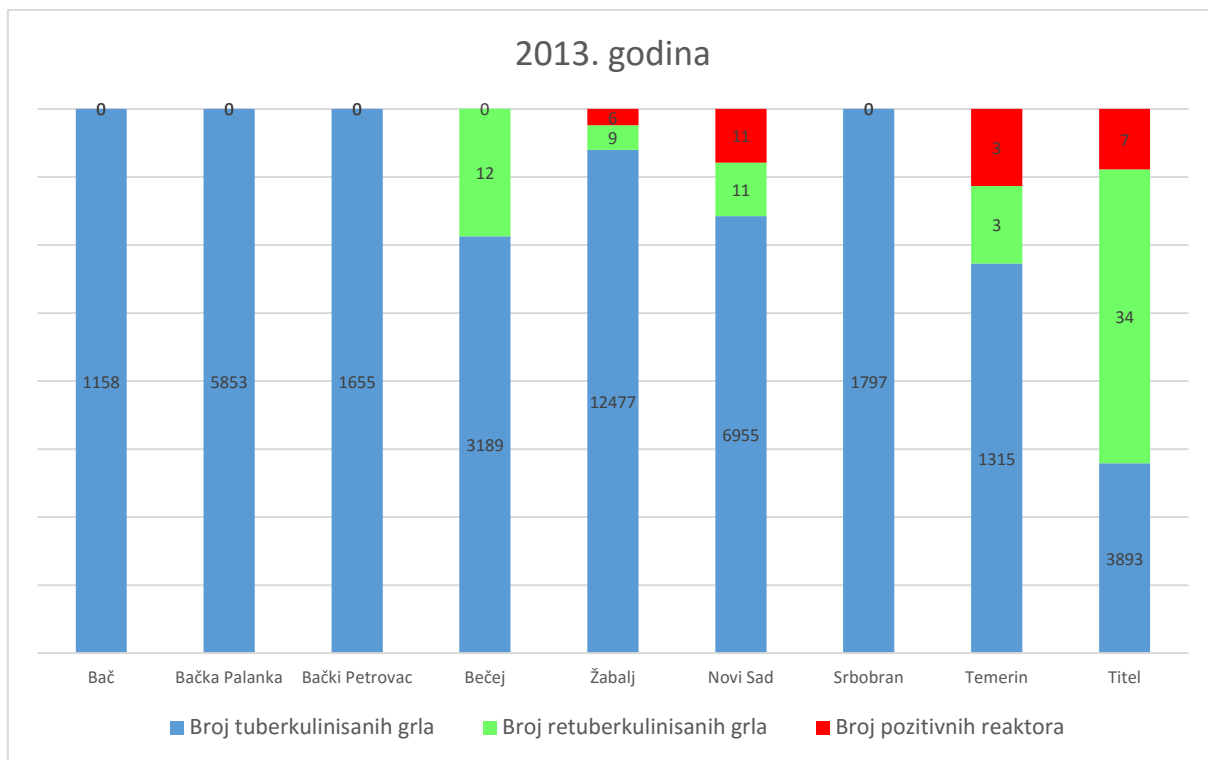
Opština	Naseljeno mesto	Broj pozitivnih reaktora	Broj zaraženih zapata
Bečej	Bačko Gradište	1	1
Novi Sad	Kovilj	14	6
Temerin	Temerin	3	1
Titel	Mošorin	4	1
	Lok	1	1
Žabalj	Žabalj	3	2
	Đurđevo	2	2
Ukupno	7	28	14

U 2013. godini dijagnostičkom ispitivanju na tuberkulozu podvrgnuto je 38.292 goveda na teritoriji Južnobačkog okruga, pri čemu je ustanovljeno ukupno 27 (0,07%) pozitivnih reaktora. Pozitivna grla ustanovljena su u 4 opštine (Žabalj, Novi Sad, Temerin, Titel), 6 naseljenih mesta i 15 zapata goveda. Po prvi put pozitivna reakcija ustanovljena je kod jednog grla u Čeneju (opština Novi Sad), ali poreklo goveda nije moglo biti precizno utvrđeno, jer se radilo o nelegalnom prometu životinja. U Temerinu tuberkuloza je ustanovljena kod goveda u istom gazdinstvu kao i prethodne godine.

Tabela 28. Broj tuberkulinisanih i pozitivnih grla u Južnobačkom okrugu u 2013. godini

Opština	Broj tuberkulisanih grla	Broj retuberkulisanih grla	Broj pozitivnih reaktora	%
Bač	1158	0	0	0
Bačka Palanka	5853	0	0	0
Bački Petrovac	1655	0	0	0
Bečej	3189	12	0	0
Žabalj	12477	9	6	0,048
Novi Sad	6955	11	11	0,158
Srbobran	1797	0	0	0
Temerin	1315	3	3	0,228
Titel	3893	34	7	0,179
Ukupno	38292	69	27	0,07

Grafikon 8. Incidencija tuberkuloze goveda u Južnobačkom epizootičkom području u 2013. godini



Kartogram 9. Geografska raširenost tuberkuloze goveda u Južnobačkom okrugu tokom 2013. godini

Tabela 29. Prikaz broja pozitivnih grla i zaraženih dvorišta po opštinama i naseljenim mestima u 2013. godini

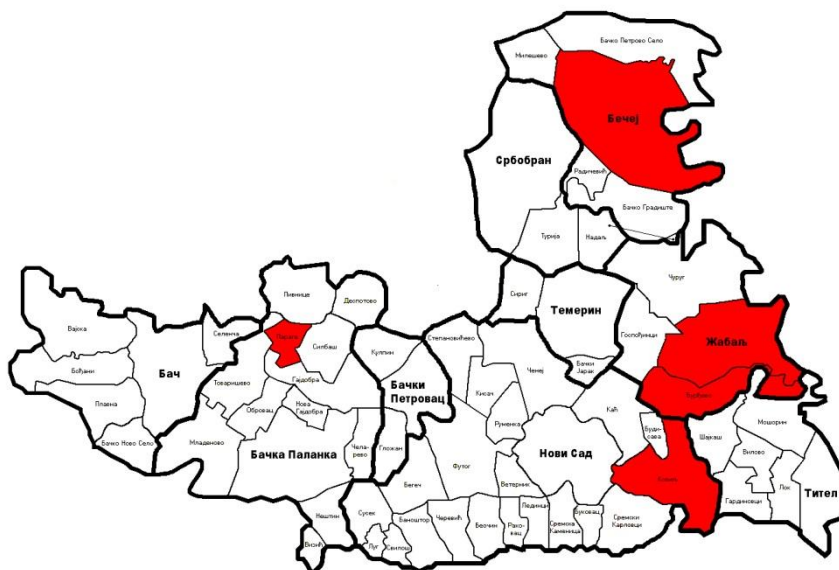
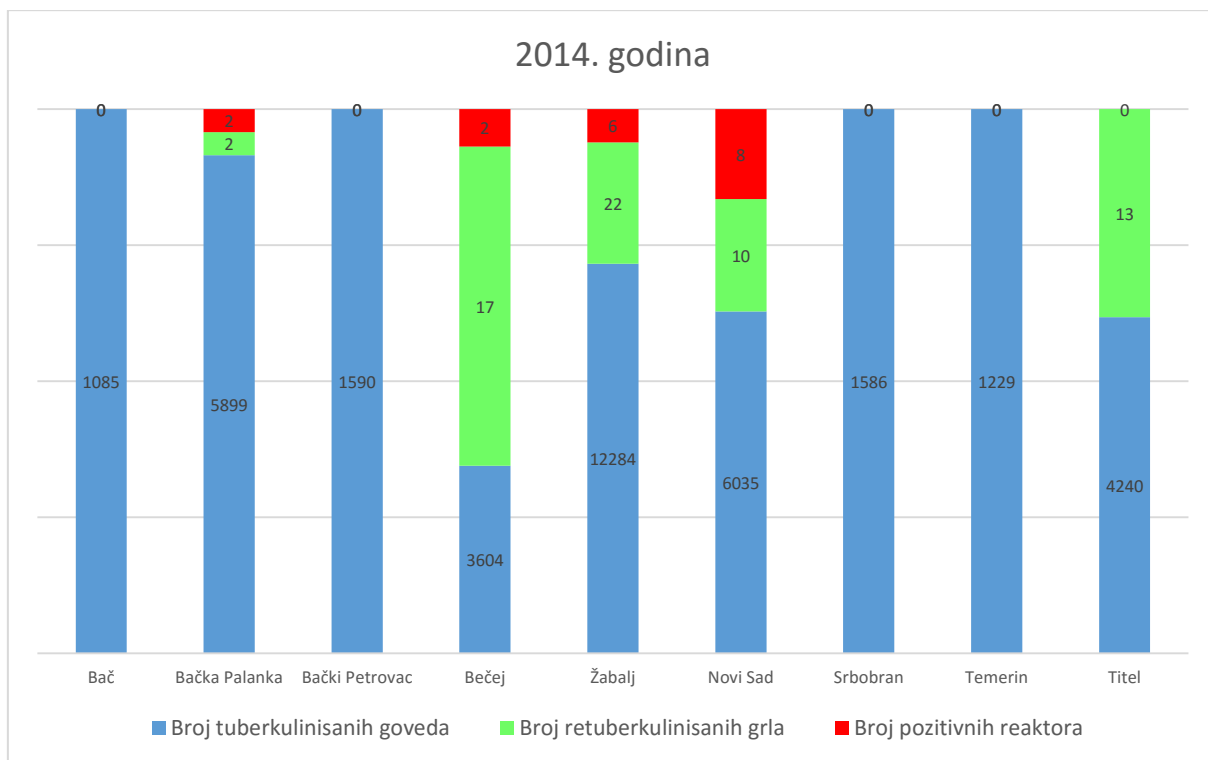
Opština	Naseljeno mesto	Broj pozitivnih reaktora	Broj zaraženih zapata
Novi Sad	Kovilj	10	7
	Čenej	1	1
Temerin	Temerin	3	1
Titel	Šajkaš	2	2
	Gardinovci	5	3
Žabalj	Žabalj	6	1
Ukupno	6	27	15

Tokom 2014. godine na prisustvo tuberkuloze dijagnostički je ispitano ukupno 37.552 grla goveda. Od ovog broja pozitivna reakcija je ustanovljena kod 18 (0,05%) grla u 4 opštine, 5 naseljenih mesta i 14 zapata goveda. Najveći broj pozitivnih jedinki ponovo je detektovan u dva endemska žarišta u naseljenim mestima Kovilj (8) i opštini Žabalj (6). Prvi put pozitivna grla ustanovljena su u naseljenom mestu Parage, (opština Bačka Palanka), ali epizootiološkom analizom ustanovljeno je da se radi o govedima kupljenim u Kovilju, iz zapata koji je u proteklim godinama u više navrata imao pozitivne reaktore. U Bečeju je od 17 grla sumnjivih prilikom izvođenja monotesta kod 2 ustanovljena pozitivna reakcija prilikom komparativne tuberkulinizacije.

Tabela 30. Broj tuberkulinisanih i pozitivnih grla u Južnobačkom okrugu u 2014. godini

Opština	Broj tuberkulisanih grla	Broj retuberkulisanih grla	Broj pozitivnih reaktora	%
Bač	1085	0	0	0
Bačka Palanka	5899	2	2	0,03
Bački Petrovac	1590	0	0	0
Bečej	3604	17	2	0,06
Žabalj	12284	22	6	0,05
Novi Sad	6035	10	8	0,13
Srbobran	1586	0	0	0
Temerin	1229	0	0	0
Titel	4240	13	0	0
Ukupno	37552	64	18	0,05

Grafikon 9. Incidencija tuberkuloze goveda u Južnobačkom epizootiološkom području u 2014. godini



Kartogram 10. Geografska raširenost tuberkuloze goveda u Južnobačkom okrugu tokom 2014. godini

Tabela 31. Prikaz broja pozitivnih grla i zaraženih dvorišta po opštinama i naseljenim mestima u 2014. godini

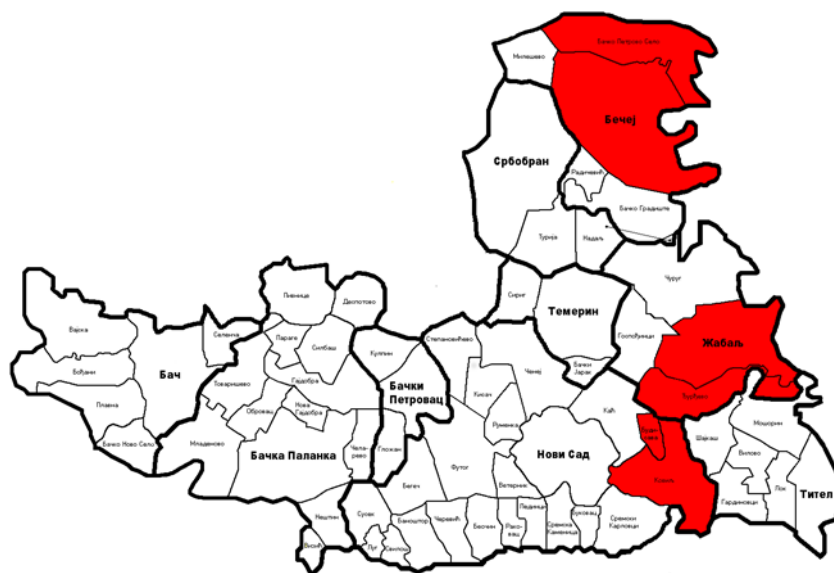
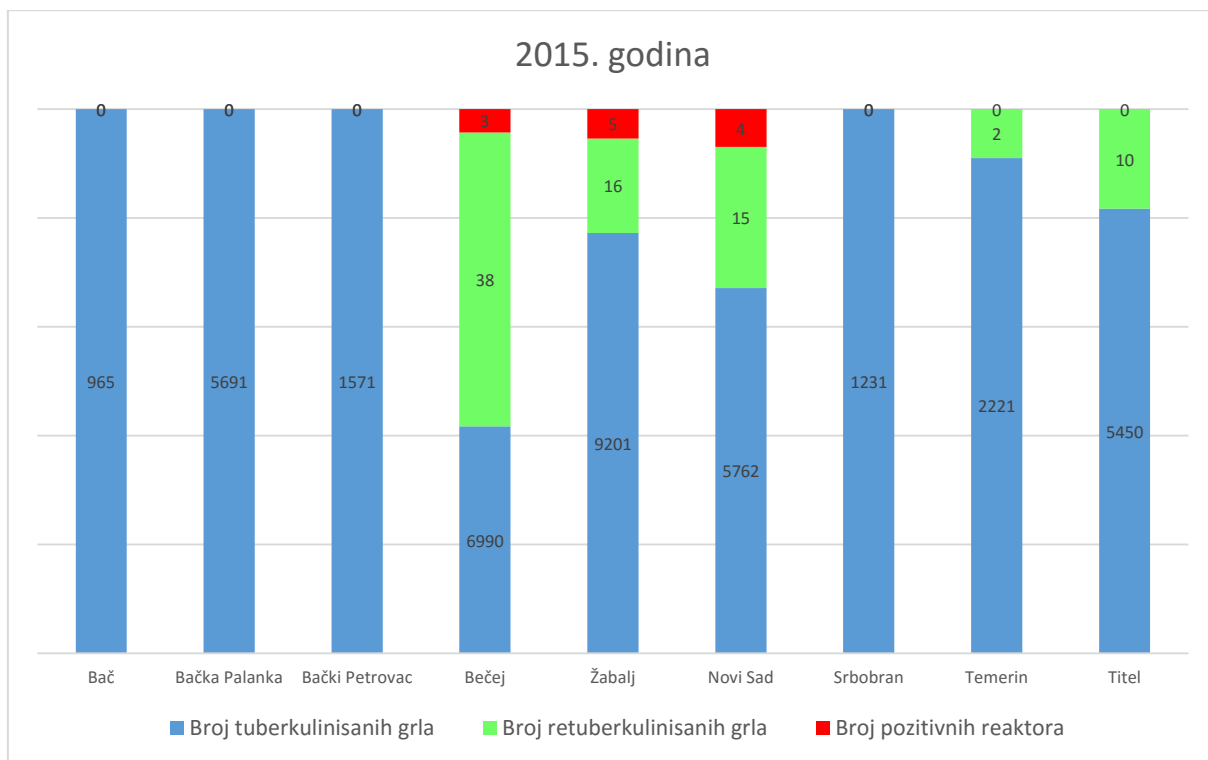
Opština	Naseljeno mesto	Broj pozitivnih reaktora	Broj zaraženih zapata
Bačka Palanka	Parage	2	1
Bečej	Bečej	2	2
Novi Sad	Kovilj	8	8
Žabalj	Žabalj	4	2
	Đurđevo	2	1
Ukupno	5	18	14

U 2015. godini od ukupno tuberkulinisanih 39.082 goveda u Južnobačkom okrugu, pozitivna reakcija je ustanovljena kod 12 (0,03%) grla u 3 opštine, 6 naseljenih mesta i 9 zapata goveda. Najveći broj pozitivnih jedinki ponovo je detektovan u dva endemska žarišta u naseljenim mestima Kovilj (8) i dva naseljena mesta u opštini Žabalj (6). U opštini Bečej je od 38 grla sumnjivih ili pozitivnih prilikom izvođenja monotesta kod 3 ustanovljena pozitivna reakcija prilikom komparativne tuberkulinizacije, što može ukazati da se radi o regionu u kome je rasprostranjena pojava nespecifične senzibilizacije. Jedino pozitivno grlo koje je otkriveno u naseljenom mestu Budisava, kupljeno je preko posrednika, i pre dolaska na gazdinstvo promenilo je više vlasnika.

Tabela 32. Broj tuberkulinisanih i pozitivnih grla u Južnobačkom okrugu u 2015. godini

Opština	Broj tuberkulinisanih grla	Broj retuberkulinisanih grla	Broj pozitivnih reaktora	%
Bač	965	0	0	0
Bačka Palanka	5691	0	0	0
Bački Petrovac	1571	0	0	0
Bečej	6990	38	3	0,04
Žabalj	9201	16	5	0,05
Novi Sad	5762	15	4	0,07
Srbobran	1231	0	0	0
Temerin	2221	2	0	0
Titel	5450	10	0	0
Ukupno	39082	81	12	0,03

Grafikon 10. Incidencija tuberkuloze goveda u Južnobačkom epizootiološkom području u 2015. godini



Kartogram 11. Geografska raširenost tuberkuloze goveda u Južnobačkom okrugu tokom 2015. godini

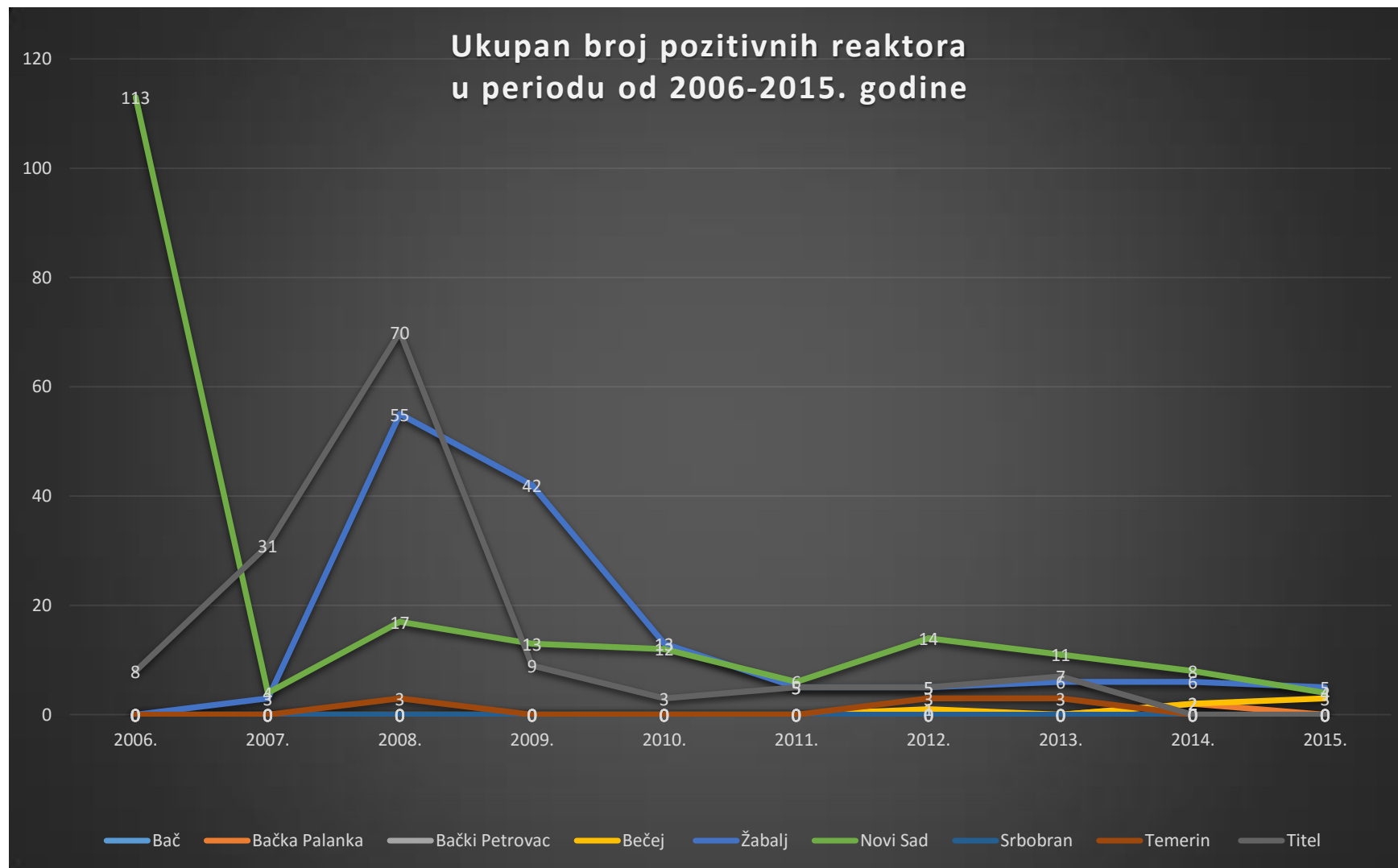
Tabela 33. Prikaz broja pozitivnih grla i zaraženih dvorišta po opštinama i naseljenim mestima u 2015. godini

Opština	Naseljeno mesto	Broj pozitivnih reaktora	Broj zaraženih zapata
Bečej	Bečej	1	1
	Bačko Petrovo Selo	2	1
Novi Sad	Kovilj	3	2
	Budisava	1	1
Žabalj	Žabalj	3	2
	Đurđevo	2	2
Ukupno	6	12	9

Tabela 34. Ukupan broj test pozitivnih goveda na tuberkulozu u Južnobačkom okrugu u periodu 2006-2015. godine

Opština	2006. g.	2007. g.	2008. g.	2009. g.	2010. g.	2011. g.	2012. g.	2013. g.	2014. g.	2015. g.	Ukupno
Bač	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bačka Palanka	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	2
Bački Petrovac	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bečej	0	0	0	0	0	0	1	0	2	3	6
Žabalj	0	3	55	42	13	5	5	6	6	5	140
Novi Sad	113	4	17	13	12	6	14	11	8	4	202
Srbobran	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Temerin	0	0	3	0	0	0	3	3	0	0	9
Titel	8	31	70	9	3	5	5	7	0	0	138
Ukupno	121	38	145	64	28	16	28	27	12	12	497

Grafikon 11. Kretanje incidencije tuberkuloze goveda u Južnobačkom okrugu u periodu 2006-2015.



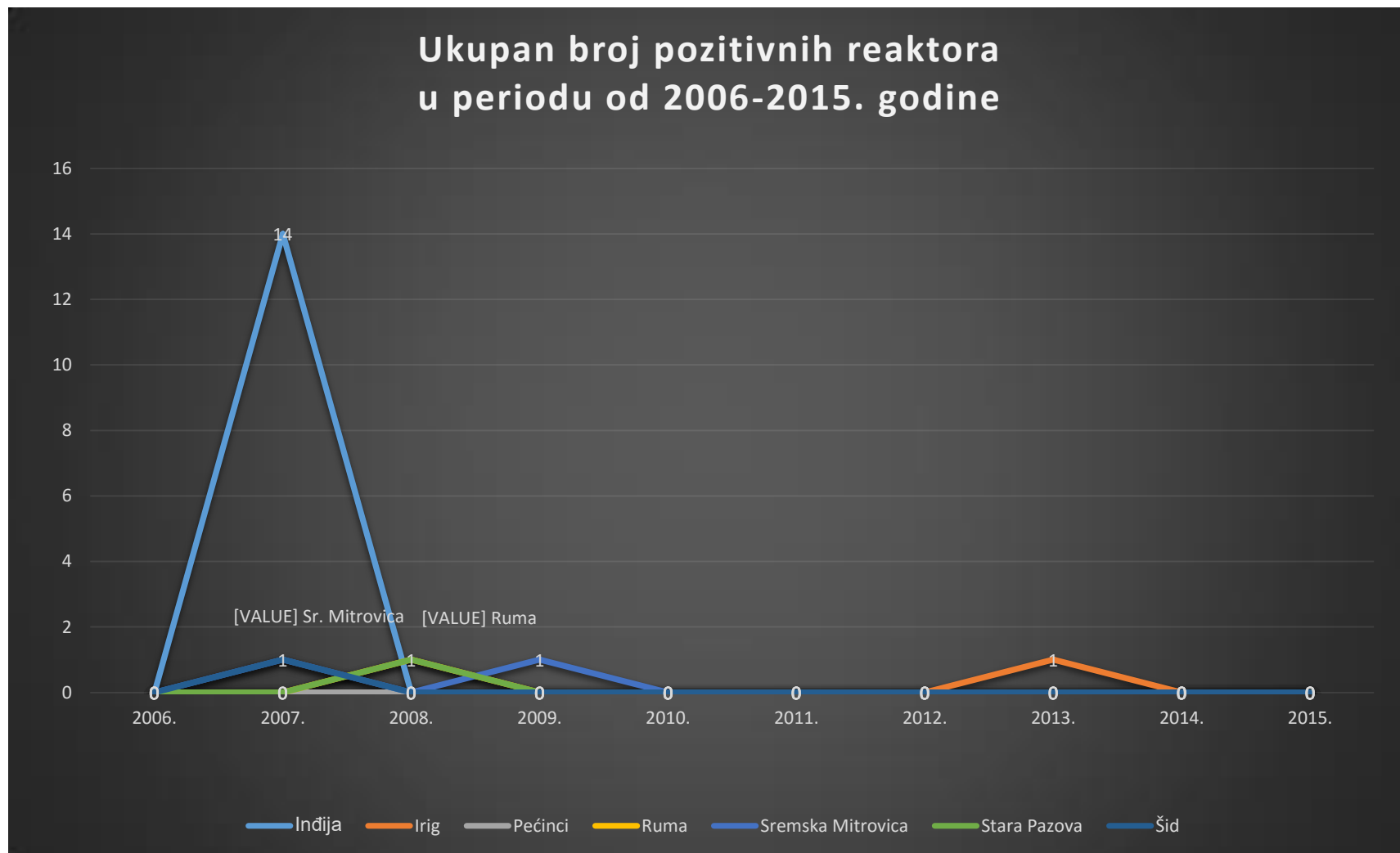
5.4.2. Rezultati ispitivanja raširenosti i prevalencije tuberkuloze goveda u Sremskom okrugu u periodu 2006-2015.

Ispitivanja incidencije i prevalencije tuberkuloze goveda u Sremskom regionu pokazuju znatno povoljniju epizootiološku situaciju u odnosu na Južnobački region. Tokom 2006. ukupno je pregledano 34.504 goveda i nije otkriveno ni jedno pozitivno grlo. U 2007. godini dijagnostičkoj tuberkulinizaciji podvrgnuto je 31.950 goveda a pozitivna reakcija ustanovljena je kod 16 (0,05%) grla u tri opštine (Indija, Sremska Mitrovica i Šid) i tri naseljena mesta Beška, Adaševci i Sremska Mitrovica. Epizootiološkom analizom ustanovljeno je da se grla iz sva tri pozitivna zapata u Beški, tokom sezone napasaju u Koviljskom ritu, a onda vraćaju na prezimljavanje u gazdinstva. Jedno pozitivno grlo detektovano u Sremskoj Mitrovici, kupljeno je na vašaru u Žablju. Pozitivno grlo u Adaševcima (opština Šid), je točno june poreklom iz neutvrđenog regiona uže Srbije, kupljeno preko posrednika. U 2008. godini od ukupno ispitanih 57.557 goveda pozitivna su bila dva grla u 2 gazdinstva. Jedno grlo u opštini Ruma, u naseljenom mestu Putinci, koje je kupljeno od preprodavaca i 1 grlo u naseljenom mestu Golubinci u opštini Stara Pazova, koje je poticalo iz zapata od oko 40 muznih krava. Tokom 2009. godine u Sremskom okrugu tuberkulinisano je 41.859 goveda, pri čemu je ustanovljeno samo 1 pozitivno grlo u opštini Sremska Mitrovica, u naseljenom mestu Kuzmin. Interesantno je naglasiti da je u opštini Stara Pazova u naseljenom mestu Surduk, izvršena retuberkulinizacija kod 7 grla, komparativnim testom pri čemu ni kod jednog grla nije ustanovljena pozitivna reakcija. U 2010. godini pregledano je 35.825 goveda i nije ustanovljeno ni jedno pozitivno grlo. Slična situacija bila je i tokom 2011., kada je preledano 41.856 grla i 2012. godine kada je tuberkulinisano 38.415 grla i nije ustanovljena ni jedna pozitivna reakcija. U 2013. godini od 30.691 tuberkulinisanog grla pozitivna reakcija ustanovljena je kod 1 grla u opštini Irig u naseljenom mestu Šatrinci. Tokom 2014. godine na prisustvo tuberkuloze pregledano je 34.619 grla i nije ustanovljena ni jedna pozitivna reakcija, a slična situacija bila je i u 2015. godini kada je tuberkulinisano 34.783 grla i ni kod jednog nije ustanovljena sumnjiva ili pozitivna reakcija. Ukupna incidencija pozitivnih grla u posmatranom periodu nije prelazila 0,05 %, a prevalencija pozitivnih zapata 0,13%. Rezultati ovih ispitivanja prikazani su u tabeli 35 i grafikonu 12.

Tabela 35. Ukupan broj test pozitivnih goveda na tuberkulozu u Sremskom okrugu u periodu 2006-2015. godine

Opština	2006. g.	2007. g.	2008. g.	2009. g.	2010. g.	2011. g.	2012. g.	2013. g.	2014. g.	2015. g.	Ukupno
Indija	0	14	0	0	0	0	0	0	0	0	14
Irig	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
Pećinci	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ruma	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
Sr Mitrovica	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	2
Št Pazova	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
Šid	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Ukupno	0	16	2	1	0	0	0	1	0	0	20

Grafikon 12. Grafički prikaz kretanja incidencije tuberkuloze goveda u Sremskom okrugu u periodu 2006-2015.



6. DISKUSIJA

Tuberkuloza goveda uzrokovana prvenstveno sa *M.bovis* i u nešto manjem obimu sa *M.caprae*, endemski je prisutna u mnogim evropskim državama ili pojedinim regionima i predstavlja značajan zdravstveni i ekonomski problem. U zemljama Trećeg sveta sa slabo razvijenom veterinarskom infrastrukturom i odsustvom bilo kakvih državnih programa kontrole i eradikacije, o raširenosti i prevalenciji tuberkuloze goveda i drugih bovida, malo je validnih podataka. Sa epizootiološkog aspekta, neće biti pogrešno reći da nema zemlje niti klimatskog područja u svetu gde infekcija nije prisutna u nekom obimu. Čak i u državama zvanično slobodnim od tuberkuloze goveda, povremeno se otkrivaju žarišta, što se pripisuje širenju infekcije sa divljači na goveda ili reaktivaciji latentnih infekcija. Kontrola i eradikacija tuberkuloze u najvećem broju država, zasnivaju se na dijagnostičkom ispitivanju i sanitarnom klanju inficiranih jedinki i/ili inspeksijskom nadzoru u klanicama. Međutim, uprkos znatnim finansijskim sredstvima i intenzivnim naporima koji se decenijama ulažu u cilju kontrole i iskorenjivanja tuberkuloze goveda, ova bolest ostaje problem na globalnom nivou.

Istraživanjem incidencije i prevalencije tuberkuloze goveda u Vojvodini, kao i izolacijom i molekularnom karakterizacijom, odnosno genotipizacijom dobijenih izolata MTB-kompleksa, i ispitivanjem njihove antimikrobne osetljivosti, dobijeni su veoma značajni podaci važni za dalje suzbijanje tuberkuloze u našoj zemlji.

6.1. Utvrđivanje prisustva, izolacija i bakteriološka identifikacija uzročnika tuberkuloze goveda

Ispitivanje prisustva i determinacija bakterija MTB-kompleksa klasičnim bakteriološkim metodama; bojenjem preparata direkno iz materijala, zasejavanjem na selektivnim podlogama i primenom standardnih biohemijskih testova izvršeno je u uzorcima tkiva 49 goveda koja su bila pozitivna na komparativnom tuberkulinskom testu. Kod 40 od ovih grla su prilikom patomorfološkog pregleda na liniji klanja na limfnim čvorovima i/ili plućima uočene lezije koje mogu ukazivati na tuberkulozu. Sva ispitivana goveda poticala su iz četiri opštine Južnobačkog i dve Sremskog okruga. U ranijim istraživanjima koja su bila u sklopu izrade ove doktorske disertacije (Pušić i sar., 2009) u opštinama Južnobačkog okruga iz kojih potiču ispitivana goveda

registrovana su žarišta tuberkuloze u kojima je oboljenje bilo endemski prisutno. Direktnim mikroskopskim pregledom preparata obojenih po Ziehl-Neelsen-u, prisustvo acidorezistentnih štapićastih bakterija (ACR) ustanovljeno je u uzorcima tkiva 14 goveda (28,6%). Ovakav rezultat može biti posledica činjenice, da u patomorfološkom supstratu tuberkuloznog procesa, kod goveda dominiraju kazeozno-nekrotične lezije, u kojima su acidorezistentni bacili generalno prisutni u malom broju, tj. paucibacilarno, za razliku od ljudi gde kazeo-nekrotične lezije pokazuju tendenciju ka likvefakviji i stvaranju kavitacija u zahvaćenom plućnom tkivu uz prisustvo velikog broja ACR bakterija (Waters i sar., 2014). Sa druge strane, Nebreda i sar., (2016) opisujući slučaj tuberkuloznog peritonitisa kod čoveka uzrokovanog sa *M.caprae*, ističu da uprkos višestrukome uzorkovanju nisu uspeali da dokažu prisustvo ACR bacila u peritonealnom eksudatu, te da je konačna dijagnoza infekcije postavljena tek nakon 6 meseci. Takođe, Gormley i sar. (2014), navode da direktna mikroskopija razmaza bojenih po Ziehl-Neelsen, iako najbrža, najjednostavnija za izvođenje i najjeftinija metoda za potvrdu tuberkuloze, poseduje veoma nisku osetljivost, koja se može neznatno povećati dodavanjem fluorescentne acido-reizistentne boje auramina.

Kultivacijom na podlogama po Löwenstein-Jensen-u, iz uzoraka tkiva 19 goveda (38,7%) izolovane su bakterije MTB-kompleksa. Kod 4 goveda u uzorcima limfnih čvorova ustanovljeno je prisustvo acidorezistentnih bakterija, ali izolacija nije uspeala usled kontaminacije ili drugih razloga. Ovih 19 izolata poticalo je iz ukupno 17 različitih zapata lociranih u naseljenim mestima Žabalj, Kovilj, Gardinovci, Mošorin, Vilovo i Temerin u Južnobačkom okrugu i naseljenog mesta Beška u opštini Inđija u Sremskom okrugu. Najveći broj pozitivnih nalaza bilo direktnom mikroskopijom ili izolacijom, dobijen je iz uzoraka limfnih čvorova. Više autora navodi da prilikom *post mortem* pregleda trupova i organa tuberkulin pozitivnih goveda, tuberkulozni limfadenitis predstavlja dominantan nalaz (Gormley i sar., 2006; Liebana i sar., 2008). Kako u Srbiji ne postoji referentna veterinarska laboratorija za dijagnostiku mikobakterijskih infekcija kod životinja, izolacija je vršena u laboratoriji za mikobakterije Instituta za plućne bolesti u Sremskoj Kamenici. Patološki materijal je zasejavan na podlogama po Löwenstein-Jensen-u sa glicerolom koje su prilagođene prvenstveno za izolaciju *Mycobacterium tuberculosis*, ali nisu podloge izbora za izolaciju *M.bovis* i *M.caprae* koje pokazuju intenzivniji rast na podlogama bez glicerola,

ali sa dodatkom piruvata. Dobile kolonije bile su sitne, disgonične, nehromogene i pojavljivale su se najčešće posle više od 8 nedelja kultivacije. Na uspeh primarne izolacije *M.bovis* iz uzoraka kliničkog materijala, može uticati niz faktora od kojih su najznačajniji izbor medijuma za izolaciju, procedura dekontaminacije i uslovi inkubiranja, koji nisu identični za sve bakterije MTB-kompleksa. Većina veterinarskih dijagnostičkih laboratorija za primarnu izolaciju *M.bovis* preporučuje upotrebu obogaćenih podloga za rast, kao što su podloga sa jajima po Stonebrinku, Löwenstein-Jensen sa dodatkom 0,4 Na-piruvata ili polusintetske modifikovane podloge sa agarom Middlebrook 7H10 i 7H11 (Adams, 2001). Za dokazivanje infekcije kod goveda, primarna izolacija *M.bovis* ili *M.caprae* trebalo bi da predstavlja definitivnu dijagnozu, odnosno tzv. „zlatni standard“. Međutim, izolacija oba mikroorganizma pokazala se kao veoma teška i zahtevna, naročito u ranim stadijumima infekcije, a uspeh zavisi od optimalnog izvođenja svih faza u procesu, od pravilnog izbora uzorka tkiva, do vrste podloge i uslova inkubiranja (Gormley i sar., 2014). Kod pozitivne izolacije, dijagnoza je definitivno potvrđena i jedina sumnja u dobijeni rezultat mogla bi biti usled eventualne unakrsne kontaminacije pri pripremi materijala ili izvođenju zasejavanja, međutim u slučaju negativnog rezultata izolacije, situacija je znatno složenija. U opsežnom istraživanju Corner i sar., (2012) identifikovali su faktore koji bitno utiču na osetljivost primarne izolacije *M.bovis* iz uzoraka tkiva goveda. Štetno delovanje dekontaminanta, dovodi do produžavanja vremena prvog pojavljivanja kolonija i smanjenja broja dobijenih kolonija i pozitivnih rezultata uopšte, pri čemu se kao najtoksičniji dekontaminant pokazao NaOH. Autori zaključuju da se najbolji rezultati primarne izolacije postižu kada se potpuno isključi upotreba dekontaminanta ili se njihova koncentracija svede na minimum. Da bi se obezbedila maksimalna osetljivost kod primarne izolacije na čvrstim podlogama, najbolje je koristiti veći broj različitih vrsta npr. podloge zasnovane na agaru za brz porast, i Stonebrink ili Löwenstein-Jensen sa dodatkom piruvata, na kojima je bujniji rast, uz zasejavanje na dve ili više podloga od svake vrste, i produženim vremenom inkubacije od najmanje 12 nedelja. Uspeh primarne izolacije svakako zavisi i od broja vijabilnih mikobakterija prisutnih u uzorku tkiva sa lezijama, kao i od stadijuma životnog ciklusa u kome se mikobakterije nalaze. Tako, Cardona i Ruiz-Manzano (2004), navode da *M.bovis*, ali i ostale mikobakterije iz MTB-kompleksa, adaptirajući se na stresnu situaciju u imunokompetentnom

makroorganizmu, uzrokovanu dejstvom različitih imunoloških mehanizama, mogu usporiti sopstveni metabolizam i preći u dormantno stanje što gotovo onemogućuje kultivaciju. Zato veći broj zasejanih podloga sa produženim vremenom inkubacije, dužim od 12 nedelja, znatno povećava verovatnoću izolacije, naročito u uzorcima koji sadrže mali broj bacila (Corner i sar., 2012). U istraživanjima koja su vršili Aranaz i sar., (1999) ustanovljeno je, da se kolonije *M.caprae* mnogo brže pojavljuju i bujnije rastu na podlogama po Coledos-u i Löwenstein-Jensen-u sa dodatkom piruvata nego na klasičnim podlogama po Löwenstein-Jensenu.

Identifikacija 19 dobijenih mikobakterijskih izolata, do nivoa vrste izvršena je ispitivanjem kulturelnih i biohemijskih osobina, pri čemu su kriterijumi za diskriminaciju uključivali sekreciju i nakupljanje niacina, redukciju nitrata, testove hidrolize Tween 80 posle 3 i 10 dana, prisutnost aril sulfataze posle 3 i 14 dana i aktivnost semikvantitativne katalaze. Na osnovu ovako ustanovljenih biohemijskih osobina uz ranije utvrđene i opisane kulturelne i fenotipsko-morfološke karakteristike kolonija, svi izolati svrstani su u vrstu *M.bovis*. Aranaz i sar., (1999) kao ključne biohemijske karakteristike *M.caprae* nove vrste u MTB-kompleksu po kojima se razlikuje od *M.tuberculosis* navode nakupljanje niacina, redukciju nitrata i senzitivnost na TCH, dok je od *M.bovis* i *M.bovis* BCG diferencira osetljivost na pirazinamid, na koji je *M.bovis* prirodno rezistentan. Zato, je neophodno u cilju preciznije biohemijske diferencijacije različitih članova MTB-kompleksa proširiti paletu biohemijskih testova u odnosu na one koji se koriste u rutinskoj dijagnostici. Bakteriološka izolacija *M.bovis* ili drugih vrsta bakterija MTB- kompleksa, sigurno potvrđuje infekciju, međutim osetljivost je diskutabilna, jer na uspeh izolacije utiče veliki broj faktora. Tako de la Rua-Domenech (2006b), ističe slabu osetljivost bakterioloških metoda naročito kada je uzorak za kultivaciju uzet iz pula limfnih čvorova na tuberkulin pozitivnih životinja kod kojih patomorfološkim pregledom nisu ustanovljene promene. Prosečna verovatnoća izolacije iz ovakvih uzoraka u Engleskoj se kretala se od 5-12%. U našim ispitivanjima od 9 uzoraka uzetih iz pula retrofaringealnih, medijastinalnih i bronhijalnih limfnih čvorova grla kod kojih nisu ustanovljene makroskopski vidljive lezije, ni u jednom slučaju nisu izolovane mikobakterije. Moguće objašnjenje je da su eventualne mikroskopske promene bile prisutne na drugim lokalitetima i promakle pri patomorfološkom pregledu, ili se radilo o latentnoj infekciji sa izuzetno malim brojem

vijabilnih mikobakterija, a ne može se u potpunosti isključiti ni kontaminacija nastala tokom uzorkovanja. Stoga, nepostojanje vidljivih tuberkuloznih lezija i negativan bakteriološki nalaz kod goveda pozitivnih na tuberkulinskom ili gama interferon testu ne isključuje infekciju, jer je reakcija kasne preosetljivosti osjetljiviji indikator prisutne infekcije od bakteriološke izolacije ili PCR tehnike (de la Rua-Domenech 2006b, Schiller i sar., 2011).

Kada se kombinuju rezultati direktnog mikroskopskog pregleda i bakteriološke izolacije ukupan broj potvrđeno inficiranih grla iznosio je 23, (46,9%). Za optimizaciju i poboljšanje uspešnosti izolacije prevashodno vrsta MTB-kompleksa čiji su domaćini životinje, neophodno bi bilo zasejavanje vršiti na podlogama koje favorizuju rast ovih sojeva uz period inkubacije od minimalno 12 nedelja. Period inkubiranja kraći od 12 nedelja, može dovesti do pojave signifikantnog broja lažno negativnih rezultata (Corner i sar., 2012). Interesantna je činjenica, da je u devet slučajeva uprkos negativnom mikroskopskom nalazu izvršena uspešna izolacija, dok u četiri slučaja pozitivnog nalaza acidorezistentnih bakterija na direktnom preparatu izolacija nije uspeła usled kontaminacije ili drugih razloga. Patohistološkim pregledom u 36 (90%) isečaka tkiva uzetih od 40 goveda sa vidljivim patomorfološkim lezijama, ustanovljene su promene ekvivalentne tuberkulozi. Međutim kod jednog grla kod koga je patohistološki pregled bio nejasan odnosno sumnjiv, dokazano je prisustvo acidorezistentnih bakterija i izvršena je izolacija. Sve navedene činjenice ukazuju na veliku složenost i teškoće u pravilnoj i tačnoj dijagnostici tuberkuloze goveda, ali i drugih vrsta životinja, koje se mogu u značajnoj meri prevazići kombinacijom različitih metoda kako u *ante mortem* dijagnostici tako i kasnije pri *post mortem* ispitivanju. U cilju maksimalizacije osetljivosti dijagnostike infekcije, važno je pravilno odabrati delove tkiva za uzorkovanje, obezbediti dovoljan broj uzoraka i sprečiti kontaminaciju u toku samog procesa uzorkovanja, što u terenskim uslovima često nije jednostavno. Druga karika u nizu na koju je potrebno obratiti pažnju je održavanje hladnog lanca pri transportu uzoraka u laboratoriju, i njihovo dopremanje u što kraćem roku. U laboratoriji od kritičnog značaja su tehnika dekontaminacije, pravilan izbor podloga za izolaciju *M.caprae* i *M.bovis*, broj zasejanih podloga i dužina kultivacije, što ukazuje na potrebu za opremanjem odgovarajuće veterinarske laboratorije i posebne obuke osoblja, za koje je neophodno obezbediti određene materijalne resurse.

6.2. Molekularna karakterizacija dobijenih MTB-kompleks izolata uzročnika tuberkuloze goveda u Vojvodini

Uspešnost nadzora, kontrole a na kraju i iskorenjivanja tuberkuloze kod goveda, leži prvenstveno u ranoj i pravilnoj dijagnostici oboljenja, brzom uklanjanju pozitivnih grla i kontroli kretanja. Da bi se ovaj cilj postigao, neophodno je dobro poznavati prirodu uzročnika, njegovu prilagođenost na različite vrste domaćina, intra i interspecijske puteve širenja i prenošenja kao i patogeni potencijal. Razvoj različitih metoda analize DNK odnosno genotipitacije, koji je bio naročito intenzivan u poslednjih dvadesetak godina, omogućio je mnogo jasnije sagledavanje epizootiologije i epidemiologije tuberkuloze i pružio odgovore na mnoga pitanja vezana za poreklo i evoluciju MTB-kompleks bakterija. Molekularne metode identifikacije i diferencijacije pojedinih vrsta ili ekotipova u okviru MTB-kompleksa, odavno su prestale da budu rezervisane za naučno istraživačke projekte i našle svoju primenu u svakodnevnoj kliničkoj praksi. Sa druge strane danas gotovo da više i nema ozbiljnijeg epizootiološkog ili epidemiološkog istraživanja ili analize, koji se ne zasnivaju ili u određenom obimu uključuju različite nivoe molekularne karakterizacije uzročnika, bilo na lokalnom ili globalnom nivou.

Molekularna epidemiologija i epizootiologija tuberkuloze značajno je doprinela dubljem uvidu i boljem razumevanju dinamike širenja i prenošenja bolesti u populaciji ljudi, ali i među različitim vrstama domaćih i divljih životinja i čoveka, kao i razumevanju evolucije pojedinih sojeva tokom vremena. Bez genotipizacije, nemoguće je utvrditi da li se izvor infekcije sa *M.bovis* ili *M.caprae* u nekom zapatu nalazi unutar samog zapata, među životinjama u susednom zapatu ili je infekcija unesena kupovinom novih goveda ili kontaktom sa različitim divljim životinjama ili inficiranim ljudima. Iz ovih razloga tipizacija sojeva, uz utvrđivanje pripadnosti određenom klasteru primenom različitih DNK „fingerprinting“ metoda ima važnu ulogu u usmeravanju i dizajniranju programa eradikacije tuberkuloze goveda (Collins 2011).

U cilju molekularne identifikacije vrste bakterija MTB-kompleksa i njihovog grupisanja u klastere, izvršeno je ispitivanje izolata dobijenih iz uzoraka limfnih čvorova i pluća tuberkulin pozitivnih goveda. Nakon izolacije, dobijene acidorezistentne mikobakterije, klasičnim bakteriološkim metodama i primenom standardnog biohemijskog niza, svrstane su u vrstu *M.bovis*. Ispitivana goveda poticala,

su u najvećem broju (14) iz dela Južnobačkog regiona u kome je pre rigorozne implementacije mera kontrole i suzbijanja tuberkuloze, ona bila enzootski prisutna sa visokom incidencijom i prevalencijom, koja je u pojedinim zaptima dostizala i 59% (Pušić i sar.,2009). Ispitivana goveda iz Sremskog okruga (ukupno 4) kod kojih je uspela izolacija uzročnika, epizootiološki su bila povezana sa žarištima tuberkuloze u Južnobačkom okrugu.

Metodom PCR spoligotipizacije ispitano je 18 izolata mikobakterija kod kojih je proces ekstrakcije DNK bio uspešan. Rezultati spoligotipizacije kod svih izolata poreklom od goveda iz Južnobačkog i Sremskog okruga pokazali su odsustvo spejsera 1 i niza spejsera od 3 sve do 16, kao i spejsera 28 što je karakterističan spoligotipni obrazac za *Mycobacterium caprae*. Na ovaj način molekularnom tipizacijom po prvi put u Vojvodini i Srbiji kao značajan uzročnik tuberkuloze goveda identifikovana je vrsta *Mycobacterium caprae*. Odsustvo spejsera 28, i niza spejsera od 39 do 43, kod svih izolata ukazuje na pripadnost istom klasteru, odnosno svih 18 izolata imaju „klasičan“ *Mycobacterium caprae* S1 spoligotip kako je opisano od strane Prodinger i sar., (2005). Slične rezultate dobili su i Erler i sar., (2004) koji su ispitivanjem 79 izolata *M.bovis* subsp. *caprae* dobijenih u periodu od nekoliko godina u više evropskih zemalja iz patološkog materijala poreklom od goveda, jelena, kamila, divljih svinja i ljudi, ustanovili 11 različitih spoligotipova koje su označili C1-C11. Međutim 62(78,5%) od 79 izolata pripadalo je dominantnom spoligotipnom obrascu koji je bio označen kao C1 i definisan je prisustvom spejsera 2, 17 do 27 i 29-38.

U zavisnosti od baze u kojoj su automatski poređene karakteristike spoligotipnih obrazaca naših izolata sa postojećim, dobijena je spoligotipna oznaka SB0418 i Hexcode 20-00-1F-7E-FF-60 u www.Mbovis.org odnosno ST 647 u SITVIT_ONLINE. Izolati ovakvog spoligotipnog obrasca, pored naše zemlje ustanovljeni su u periodu od 1995. godine do danas još u Austriji, Belgiji, Češkoj, Nemačkoj, Francuskoj, Velikoj Britaniji, Hrvatskoj, Mađarskoj, Italiji, Holandiji, i Ukrajini. Metoda spoligotipizacije iako veoma efikasna u molekularnoj identifikaciji vrste *M.caprae* i *M.bovis*, ne može se koristiti za finiju diferencijaciju pojedinih subtipova. Prodinger i sar., (2005) ispitivanjem 128 reprezentativnih izolata *M.caprae* poreklom iz 10 Evropskih država (Austrija, Španija, Hrvatska, Francuska, Nemačka, Italija, Češka, Slovenija, Ukrajina i Mađarska), metodom spoligotipizacije ustanovili su 17 različitih spoligotipnih obrazaca,

a 71 (55%) od 128 ispitanih reprezentativnih izolata imao je „klasičan“ S1 spoligotip. Odsustvo diverziteta u spoligotipnom obrascu naših izolata ukazuje na moguću proliferaciju monoklonalnog kompleksa, odnosno epizootiološku povezanost inficiranih zapata. Ovo se može objasniti činjenicom da svi izolati potiču iz istog relativno ograničenog regiona, koji u prečniku obuhvata oko 80 kilometara, ili su inficirani zapati međusobno povezani zajedničkom ispašom ili prometom priplodnih grla i teladi za tov. Tako recimo, izolat dobijen od goveda iz Temerina, potiče iz zapata u koji je tuberkuloza uneta kupovinom krave u Žablju, a goveda kod kojih je izolovana *M.caprae* iz naseljenog mesta Beška u Sremskom okrugu, tokom letnje sezone boravila su na istom pašnjaku sa govedima iz Kovilja i Gardinovaca. Ovakva upadljiva homogenost ustanovljenih spoligotipova, ukazuje na širenje uzročnika među farmama i zapatima unutar Južnobackog regiona i povremenog preliivanja infekcije u druge delove Vojvodine. Sa druge strane, nekoliko autora u svojim istraživanjima ustanovilo je da *M.caprae* u odnosu na *M.bovis* pokazuje znatno manji diverzitet. Tako su Duarte i sar., (2008) ispitujući 10 izolata *M.caprae* iz različitih regiona Portugalije, uočili izrazitu homogenost, odnosno ustanovili su da svi izolati imaju isti spoligotipni obrazac, bez obzira na geografsku udaljenost. Na osnovu spoligotipizacije izdvajaju se dva glavna klastera *M.caprae*: Iberijski klaster koji karakterišu odsustvo spejsera 1, 3-16, 28, 30-33 i 39-43, dok s druge strane, dominantna većina izolata iz Srednje i Istočne Evrope pripada spoligotipu koji poseduje spejsere 30-33 (Rodriguez-Campos i sar., 2014). Međutim, da bi se stekla potpuna slika o molekularnoj epidemiologiji kao i tačnom načinu širenja infekcije unutar, ali i izvan žarišta, potrebne su finije metode genotipizacije, kao što su RFLP, VNTR i MIRU. Tako Erler i sar., (2004) navode da je u okviru 62 izolata koji su svi pripadali C1 spoligotipnom klasteru, RFLP metodom ustanovljeno 29 različitih subtipova, i zaključuju da je kombinovanje metoda spoligotipizacije i IS 6100 RFLP analize u velikoj meri doprinelo boljem uvidu u epizootiološke procese i evoluciju genotipova *M.bovis* subsp. *caprae*. Do sličnih zaključaka došli su i Prodinger i sar., (2005) koji su ispitujući 128 reprezentativnih uzoraka *M.caprae* iz nekoliko evropskih država, koji pokrivaju period od 25 godina, ustanovili 17 različitih spoligotipova, od čega je 55% ispitanih uzoraka pripadalo S1 klasteru. Kada je primenjena i VNTR-MIRU tehnika genotipizacije ukupno je ustanovljeno 78 različitih subtipova. Međutim, za primenu ovih metoda genotipizacije

sa visokom rezolucijom u diskriminaciji sojeva, subtipova i linija potrebna su znatna materijalna sredstva, velik utrošak vremena, sofisticirana oprema i kvalifikovan kadar. Usled ograničenih resursa cilj ovog istraživanja bio je da se primenom spoligotipizacije na molekularnom nivou ustanovi identifikacija vrste MTB-kompleksa koja se javlja kao uzročnik tuberkuloze u populaciji goveda u Vojvodini. Kako se radi o prvoj izolaciji i genotipizaciji *M.caprae*, u našoj zemlji, a svi izolati potiču od goveda, ne može se pouzdano zaključiti o interspecijskom i zoonoznom potencijalu ili raširenosti uzročnika kod drugih životinjskih vrsta ili čoveka. Ipak, u zemljama u neposrednom okruženju infekcija sa *M.caprae* identičnog spoligotipnog obrasca ustanovljena je osim kod goveda još i kod svinja domaćih i divljih, jelena i koza. Takođe, infekcija je potvrđena i kod ljudi gotovo u svim državama u kojima se *M.caprae* pojavljuje kao uzročnik tuberkuloze goveda (Erler i sar., 2004; Prodingler i sar., 2005; Ruettinger i sar., 2012; Rodriguez-Campos 2014, Nebreda i sar., 2016). U Hrvatskoj prvi potvrđeni slučaj infekcije ljudi sa *M.caprae* opisao je Cvetnić (2007), kod 13-godišnjeg dečaka sa tuberkuloznim limfadenitisom. Dečak je poticao iz seoskog domaćinstva u kojem su uzgajana goveda. Kod šest od 14 goveda na farmi ustanovljena je pozitivna tuberkulinska reakcija, a nakon klanja potvrđena je infekcija vrstom *M.caprae*. Autori smatraju da je do infekcije najverovatnije došlo konzumiranjem termički neobrađenog mleka. Iako su prilikom patomorfološkog pregleda tuberkulin pozitivnih grla na liniji klanja, tuberkulozne promene na supramamarnim limfnim čvorovima ustanovljene kod samo jedne krave, zoonozni potencijal agensa upućuje na oprez pri konzumiranju termički neobrađenog mleka, ili mlečnih proizvoda, što naročito treba uzeti u obzir u regionima u kojima je ova bolest endemski prisutna, a u promet se stavljaju meki sirevi proizvedeni od termički neobrađenog mleka. U Španiji najveći broj slučajeva tuberkuloze ljudi uzrokovane sa *M.caprae* povezan je sa profesionalnim rizikom, i dolazi iz endemskih područja sa visokom prevalencijom inficiranih zapata goveda i koza (Rodríguez i sar., 2009).

Molekularna karakterizacija (genotipizacija) izolata MTB-kompleksa dobijenih od različitih vrsta životinja može biti od suštinskog značaja za razumevanje dinamike interspecijskog širenja tuberkuloze, kao i zoonoznog rizika za infekciju ljudi. Identifikacija *M.caprae* kao glavnog uzročnika tuberkuloze goveda u Vojvodini nameće potrebu da se ovaj uzročnik uvrsti ravnopravno sa *M.bovis* u sve zvanične programe

kontrole, nadzora i eradikacije. U Srbiji prema važećem *Pravilniku o utvrđivanju mera za rano otkrivanje, dijagnostiku, sprečavanje širenja, suzbijanje i iskorenjivanje zarazne bolesti tuberkuloze goveda, načinu njihovog sprovođenja, kao i načinu utvrđivanja statusa gazdinstva slobodnog od tuberkuloze goveda*, tuberkuloznim govedima smatraju se goveda inficirana vrstom *M.bovis* ili drugim mikobakterijskim vrstama koje pripadaju MTB-kompleksu. U nekim državama (Austrija, Hrvatska, Holandija, Portugalija, Republika Irska i Španija) kao uzročnici tuberkuloze goveda takođe se smatraju mikobakterije iz MTB-kompleksa. Međutim, ni u svim državama članicama Evropske Unije ne postoji jedinstven stav po pitanju definisanja uzročnika tuberkuloze goveda. U Nemačkoj nacionalna legislativa uključuje *M.bovis* i *M.caprae*, u Norveškoj i Švedskoj *M.bovis* i *M.tuberculosis*, u Francuskoj, Portugaliji i Švajcarskoj *M.bovis*, *M.caprae* i *M.tuberculosis*. U nekim državama *M.caprae* nije uvršten u uzročnike tuberkuloze goveda (Kipar, Češka, Finska, Italija, Latvija, Luksemburg, Velika Britanija), ali ipak u slučaju izolacije *M.caprae* neke od ovih država kao npr. Slovenija ukidaju status zapata slobodnog od tuberkuloze (Rodriguez-Campos i sar.,2014)

Sa epizootiološkog aspekta bitno je istaći činjenicu da su u mnogim domaćinstvima u kojima su bila ustanovljena tuberkulozna goveda, često bili prisutni i mali preživari, koji ne podležu obaveznom dijagnostičkom ispitivanju na prisustvo tuberkuloze. Imajući u vidu da je *M.caprae* prvobitno ustanovljen kao uzročnik tuberkuloze koza (Aranaz i sar., 1999), smatramo da bi u sklopu suzbijanja tuberkuloze u žarištima ili pri iznenadnom izbijanju zaraze, obavezno trebalo dijagnostičkom pregledu podvrgnuti i ovce, a naročito koze, kako bi se sprečilo održavanje infekcije i prekinuo lanac širenja na goveda i ljude. Dobro su poznati i dokumentovani slučajevi tuberkuloze koza, uključujući i tuberkulozu vimena, kao i zoonoznog prenošenja infekcije sa koza na ljude (Rodriguez-Campos i sar.,2014; Aranaz i sar., 1999). Takođe, pri uvozu ovih vrsta životinja kao obavezna karantinska mera moralo bi biti predviđeno i dijagnostičko ispitivanje na tuberkulozu.

6.3. Ispitivanje osetljivosti izolata *M.caprae* na odabrane antituberkulotike

Kontrola i eradikacija tuberkuloze goveda u Srbiji kao i u mnogim drugim Evropskim državama zasniva se na redovnom godišnjem dijagnostičkom testiranju svih

goveda starijih od 6 nedelja, obaveznom klanju pozitivnih jedinki i nadzoru na liniji klanja. Na osnovu Pravilnika o utvrđivanju mera za rano otkrivanje, dijagnostiku, sprečavanje širenja, suzbijanje i iskorenjivanje zarazne bolesti tuberkuloze goveda i načinu njihovog sprovođenja, u Srbiji je zabranjena vakcinacija i lečenje tuberkuloznih goveda. Stoga, ispitivanje antimikrobne osetljivosti goveđih izolata MTB-kompleksa, ima mali značaj u veterinarskoj praksi. Međutim, uzimajući u obzir antropozoonozni potencijal uzročnika, poznavanje prijemčivosti odnosno rezistencije može biti od velike koristi pri izboru terapije u humanoj medicini, kod pacijenata kod kojih postoji sumnja da je izvor infekcije usled profesionalne ili regionalne izloženosti u direktnom kontaktu sa životinjama ili animalnim proizvodima. *M.bovis* i *M.caprae* najznačajniji uzročnici tuberkuloze kod goveda, ali i drugih vrsta životinja, takođe su potvrđeni uzročnici kliničke tuberkuloze ljudi (Prodinger i sar., 2005; Cvetnić i sar., 2007; Rodrigez i sar., 2009; Rodwell i sar., 2010; Nebreda i sar., 2016), koja u odnosu na tuberkulozu uzrokovanu sa *M.tuberculosis* vrlo često ima ekstrapulmonalnu lokalizaciju. Uprkos tome podaci o osetljivosti obe vrste na antituberkulotike veoma su oskudni.

U cilju utvrđivanja antimikrobne osetljivosti na odabranu paletu antituberkuloznih lekova (etambutol, rifampicin, izoniazid i streptomycin) koji se u našoj zemlji najčešće primenjuju u terapiji ljudi obolelih od tuberkuloze ispitano je 5 reprezentativnih uzoraka *M.caprae* izolovanih iz patološkog materijala poreklom od goveda. Kao reprezentativni uzorak uzeli smo po jedan izolat iz 5 različitih zapata lociranih u svakoj od opština u kojima je bakteriološki potvrđena tuberkuloza goveda. Na osnovu rezultata ispitivanja osetljivosti klasičnom metodom proporcija ustanovljeno je da su svi izolati bili osetljivi na etambutol, streptomycin, rifampicin i izoniazid, odnosno ni u jednom slučaju nije ustanovljena pojava rezistencije na neki od antituberkuloznih lekova. Ovakvi rezultati su svakako povezani sa činjenicom da je terapija inficiranih goveda i drugih ekonomskih kategorija životinja zabranjena i praktično nikad i nije bila sprovedena u našoj zemlji. Nema mnogo objavljenih podataka o rezultatima istraživanja antimikrobne osetljivosti izolata MTB-kompleksa poreklom od životinja u svetskoj literaturi. Prvi rezultati ispitivanja osetljivosti izolata *M.caprae* na antituberkulozne lekove potiču iz Španije od Romero i sar., (2007) koji su ispitivali antibiotsku osetljivost 41 izolata *M.bovis* i 5 izolata *M.caprae* sakupljenih u periodu od 10 godina iz uzoraka dobijenih od različitih životinjskih vrsta. Tada je

ustanovljeno da su svi ispitivani izolati bili osetljivi na izoniazid, rifampicin, streptomycin, etambutol i ofloksacin. Rezultati naših ispitivanja u skladu su i sa istraživanjima Parreiras i sar., (2004) koji su ispitivali osetljivost 65 izolata *M.bovis* dobijenih iz patološkog materijala goveda na 5 antituberkulotika prve linije (streptomycin, rifampicin, etambutol, izoniazid i etionamid) pri čemu nisu ustanovili pojavu rezistencije, uprkos činjenici da se u Brazilu u određenim situacijama sprovodi terapija tuberkuloznih goveda najčešće kao monoterapija izoniazidom. Drugačije rezultate dobili su istraživači u Italiji koji su ustanovili visok procenat rezistencije *M.bovis* na izoniazid i rifampicin (Sechi i sar., 2001; Cavirani i sar., 2003). Rezistencija na izoniazid možda može biti objašnjena njegovom ilegalnom upotrebom u terapiji inficiranih goveda što je registrovano u Italiji (Moda 2006). Genetska ispitivanja pokazala su da su mutacije u određenim specifičnim genskim lokusima odgovorne za razvoj rezistencije na izoniazid (*katG*, *inhA* i intergenski region *oxyR-ahpC*), rifampicin (*rpoB*), streptomycin (*rpsL*, *rrs*), etambutol (*embB*) i kvinolone (*gyrA*, *gyrB*). Izolati *M.bovis* su prirodno rezistentni na pirazinamid usled pojedinačne tačkaste G-C mutacije u *pncA* genu (Scorpio i sar., 1996). Iako rezultati naših ispitivanja pokazuju da su svi izolati bili osetljivi na standardnu paletu antituberkulotika, zbog mogućnosti prenošenja *M.bovis* i *M.caprae* sa životinja na čoveka, ali i među ljudima, naročito u određenim rizičnim grupama, potrebno je uspostaviti sistem praćenja osetljivosti i eventualne pojave rezistencije ovih vrsta. Uz klasične mikrobiološke metode u sistem kontrole trebalo bi uključiti i molekularne tehnike koje omogućuju detektovanje pojedinačnih nukleotidnih zamena u okviru istog spoligotipnog obrasca. Romero i sar., (2007) ističu da je problem nastanka multirezistentnih *M. bovis* sojeva pre svega vezan za humanu medicinu i nastaje usled neadekvatne ili nekonzistentne terapije najčešće imunokompromitovanih pacijenata. Istražujući pojavu MDR-sojeva *M.bovis* među humanim pacijentima u Meksiku Vazquez-Chacon i sar., (2015) ustanovili su da svi izolati imaju mutacije u *katG* i *rpoB* genima što uslovljava otpornost na antituberkulotike prve linije izoniazid i rifampicin. Budući da nisu našli epidemiološku vezu sa sojevima izolovanim iz goveda, autori iznose pretpostavku da je cirkulacija MDR-sojeva posledica reaktivacije infekcije kod pacijenata ili prenošenja uzročnika sa čoveka na čoveka, što se izgleda dešava mnogo češće nego što se pretpostavljalo. Razvoj rezistencije se kod većine bakterija dešava nakon horizontalnog prenošenja

malih mobilnih genetskih elemenata (plazmida, transposoma ili integrona), ali u slučaju *M.tuberculosis* pojava rezistencije je primarno posledica spontane mutacije u hromozomskim genima. Pojava sojeva rezistentnih na postojeće tuberkulostatike, predstavlja najveći izazov u terapiji tuberkuloznih pacijenata, koji iz godine u godinu postaje sve značajniji problem na globalnom nivou. Očigledno je da postoji velika potreba za pronalaženjem novih lekova kao preduslovom za uspešnu borbu protiv tuberkuloze. Kako sa stanovišta današnje nauke nisu u potpunosti razjašnjeni svi mehanizmi razvoja rezistencije u okviru bakterija MTB-kompleksa, Chandra i sar., (2011) predlažu novi terapijski koncept u kojem bi ciljni molekuli u terapiji bili zapravo molekuli ćelija domaćina. Ovakav holistički pristup bi imao najmanje dve prednosti; s jedne strane omogućio bi da se tuberkuloza leči primenom jedinstvenog terapijskog protokola, bez obzira na genotipske i fenotipske osobine uzročnika, a drugo budući da se stimulacija molekula ćelije domaćina koristi u cilju eliminacije patogena znatno bi se smanjio selektivni pritisak na evoluciju novih multi rezistentnih sojeva. Rezultati preliminarnih ispitivanja na laboratorijskim miševima ukazuju da modulacija aktivnosti pojedinih ciljanih molekula ćelija domaćina omogućuje uspešnu eliminaciju i “čišćenje” intracelularne infekcije, bez obzira na profil antimikrobne rezistencije patogena.

6.4. Ante mortem dijagnostika tuberkuloze goveda primenom komparativne tuberkulinizacije i γ -IFN testa i njihovo vrednovanje

Postavljanje pravovremene i tačne dijagnoze tuberkuloze kod goveda, uprkos značajnom razvoju i pojavi novih dijagnostičkih metoda, još uvek predstavlja veliki izazov, usled postojećih ograničenja u pogledu osetljivosti i specifičnosti testova, ali i složenosti imunološke reakcije makroorganizma na infekciju. Različite metode dijagnostike tuberkuloze na živim govedima, mogu se uspešno primenjivati u nekom stadijumu razvoja oboljenja, ali ne sasvim uspešno u drugom. Dve zvanično odobrene metode od strane OIE i Evropske Unije koje se koriste za dijagnostiku tuberkuloze goveda i priznate su u međunarodnom prometu goveda su intradermalna tuberkulinizacija i γ -IFN test. Oba testa zasnivaju se na detekciji ćelijskog imuniteta, odnosno reakcije kasne preosetljivosti kod životinja koje su prethodno senzibilisane izlaganjem antigenima *M. bovis* ili drugih vrsta iz MTB-kompleksa. U cilju utvrđivanja dijagnostičke mogućnosti za što tačnije i ranije otkrivanje tuberkuloze goveda, izvršeno

je terensko ispitivanje osetljivosti i specifičnosti γ -IFN testa u lokalnim uslovima na teritoriji Vojvodine. Ispitivanja su izvršena u sklopu suzbijanja tuberkuloze na ukupno 25 malih farmi i individualnih gazdinstava u Južnobačkom i Sremskom okrugu. Odabrani zapati goveda bili su locirani u endemskom području, sa relativno visokom prevalencijom oboljenja. Tokom perioda u kome su vršena ispitivanja, ukupno je metodom intradermalne tuberkulinizacije tuberkulinom B pregledano (monotestom) 364 goveda, pri čemu je kod 71 životinje ustanovljena pozitivna ili sumnjiva reakcija. Po isteku perioda od 50-60 dana sve životinje koje su imale pozitivnu ili sumnjivu reakciju testirane komparativnim tuberkulinskim testa i γ -IFN testom.

Tokom ovog istraživanja poređenjem komparativnog tuberkulinskog testa i *M.bovis* γ -IFN testa, ustanovili smo da su rezultati dva paralelno upotrebljena testa bili identični kod 56 (78, 8%) od ukupno 71 ispitivanog grla. Podudarnost pozitivnih reakcija iznosila je 85,4%, a kod negativnih 61,5%. Ukupno 11 (15,5%) pozitivnih reakcija utvrđeno je samo na komparativnoj tuberkulinizaciji, dok su 4 (5,6%) životinje bile pozitivne samo na γ -IFN testu. Broj sumnjivih reakcija bio je gotovo identičan za oba testa. Broj identifikovanih pozitivnih grla na komparativnom tuberkulinskom testu bio je veći u odnosu na rezultate dobijene γ -IFN testom. Slični rezultati dobijeni su i u drugim zemljama u različitim epizootiološkim okolnostima (Whiple i sar., 1995; Marassi i sar., 2009). Međutim, rezultati našeg istraživanja u suprotnosti su sa rezultatima dobijenim u studijama drugih istraživača, u kojima je primenom γ -IFN testa otkriven veći broj pozitivnih goveda u odnosu na tuberkulinski test (Domingo i sar., 1995; Gormley i sar., 2006). Najčešće ustanovljen rezultat u našem istraživanju bila je pozitivna reakcija na oba testa, što nije iznenađujuće jer su ispitivanja vršena u inficiranim ili ugroženim zapatima u regionu u kome je tuberkuloza goveda bila enzootski prisutna, sa visokom prevalencijom inficiranih jedinki u okviru zapata. U odnosu na nivo podudarnosti dva testa kod paralelne upotrebe, kapa statističkom analizom izračunat je κ -indeks od 0,48 što ukazuje na umerenu odnosno srednju podudarnost rezultata dva testa. Slične rezultate dobili su u Brazilu Marassi i sar., (2013) koji su u prirodno inficiranom stadu goveda poredeći dijagnostičke mogućnosti komparativnog tuberkulinskog testa i γ -IFN testa na 50 grla, dobili vrednost indeksa $\kappa = 0.50$. Veća saglasnost dva testa 90,8% uz κ -indeks od 0,63 utvrđena je u istraživanjima Gonzales-Llamazares i sar., (1999) što se možda može objasniti činjenicom da je

ispitivanje vršeno na znatno većem broju goveda i uz nešto drugačije postavljenu graničnu vrednost (*cut off*), što je imalo uticaja na interpretaciju rezultata dobijenih gama interferon testom.

Ispitivanje osetljivosti γ -IFN testa primenjenog u dijagnostici tuberkuloze goveda u lokalnim uslovima u Vojvodini, izvršeno je na 18 goveda kod kojih je *post mortem* potvrđena tuberkuloza na osnovu uspešne bakteriološke izolacije, pozitivnog patohistološkog pregleda ili nalaza acidorezistentnih bakterija (ACR). Pre sanitarnog klanja, kod svih 18 goveda bio je ustanovljen pozitivan γ -IFN test prilikom *ante mortem* dijagnostike tuberkuloze. Rezultati naših ispitivanja u ovoj grupi životinja pokazuju osetljivost testa od 90%. Ustanovljena osetljivost testa u skladu je sa rezultatima istraživanja brojnih autora koji su ustanovili da se osetljivost γ -IFN testa, kreće u rasponu od 73,0 do 100% (srednja vrednost 87,6%), u zavisnosti od načina interpretacije testa (Gormley i sar., 2006; Schiller i sar., 2010; Faye i sar., 2011). Ispitujući upotrebu γ -IFN testa u potvrdi dijagnoze tuberkuloze goveda u Brazilu, Marassi i sar., (2009) u grupi od 21 goveda pozitivnog na tuberkulinskom testu ustanovili su osetljivost testa od 91,4%, međutim za tri grla kod kojih nisu izolovane mikobakterije niti je PCR metodom ustanovljeno prisustvo genetskog materijala bakterija MTB-kompleksa, autori su za potvrdu dijagnoze koristili pozitivan rezultat komparativnog tuberkulinskog testa.

Kada su rezultati komparativne tuberkulinizacije i γ -IFN testa bili kombinovani ukupna dijagnostička osetljivost povećana je za oko 10%, odnosno paralelna upotreba oba testa omogućila je otkrivanje većeg broja pozitivnih jedinki u zapatu u odnosu na bilo koji test pojedinačno. Na ovaj način od ukupno 71 ispitivanog goveda kao pozitivno dijagnostikovano je 63 (88,7%) grla u odnosu na 55 (77,5%) kada su u obzir uzimani samo rezultati komparativnog tuberkulinskog testa. Gormley i sar., (2006) navode da je paralelnim korišćenjem oba testa moguće povećati ukupnu osetljivost i do 20%. Iako se u našim istraživanjima gama interferon test nije pokazao superiorno u odnosu na komparativni tuberkulinski test, strateška primena γ -IFN testa, u područjima ili zapatima goveda sa visokom prevalencijom tuberkuloze ima svoje opravdanje, jer povećava mogućnost otkrivanja inficiranih grla, tako što se uklanjaju sva goveda koja su pozitivna na bilo koji od dva paralelno upotrebljena testa. Takođe, rezultati istraživanja većeg broja autora (Wood i Jones 2001; Schiller i sar., 2011; Bezos i

sar.,2014) ukazuju da se uz pomoć γ -IFN testa infekcija otkriva u ranijem stadijumu, odnosno već posle 14 dana od inokulacije uzročnika. Na ovaj način strateškom primenom γ -IFN testa u zapatima sa visokom prevalencijom oboljenja, moguće je otkriti posebnu subpopulaciju inficiranih goveda koja još nisu razvila osetljivost na kožni tuberkulinski test. U kombinaciji sa tuberkulinizacijom, γ -IFN test obezbeđuje visoku osetljivost i pomaže da mnogo manje pozitivnih jedinki bude pogrešno dijagnostikovano kao negativno na tuberkulozu. Na ovaj način zapati se brže oslobađaju inficiranih jedinki, čime se smanjuje mogućnost prenošenja zaraze kako na druge životinje, tako i na ljude, a i znatno se skraćuje vreme potrebno za eradikaciju oboljenja (Sheridan, 2011).

Sa druge strane u područjima u kojima je ustanovljen veliki broj nespecifičnih reakcija, na teritoriji opštine Bečej i naseljenom mestu Bačko Petrovo Selo, kao i na dva lokaliteta u opštini Stara Pazova (Golubinci i Surduk), upotreba γ -IFN testa može znatno pomoći u razjašnjavanju situacije, naročito u zapatima u kojima se ista grla više puta pojavljuju kao sumnjiva ili pozitivna na primarnoj tuberkulinizaciji, ali kasnije na komparativnom testu daju nespecifične ili reakcije koje nakon očitavanja ostavljaju nedoumicu. Problemi povezani sa nespecifičnom senzibilizacijom goveda inficiranih nepatogenim ambijentalnim mikobakterijama i unakrsnom reakcijom pri izvođenju tuberkulinizacije, nametnuli su potrebu za uvođenjem visoko specifičnih prečišćenih antigena kao dijagnostičkih markera čije intenzivno ispitivanje je u toku (Schiller i sar., 2011). Na osnovu izvršenih istraživanja može se zaključiti da je upotreba γ -IFN testa najsvrsishodnija, kada se koristi kao dopunski paralelni test zajedno sa intradermalnom tuberkulinizacijom u žarištima sa visokom prevalencijom tuberkuloze ili u hronično inficiranim zapatima. U ovakvim epizootiološkim situacijama uklanjanje malog broja lažno pozitivnih jedinki nije od velikog značaja, a kombinacijom dva testa treba maksimalizovati ukupnu osetljivost u *ante mortem* dijagnostici. Istraživanja koja su vršili Gormley i sar., (2006) ukazuju da je kombinovanom upotrebom γ -IFN testa i komparativnog tuberkulinskog testa moguće otkriti i do 95,2% inficiranih jedinki. Naša istraživanja sugerišu da bi prilagođavanje kriterijuma interpretacije testa modifikovanjem, odnosno snižavanjem cut-off vrednosti u odnosu na standardno preporučenu od strane proizvođača, u žarištima tuberkuloze, ili u zapatima u kojima je ranije potvrđena tuberkuloza ili su epizootiološki povezani sa rizičnim i/ili

tuberkuloznim zapaćtima u smislu povećanja osetljivosti moglo znatno poboljšati performanse ovog testa. Do slićnih zakljućaka došli su i Whiple i sar., (1995), dok Faye i sar., (2011) navode cut-off vrednost od 0,02 za optimalnu osetljivost od 93% i specifićnost od 98% i smatraju da su kod Bovigam *M.bovis* γ -IFN testa OD vrednosti za pozitivnu kontrolu generalno previsoke, te da u testu treba smanjiti titar pozitivne kontrole. Upotreba γ -IFN testa za potvrdu dijagnoze kod živih goveda moće biti preporućljiva, jer iako visoko specifićni, ni PCR niti bakteriološka kultivacija uzoraka mleka ili nosnih briseva, kao klinićkog materijala ne poseduju prihvatljiv nivo osetljivosti kao konfirmativni testovi (Marassi i sar.,2009). Ipak, ni u jednoj drćzavi ćlanici Evropske unije γ -IFN test se ne koristi kao primarni test za masovni „skrining“ niti kao jedini potvrdni test, osim u nekim specifićnim slućajevima, kao npr. u Francuskoj u stadima za uzgoj bikova za borbu i u Italiji u nekoliko zapata bivola, iz prevashodno tehnićkih razloga. U šest drćzava γ -IFN test se koristi paralelno sa tuberkulinizacijom istog dana, u cilju povećanja osetljivosti, a u ćetiri drćzave γ -IFN test koriste nakon pozitivne ili sumnjive reakcije na tuberkulinskoj probi, za povećanje specifićnosti u odrećdenim geografskim podrućjima. U najmanje 6 drćzava EU γ -IFN test nikada nije upotrebljavan u dijagnostici tuberkuloze goveda (Riviere i sar., 2014).

6.5. Ispitivanje incidencije, prevalencije i epizootiologije tuberkuloze goveda u Vojvodini

Program sistematskog suzbijanja tuberkuloze goveda zapoćeo je u bivšojoj SFRJ 1946. godine, odmah po završetku rata. Od tada se i u Srbiji primenjuje tuberkulinizacija goveda u razlićitom obimu kao obavezna dijagnostićka mera. Od 2005. godine kada se poćelo sa trajnim obelećzavanjem goveda ušnim markicama program kontrole, suzbijanja i iskorenjivanja tuberkuloze zasnovan je na redovnom godišnjem testiranju svih goveda starijih od 6 nedelja, brzom uklanjanju pozitivnih reaktora (najduće 30 dana od postavljanja dijagnoze) i nadzoru na liniji klanja. Primarnu tuberkulinizaciju vrši terenska veterinarska slućba na osnovu Pravilnika o programu mera zdravstvene zašćite životinja od zaraznih bolesti. Ukoliko se pri izvoćdenju monotesta upotrebom PPD tuberkulina B, ustanovi sumnjiva ili pozitivna reakcija, po isteku minimalno 42 dana vrši se komparativni tuberkulinski test, uz upotrebu PPD tuberkulina B i PPD tuberkulina A. U najvećem broju slućajeva dijagnostićko ispitivanje komparativnom tuberkulinizacijom, vrši regionalni epizootiolog, ali moće i

nadležni veterinar, međutim na očitavanju reakcije obavezno je prisustvo epizootiologa i veterinarskog inspektora. Na ovaj način celokupna populacija goveda morala bi jednom godišnje biti podvrgnuta dijagnostičkom ispitivanju na prisustvo infekcije uzročnicima tuberkuloze. Analizom epizootioloških podataka prikupljenih od Veterinarskih specijalističnih instituta sa teritorije Vojvodine (VSI "Subotica", VSI "Sombor", VSI "Pančevo" i VSI "Zrenjanin"), izveštaja Odseka za obeležavanje i registraciju životinja o broju aktivnih gazdinstava za uzgoj goveda, kao i sopstvenih podataka, dobijeni su rezultati incidencije tuberkuloze na nivou apsolutnog broja pozitivnih jedinki i prevalencije na nivou pozitivnih zapata, kao važnih epizootioloških parametara prisustva i raširenosti infekcije. U periodu od 2010. do 2015. godine u Vojvodini je dijagnostičkom ispitivanju na tuberkulozu metodom intradermalne tuberkulinizacije PPD tuberkulinom B bilo podvrgnuto ukupno 1.515.863 goveda. U posmatranom periodu, pozitivna reakcija na komparativnom tuberkulinskom testu (retuberkulinizaciji) na PPD B, ustanovljena je kod ukupno 204 (0,013%) grla. Tokom 2010 godine od ukupno ispitanih 247.044 goveda pozitivna reakcija ustanovljena je kod 31(0,012%), pri čemu su 3 pozitivna grla ustanovljena na teritoriji Zapadnobačkog okruga, u 2 zapata goveda a 28 pozitivnih grla na teritoriji Južnobačkog okruga u 4 naseljena mesta u 3 opštine i ukupno 14 zapata goveda. U ostalim epizootiološkim područjima nisu ustanovljena pozitivna grla. U 2011.godini od ukupno 258.019 tuberkulinisanih goveda pozitivna reakcija ustanovljena je kod 33(0,013%), od čega su 3 pozitivna grla dijagnostikovana u dva zapata na teritoriji Severnobačkog okruga, 14 u 3 zapata Zapadnobačkog, a 16 u 12 zapata goveda Južnobačkog okruga lociranih u endemskom području opština Žabalj, Titel i Novi Sad.

U 2012. godini od ukupno ispitanih 256.712 životinja pozitivna tuberkulinska proba bila je ustanovljena kod 45 (0,018%) grla, od čega je po 1 pozitivno grlo bilo ustanovljeno u Severnobačkom i Južnobačkom okrugu, 4 u 3 zapata u Srednjobanatskom okrugu, 11 u 4 zapata u Zapadnobačkom epizootiološkom okrugu, a 28 u 14 zapata goveda u Južnobačkom okrugu. U 2013. godini, od ukupno tuberkulinisanih 248.520 goveda, pozitivna su bila 42(0,017%) grla, od toga po 1 pozitivno grlo ustanovljeno je u Severnobačkom, Sremskom i Severnobačkom regionu, 12 u 3 zapata u Zapadnobačkom regionu, a 27 pozitivnih grla dijagnostikovano je u 15 zapata na teritoriji Južnobačkog epizootiološkog područja. Tokom 2014. godine

na prisustvo infekcije tuberkulozom ispitano je kod 252.938 goveda, pri čemu je ustanovljeno 35(0,014%) pozitivnih grla. Pozitivna grla otkrivena su samo na teritoriji Zapadnobačkog (17) u 4 zapata i Južnobačkog epizootiološkog područja (18) u 14 različitih zapata. U 2015 godini od ukupno ispitanih 252.630 goveda, pozitivna tuberkulinska reakcija ustanovljena je kod 18 grla (0,007%), a pozitivna grla bila su prisutna na teritoriji Zapadnobačkog (6) u 2 zapata i Južnobačkog epizootiološkog područja ukupno 12 grla u 9 zapata. Analizom ispitivanog perioda od 6 godina može se zaključiti da je incidencija tuberkuloze na nivou celokupnog stada goveda u Vojvodini izuzetno niska. U posmatranom periodu od 2010-2015. godine incidencija na nivou inficiranih jedinki nije znatnije varirala i kretala se u rasponu od minimalnih 0,007 u 2015. godini do maksimalnih 0,018 u 2012 godini. Takođe, prevalencija inficiranih zapata u svim regionima osim u delu Južnobačkog epizootiološkog područja u toku posmatranog perioda nije prelazila 0,1%. Broj pozitivnih reaktora i broj stada koja se stavljaju pod mere zabrane *per annum* predstavljaju primarne epizootiološke pokazatelje raširenosti tuberkuloze (Sheridan 2011). Za sticanje statusa države ili regiona slobodnog od tuberkuloze goveda u Evropskoj Uniji potrebno je ispuniti sledeće uslove: procenat zapata u kojima je potvrđena tuberkuloza, ne sme biti veći od 0,1% od ukupnog broja pregledanih zapata godišnje u periodu od 6 uzastopnih godina; sva goveda moraju biti trajno obeležena, i sva goveda nakon klanja moraju proći zvaničan *post mortem* pregled (Reviriego Gordejo i Vermeersch 2006). Dobijeni rezultati pokazuju da se Nacionalni program suzbijanja tuberkuloze u Srbiji u velikoj meri pokazao uspešnim, i da se najveći deo Vojvodine može smatrati slobodnim od tuberkuloze goveda, odnosno da je 99,9% zapata u najvećem delu Vojvodine kontinuirano slobodno od tuberkuloze. Izuzetak predstavljaju ustanovljena žarišta tuberkuloze u delovima Južnobačkog okruga u kojima i pored znatnog opadanja incidencije kao i prevalencije zaraženih zapata usled preduzetih mera na suzbijanju tuberkuloze tokom prethodnih 10 godina ona i dalje ostaje enzootski prisutna u niskom intenzitetu. Povremeno se iz ovih žarišta, prometom goveda kako legalnim tako i nelegalnim, infekcija preliva i u druge delove Vojvodine. Sa druge strane značajnu prepreku potpunom eliminisanju zaraze, doprinosi i hronična perzistencija infekcije u pojedinim većim zapatima u verovatno latentnom stanju uz povremenu reaktivaciju i diseminaciju uzročnika. Slična situacija je i u Zapadnobačkom okrugu, gde se u periodu

između 2010-2015. godine tuberkulozna grla registruju u svega 9 različitih gazdinstava, od kojih se u jednom slučaju radi o velikoj farmi mlečnih goveda. Ovde međutim treba istaći da potvrda infekcije nekom od definitivnih *post mortem* metoda nije rađena. Mnogi autori kao poseban problem ističu reaktivaciju žarišta uprkos preduzetim pojačanim merama nadzora i kontrole, i navode da se u prvih 12 meseci po okončanju početne epizode infekcije, u 23% zapata registruju novi slučajevi, dok se ta brojka u periodu od 24 meseca penje na 38% zapata. Ovoj pojavi u velikoj meri doprinosi nedovoljna osetljivost tuberkulinskog testa, reaktivacija latentne infekcije kod nekih životinja kao i duže zadržavanje u zapatu grla sa sumnjivom ili nedovoljno jasnom tuberkulinskom reakcijom (Karolemeas i sar., 2011). Iskustva u drugim državama upućuju na zaključak da je epizootiološke "džepove" tuberkuloze teško suzbiti, kao i da je u distriktima u kojima se TBC goveda endemski održava neophodno unaprediti dijagnostičke tehnike, revidirati strategiju i pojačati mere kontrole i eradikacije. Kod većine hronično inficiranih zapata u Južnobačkom okrugu, radi se o govedima držanim u ekstenzivnim uslovima na pašnjaku u sistemu krava-tele, a kao posebno nepovoljan epizootiološki momenat ističe se činjenica da se ovde meša veliki broj grla iz različitih zapata, pa i naseljenih mesta. Nema sumnje da način stočarenja koji dominira u ovom regionu, predstavlja glavni faktor u širenju infekcije. Zapati goveda sa pozitivnim grlima u tuberkuloznim žarištima napasaju se zajedno sa drugim vrstama domaćih životinja, pre svega ovcama, kozama, svinjama i konjima, uz korišćenje zajedničkih pojila. Na istim pašnjacima i obodnim šumama prisutna je i značajna populacija divljih životinja. Veoma često goveda su u lošoj telesnoj kondiciji, iscrpljena značajnim parazitskim prisustvom, pripuššana u ranom uzrastu i izložena nepovoljnim vremenskim prilikama. U održavanju infekcije u ovim zapatima ulogu imaju i loši zoohigijenski uslovi u kojima se drže goveda tokom zime, što favorizuje dugotrajan opstanak tuberkuloznih bacila u spoljašnjoj sredini i predstavlja perzistentan izvor zaraze za nova grla. Svi ovi faktori koji imaju uticaja na slabljenje odbrambenih mehanizama životinje, dovode do aktivacije tuberkuloznog procesa koji je praćen rasejavanjem i širenjem patogenog agensa. Daljem širenju zaraze unutar samih gazdinstava pogoduje zimsko sakupljanje goveda u prenaseljenim i slabo ventiliranim stajama, u kojima se mešaju sa muznim grlima. Na ovakav zaključak navodi činjenica da se u velikom broju patohistološki potvrđenih infekcija radilo o aktivnoj tuberkulozi, a distribucija

ustanovljenih patomorfoloških promena koje su u najvećem broju slučajeva bile ustanovljene na limfnim čvorovima i organima grudne duplje, ukazuje na dominantno aerogeni put infekcije. Tuberkulozne lezije na mezenterijalnim limfnim čvorovima kod jednog tuberkulin pozitivnog grla, ukazuju i na mogući alimentarni put infekcije, najverovatnije mlekom, budući da kod ovog grla nisu ustanovljene makroskopski vidljive lezije na drugim mestima. Aktivna tuberkuloza koju smo ustanovili pri patomorfološkom pregledu najvećeg broja pozitivnih grla, može biti povezana i sa prirodom samog uzročnika. Naime nedavna istraživanja García-Jiménez i sar.,(2013) pokazala su da kod divljih svinja inficiranih sa *M.caprae* tuberkulozni proces ima znatno nepovoljniji tok praćen razvojem velikog broja granuloma u uznapredovalom stadijumu sa više multijedarnih džinovskih ćelija i velikim brojem prisutnih ACR bakterija u odnosu na infekciju izazvanu sa *M.bovis*. Autori zaključuju da su lezije koje uzrokuje *M.caprae* sklonije ekskreciji i rasejavanju uzročnika. Način uzgoja goveda kao i različiti klimatski i ekološki uslovi u zemljama EU, najviše doprinose održavanju različite epizootiološke situacije i distribucije infekcije unutar pojedinih zemalja i regiona (Gordejo i Vermeersch, 2006). Eliminacija tuberkuloze, pokazala se kao izuzetno teška, jer se u nekim državama bolest prvenstveno održava u divljim životinjama kao rezervoarima infekcije za goveda. Kao prepreka potpunom eliminisanju tuberkuloze goveda u Austriji i Nemačkoj javlja se visok procenat inficiranih jelena koji u Alpima dele iste pašnjake sa govedima, dok u Velikoj Britaniji i Irskoj kao glavni uzrok za porast incidencije tuberkuloze goveda smatraju raširenost infekcije u populaciji jazavaca (preko 65% inficiranih) koji borave na pašnjacima (Schiller i sar. 2011, More 2009). Nedavna istraživanja uz korišćenje RFLP metode genotipizacije pokazala su prisustvo istih sojeva *M.bovis* izolovanih iz jazavaca i goveda u datom geografskom području, a pokazalo se da je infekcija samoodrživa u populaciji jazavaca (Sheridan 2011). Uloga divljači u održavanju tuberkuloze u endemskom području Južnobačkog okruga nije u potpunosti istražena, ali neka preliminarna i ograničena ispitivanja koja su izvršena na odstreljenoj divljači u regionu Koviljskog rita (64 divlja zeca, 7 srna i 49 divljih svinja), a obuhvatala su patomorfološki pregled uz patohistološko ispitivanje na tuberkulozu sumnjivih lezija nisu dovela do otkrivanja inficiranih jedinki. Stoga, uloga divljih životinja a pre svega lisica, jazavaca i šakala kao rezervoara infekcije ostaje predmet pažnje i tema za šira ispitivanja u budućnosti. Međutim, osim faktora vezanih

za epizootiološke okolnosti, biologiju samog uzročnika i njegovu interakciju sa domaćinom, postoji i niz socio-ekonomskih faktora koji izazivaju poteškoće u iskorenjivanju infekcije, a koji moraju biti uzeti u obzir i adekvatno obrađeni. Iako je u proteklih 10 godina urađeno mnogo na suzbijanju i iskorenjivanju tuberkuloze u endemskim žarištima, ipak nije postignut potpuni uspeh. U početnim fazama eradikacije tuberkuloze, kada se prevalencija inficiranih jedinki u pojedinim zapatima kretala i do 59%, a broj inficiranih zapata u pojedinim naseljenim mestima prelazio 20%, najveći broj grla je prilikom *post mortem* pregleda imao vidljive lezije koje su jasno ukazivale na infekciju. Ovo je razumljivo, jer većina ritških i pašnih goveda pre uvođenja obaveznog obeležavanja godinama nije ni bila dijagnostički testirana, pa se u velikom broju slučajeva radilo o hroničnoj aktivnoj tuberkulozi. Kako je program suzbijanja odmica grla su otkrivana u sve ranijoj fazi infekcije i veterinarsko-sanitarnim pregledom na liniji klanja bilo je teže ili nemoguće ustanoviti vidljive promene. Ovo je kod određenog broja farmera budilo sumnju u efikasnost intradermalnog testa, naročito u pogledu pojave lažno pozitivnih reakcija. S tim u vezi, Collins (2006), ističe da je potrebno imati na umu kako u završnim fazama eradikacije *M.bovis* infekcija kod goveda nema kliničku i patomorfološku manifestaciju, nego se najčešće radi o naizgled zdravim životinjama sa reakcijom pozne preosetljivosti na tuberkulin. De la Rua Domenech i sar. (2006b), navode da u Velikoj Britaniji i Irskoj kod 50- 80% pozitivnih grla na liniji klanja nije moguće ustanoviti makroskopski vidljive lezije, ali naglašavaju da su testovi zasnovani na ispitivanju reakcije kasne preosetljivosti znatno osetljiviji od *post mortem* pregleda mesa u komercijalnim klanicama i standardnih bakterioloških metoda. Paralelna upotreba gama interferon testa, u žarištima tuberkuloze u Južnobačkom okrugu, kao mogućeg pomoćnog dijagnostičkog sredstva zbog visoke cene bila je ograničena samo na određene zapate i u eksperimentalne svrhe.

Nepoverenje odgajivača stoke u sprovođenje mera kontrole i eradikacije bilo je dodatno pospešeno zbog niza organizacionih poteškoća koje su uticale na nekonzistentnost i oduglovačenje u sprovođenju programa kontrole. Pri čemu nije od preteranog značaja bilo da li se radilo o višemesečnom nedostatku tuberkulina na tržištu, nemogućnosti da se pronade klanica koja zadovoljava uslove za klanje tuberkuloznih grla, kašnjenju u raspodeli terena usled privatizacije veterinarske službe ili neadekvatnoj ceni i kašnjenju u isplati kompenzacije za oduzeta goveda. Sa druge

strane hronična priroda oboljenja, sa dugo skrivenim kliničkim znacima i malim, ali progresivnim gubitkom proizvodnih performansi, relativizovali su značaj uklanjanja inficiranih grla iz ugla vlasnika stoke. Sva ova odlaganja dovela su do perzistiranja infekcije u pojedinim stadima i povremenog širenja u druge zapate sa kojima su bili u direktnom ili indirektnom kontaktu. Sa druge strane, nezainteresovanost pa i otvoreni otpor pojedinih stočara uz primenu različitih nezakonitih radnji, uključujući preobeležavanje i skrivanje pozitivnih grla ili odbijanje da se goveda podvrgnu dijagnostičkom ispitivanju, dodatno su otežavali proces suzbijanja zaraze. Za prevazilaženje ovakvih problema osim veterinarske službe, moraju biti uključeni i drugi državni organi u okviru svojih nadležnosti. Susrećući se sa sličnim problemima u Italiji Moda (2006), navodi da je od kritične važnosti da su sve aktivnosti programa iskorenjivanja dobro isplanirane, konzistentne i koordinisane, uz odgovarajuću finansijsku i državnu podršku. Kao bitan element u ograničavanju mogućnosti suzbijanja tuberkuloze, navode se i različite prevarne radnje i falsifikovanje rezultata, kako bi se izbegle restrikcije vezane za izgon stoke na pašu ili trgovinu, pri čemu ističe naročiti značaj nezakonitih radnji kada je u pitanju trgovina. Kao jedan od glavnih puteva širenja tuberkuloze identifikovali smo promet i trgovinu govedima, pri čemu naročitu opasnost predstavlja promet goveda preko mreže uglavnom neregistrovanih preprodavaca tzv. nakupaca stoke, čime se pospešuje kako širenje zaraze unutar tuberkuloznog distrikta tako i formiranje novih žarišta zaraze u udaljenim oblastima. Jedna od značajnih prepreka iskorenjivanju tuberkuloze u mnogim Evropskim državama je intenzivan promet i trgovina govedima između različitih, često i geografski udaljenih farmi (Collins, 2006; Schiller i sar., 2011), što takođe predstavlja i glavni put ponovnog unosa infekcije u nezaražene regione (de Vos i sar., 2015). Tako je tuberkuloza goveda koja je prvi put dijagnostikovana u naseljenom mestu Parage u opštini Bačka Palanka, bila posledica kupovine dva grla iz Kovilja, dok je unošenje tuberkuloze u zapat muznih krava u Sremskoj Mitrovici registrovan nakon kupovine u Žablju. Slična situacija bila je i sa zapatom goveda u Temerinu gde je tuberkuloza uneta kupovinom krave u Žablju. U ovom zapatu tuberkuloza je nakon toga intermitentno dijagnostikovana u narednih 5 godina, što je budući da se radilo o malom zapatu od 4-6 goveda na kraju dovelo do odluke o depopulaciji. Na osnovu ustanovljenih puteva širenja infekcije, ali i iskustava iz drugih država, kretanje i promet goveda iz zapata u ustanovljenim žarištima

tuberkuloze, moralo bi biti pojačano kontrolisano u odnosu na druge regione. Pri tome se ne treba ograničiti samo na zapate koji su do nedavno bili pod merama zabrane usled suzbijanja zaraze, nego treba obuhvatiti sva gazdinstva u definisanom regionu u kome je tuberkuloza goveda enzooski prisutna. Odluka o sanitarnom klanju svih grla doneta je i u 2 zapata goveda u Kovilju sa *post mortem* potvrđenom tuberkulozom u kojima su i posle 3 ili više sukcesivnih tuberkulinizacija otkrivana pozitivna grla. Prema Collins-u (2006), opravdano je pretpostaviti da se rizik od ponovnog pojavljivanja tuberkuloze na farmi suštinski smanjuje kada se izvrši depopulacija masovno zaraženog zapata i sprovedu sve zoohigijenske mere uključujući sanitarno pranje i dezinfekciju objekata, opreme i dvorišta uz istovremeni period odmora od minimalno 6 meseci. Međutim, ni ova krajnja mera ne dovodi uvek do eliminacije infekcije, tako Haahes i sar.,(1995) navode da je procenat zapata sa pozitivnim reaktorima 1-3 godine nakon uklanjanja svih goveda i ponovnog uvođenja grla rastao progresivno sa 19% u prvoj godini na 30% i 40% u trećoj, pri čemu je od značaja bila veličina zapata. Obzirom da su rezultati ovih istraživanja vezani za Irsku i Severnu Irsku u kojima je dokazana uloga jazavaca u perzistiranju i prenošenju infekcije na goveda (Sheridan 2011, Gormley i sar. 2006), nije još uvek dovoljno jasno koliko su primenjiva na situaciju u našoj zemlji. Od tri zapata u kojima je izvršena depopulacija nova goveda su uneta samo u jedan po isteku perioda od 6 meseci, i kasnije nisu ustanovljene pozitivne jedinke. Različita incidencija i prevalencija inficiranih jedinki i zapata ustanovljena u pojedinim područjima Vojvodine, nameće potrebu za redefinisanjem strategije i drugačijem pristupu kontroli i suzbijanju u različitim specifičnim epizootiološkim situacijama. Značajna pomoć u dijagnostici tuberkuloze u žarištima sa visokom incidencijom inficiranih grla, može biti strateška primena γ -IFN testa, zbog njegove osetljivosti i mogućnosti nešto ranijeg otkrivanja tuberkuloznih jedinki u odnosu na komparativni tuberkulinski test. Sa druge strane, u regionu opštine Bečej i delovima opštine Stara Pazova sa velikim procentom nespecifičnih i nejasnih reakcija, usled senzibilizacije goveda najverovatnije ambijentalnim mikobakterijama, primena ovog testa može pomoći u razjašnjavanju situacije. U slučajevima pojedinačnog iznenadnog otkrivanja pozitivnih reaktora, bez epizootiološki ustanovljenog puta unosa infekcije, u regionu sa niskom incidencijom primena pomoćnih dijagnostičkih sredstava može doprineti pouzdanijoj dijagnozi i sprečiti nepotrebno uklanjanje velikog broja lažno pozitivnih, neinficiranih grla. Na

osnovu utvrđene incidencije i prevalencije, u najvećem broju regiona Vojvodine moguće je otpočeti program sertifikacije zapata za dodelu statusa slobodnih od tuberkuloze. Sa druge strane, u žarištima tuberkuloze, treba pojačati mere kontrole i suzbijanja, i sa ekonomskog i epizootiološkog stanovišta prihvatiti meru uništavanja čitavog stada u situacijama kada je tuberkuloza uzrokovana bilo sa *M.bovis* ili *M.caprae* etiološki potvrđena, a procenat inficiranih jedinki visok, ili se pozitivna grla u istom zapatu otkrivaju tokom tri i više uzastopnih tuberkulinizacija.

Značaj kontrole i suzbijanja tuberkuloze goveda ogleda se pre svega u očuvanju javnog zdravlja i sprečavanju infekcije ljudi uzročnicima tuberkuloze zoonoznim uzročnicima *M.bovis* i *M. caprae*. Od ne manjeg značaja su i ekonomski aspekti prisustva oboljenja u populaciji goveda ili unutar pojedinih zapata, a vezani su za smanjene proizvodnih performansi, za štete nastale usled uklanjanja pozitivnih jedinki, te zabranu prometa kako živih goveda tako i njihovih proizvoda. Iz tih razloga kontrola i na kraju eradikacija tuberkuloze iz nacionalnog zapata goveda mora predstavljati krajnji cilj, za čije ostvarenje je neophodna posvećenost kontinuiran i koordiniran rad terenske veterinarske službe, veterinarske inspekcije i područnih epizootiologa, podržan i finansiran od strane nadležnih državnih organa. Istovremeno se mora unapređivati znanje i informisanost veterinara, odgajivača goveda, trgovaca stokom, klaničara i drugih zainteresovanih subjekata, o značaju i mogućim posledicama infekcije, imajući na umu da je borba protiv tuberkuloze poduhvat koji donosi dobrobit čitavoj društvenoj zajednici.

7. ZAKLJUČCI

Na osnovu dobijenih rezultata istraživanja izvedeni su sledeći zaključci:

1. Devetnaest izolata bakterija iz kompleksa *Mycobacterium tuberculosis* je primenom klasičnih bakterioloških i standardnih biohemijskih testova tipizirano kao vrsta *Mycobacterium bovis*. Na osnovu molekularne karakterizacije izolata primenom PCR spoligotipizacije, ustanovljeno je da svi izolati pripadaju vrsti *Mycobacterium caprae*.
2. Spoligotipni obrazac kod svih izolata je bio identičan, na osnovu čega je ustanovljeno da svi pripadaju istom soju odnosno klasteru, jedinstvene spoligotipne oznake SB0418, Hexcode 20-00-1F-7E-FF-60, odnosno ST 647. Nalaz SB0418 odnosno ST647 *Mycobacterium caprae* spoligotipa kao uzročnika tuberkuloze goveda na području Vojvodine potvrđuje njegovu široku i dominantnu rasprostranjenost u Srednjoj i Istočnoj Evropi kao i u našoj zemlji.
3. Ispitivanjem antimikrobne osetljivosti pet reprezentativnih izolata vrste *Mycobacterium caprae* metodom proporcija, nije ustanovljena rezistencija na sledeće antibiotike: etambutol, streptomycin, rifampicin i izoniazid.
4. Poređenjem tuberkulinskog i γ -IFN testa *Kappa* statističkom analizom, dobijena je vrednost $\kappa=0,48$, što predstavlja srednji nivo podudarnosti poređenih testova u *ante mortem* dijagnostici tuberkuloze goveda.
5. Paralelnom upotrebom tuberkulinskog i γ -IFN testa ukupan broj dijagnostikovanih pozitivnih grla bio je za 10% veći u odnosu na pojedinačnu primenu tuberkulinskog testa.
6. Prilikom ispitivanja osetljivosti γ -IFN testa u poređenju sa *post mortem* potvrđenim slučajevima tuberkuloze na osnovu bakteriološke izolacije, nalaza acidorezistentnih bakterija u mikroskopskim preparatima ili pozitivnog patohistološkog nalaza, ustanovljena osetljivost testa iznosila je 90%.

7. Na osnovu epizootioloških istraživanja, ustanovljena incidencija tuberkuloze goveda u periodu od 2010. do 2015. godine, na teritoriji Vojvodine je bila niska i kretala se u rasponu od 0,007 do 0,018% od ukupno ispitanih grla u datoj godini, a prevalencija inficiranih zapata se kretala između 0,08-0,012%.

8. U Južnobačkom okrugu na teritoriji opština Novi Sad, Žabalj i Titel ustanovljena su žarišta tuberkuloze u kojima je infekcija enzootski prisutna sa niskom prevalencijom što zahteva izradu posebnog programa kontrole i eradikacije ove bolesti. U takvim situacijama, opravdano je raditi i tuberkulinizaciju koza i ovaca.

8. LITERATURA

1. Adams LG: In vivo and in vitro diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection. *Revue Scientifique Technique Office International des Epizooties* (2001),20 (1), 304–324.
2. Alland D, Kalkut GE, Moss AR, McAdam RA, Hahn JA, Bosworth W, Drucker E, Bloom BR: Transmission of tuberculosis in New York City: an analysis by DNA fingerprinting and conventional epidemiologic methods. *N Engl J Med* (1994),330:1710-6.
3. Amadori M, Tagliabue S, Lauzi S, Finazzi G, Lombardi G, Telo P, Pacciarini L, Bonizzi L: Diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in calves sensitised by mycobacteria of the avium/intracellulare group. *Journal of Veterinary Medicine B* (2002)49, 89–96.
4. Ameni G, Miorner H, Roger F, Tibbo M: Comparison between comparative tuberculin and gamma-interferon tests for the diagnosis of bovine tuberculosis in Ethiopia. *Trop. Anim. Health Prod.* (2000),32, 267–276.
5. Anon. The control of tuberculosis in Scotland. Edinburgh: Scottish Office Department of Health; 1998.
6. Anon. Zoonotic tuberculosis and food safety. Report of the Food Safety Authority of Ireland Scientific Committee. Dublin: Food Safety Authority of Ireland; 2003.
7. Anon. Annual report on trends and sources of zoonotic agents in animals, feedingstuffs, food and man in the European Union and Norway in 2003. Brussels: European Commission, Health and Consumer Protection Directorate General; 2005
Link: http://europa.eu.int/comm/food/food/biosafety/salmonella/zoonoses_reps_2002_en.htm.
8. Aranaz A, Liebana E, Gomez-Mampaso E, Galan JC, Cousin D, Ortégaf A, Blazquez J, Baquero F, Mateos A, Suarez G, Dominguez L: *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* subsp. nov.: a taxonomic study of a new member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex isolated from goats in Spain. *International Journal of Systematic Bacteriology* (1999), 49, 1263-1273.

9. Ashford DA, Whitney E, Raghunathan P, Cosivi O: Epidemiology of selected mycobacteria that infect humans and other animals. *Rev Sci Tech* (2001), 20(1):325–37.
10. Baldwin SL, D'Souza C, Roberts AD, Kelly BP, Frank AA, Lui MA, Ulmer JB, Huygen K, McMurray DM, Orme IM: Evaluation of new vaccines in the mouse and guinea pig model of tuberculosis. *Infect Immun.* (1998), 66(6):2951-9.
11. Bandera A, Gori A, Catozzi L, Degli Esposti A, Marchetti G, Molteni C, Ferrario G, Codecasa L, Penati V, Matteoli A, Franzetti A: Molecular epidemiology study of exogenous reinfection in an area with a low incidence of tuberculosis. *J Clin Microbiol* (2001),39: 2213-8.
12. Barnes PF, Yang Z, Preston-Martin S, Pogoda JM, Jones BE, O'taya M, Eisenach KD, Knowles L, Harvey S, Cave MD: Patterns of tuberculosis transmission in Central Los Angeles. *JAMA* (1997), 278:1159- 63.
13. Barnes PF, Cave MD: Molecular epidemiology of tuberculosis. *N Engl J Med.* (2003), Sep 18;349(12):1149-56. Review
14. Bass KE, Nonnecke BJ, Palmer MV, Thacker TC, Hardegger R, Schroeder B, Raeber AJ, Waters WR: Clinical and diagnostic developments of a gamma interferon release assay for use in bovine tuberculosis control programs. *Clin Vaccine Immunol.* (2013), 20(12):1827-35.
15. Bezos J, Casal C, Romero B, Schroeder B, Hardegger R, Raeber A, López L, Rueda P, Domínguez L: Current ante mortem techniques for diagnosis of bovine tuberculosis. *Research in Veterinary Science*(2014a), 97 S44–S52
16. Bezos J, Álvarez J, Romero B, de Juan L, Domínguez L: Historical perspective of bovine tuberculosis. *Research in Veterinary Science* (2014b)97; S3–S4.
17. Bruning-Fann CS, Schmitt SM, Fitzgerald SD, Fierke JS, Friedrich P, Kaneene JB, Clarke KA, Butler KL, Payeur JB, Whipple DL, Cooley TM, Miller JM, Muzo DP: Bovine tuberculosis in free-ranging carnivores from Michigan. *J. Wildlife Dis.* (2001),37, 58–64.
18. Byrne D: Analysis of post-mortem data on tuberculin reactor cattle. *Irish Veterinary Journal* (1992), 45, 131–132.
19. Brosch R, Gordon SV, Marmiesse M, Brodin P, Buchrieser C, Eiglmeier K, Garnier T, Gutiérrez C, Hewinson G, Kremer K, Parsons LM, Pym AS, Samper S, vanSoolingen

- D, Cole ST: A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002, 99(6), 3684–3689.
20. Brudey K: *Mycobacterium tuberculosis* complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology. *BMC Microbiol.* (2006),6:23;1186/1471-2180-6-23.
 21. Buddle BM, Parlane NA, Keen DL, Aldwell FE, Pollock JM, Lightbody K, Andersen P: Differentiation between *Mycobacterium bovis* BCG-vaccinated and *M. bovis*-infected cattle by using recombinant mycobacterial antigens. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* (1999), 6 (1), 1–5.
 22. Buddle BM, Ryan TJ, Pollock JM, Andersen P, de Lisle GW: Use of ESAT-6 in the interferon-gamma test for diagnosis of bovine tuberculosis following skin testing. *Veterinary Microbiology* (2001),80, 37–46.
 23. Buddle Bryce M, D. Neil Wedlock, Michel Denis , H. Martin Vordermeier, R. Glyn Hewinson Update on vaccination of cattle and wildlife populations against Tuberculosis *Veterinary Microbiology* 151 (2011) 14–22
 24. Caffrey JP: Status of bovine tuberculosis eradication programmes in Europe. *Veterinary Microbiology* (1994),40, 1–4.
 25. Cardon PJ, Ruiz-Manzano J: On the nature of *Mycobacterium tuberculosis*-latent bacilli. *Eur. Respir. J.* (2004)24, 1044–1051.
 26. Cassidy JP, Bryson DG, Pollock JM, Evans RT, Forster F, Neill S D: Early lesion formation in cattle experimentally infected with *Mycobacterium bovis*. *Journal of Comparative Pathology* (1998), 119, 27- 44.
 27. Cassidy JP, Bryson DG, Gutierrez Cancela MM, Forster F, Pollock JM, Neill SD: Lymphocyte subtypes in experimentally induced early-stage bovine tuberculosis lesions. *J Comp Pathol.* (2001), 124(1):46-51.
 28. Cassidy JP: The pathogenesis and pathology of bovine tuberculosis with insights from studies of tuberculosis in humans and laboratory animal models. *Veterinary Microbiology* (2006), 112, 151–161.
 29. Cassidy JP: The pathology of bovine tuberculosis: Time for an audit. *The Veterinary Journal* (2008), 176, 263–264
 30. Casal C, Alvarez J, Bezos J, Quick H, Díez-Guerrier A, Romero B, Saez LJ, Liandris E, Navarro A, Perez A, Domínguez L, de Juan L: Effect of the inoculation site of

- bovine purified protein derivative (PPD) on the skin fold thickness increase in cattle from officially tuberculosis free and tuberculosis-infected herds *Preventive Veterinary Medicine* (2015), 121, 86–92.
31. Cavirani S, Fanti F, Benecchi M, Calderaro A, Taddei S, Arcangeletti C, Medici MC, Dettori G, Chezzi C: Evaluation of susceptibility of *Mycobacterium bovis* to antituberculous drugs by radiometric BACTEC 460TB system. *New Microbiol* (2003),26:181–6.
 32. Chandra N, Kumar D, Rao K.: *Systems biology of tuberculosis* (2011), Sep;91(5):487-96.
 33. Charleston B, Hope JC, Carr BV, Howard CJ: Masking of two in vitro immunological assays for *Mycobacterium bovis* (BCG) in calves acutely infected with non-cytopathic bovine viral diarrhoea virus. *Veterinary Record* (2001), 149, 481–484
 34. Cho YS, Jung SC, Kim JM, Yoo HS: Enzyme-linked immunosorbent assay of bovine tuberculosis by crudemycobacterial protein 70. *Journal of Immunoassay & Immunochemistry* (2007), 28, 409–418.
 35. Coad M, Clifford D, Rhodes SG, Hewinson RG, Vordermeier HM, Whelan AO: Repeat tuberculin skin testing leads to desensitisation in naturally infected tuberculous cattle which is associated with elevated interleukin-10 and decreased interleukin-1 beta responses. *Vet. Res.* (2010),4, 14.
 36. Cooper, A.M., Torrado, E., 2012. Protection versus pathology in tuberculosis: recent insights. *Curr.Opin.Immunol.* 24 (4), 431–437.
 37. Collins CH, Yates MD, Grange JM: Subdivision of *Mycobacterium tuberculosis* into the variants for epidemiological purposes: methods and nomenclature. *J Hyg* 1982, 89: 235-242.
 38. Collins CH, Grange JM: The bovine tubercle bacillus. *J Appl Bacteriol* (1983), 55: 13-29.
 39. Collins CH, Grange JM: Zoonotic implication of *Mycobacterium bovis* infection. *Irish Vet J* (1987), 41: 363-366.
 40. Collins, J.D., Monaghan, M., McGill, K., Kelly, A., Fitzsimons, T., 2000. A longitudinal study of cattle found positive to the interferon γ assay for *Mycobacterium bovis* infection. In: *Proceedings of the Ninth Symposium of the International Society*

- for Veterinary Epidemiology and Economics, Breckenridge, Colorado, August 2000, pp. 1263–1265.
41. Collins JD: Tuberculosis in cattle: new perspectives. *Tuberculosis* (2001), 81, 17–21.
 42. Collins JD: Tuberculosis in cattle: Strategic planning for the future. *Veterinary Microbiology* 112 (2006), 369–381
 43. Collins MD: Advances in molecular diagnostics for *Mycobacterium bovis*, *Veterinary Microbiology* 2011, 151 2–7
 44. Cooper AM, Torrado E: Protection versus pathology in tuberculosis: recent insights. *Curr. Opin. Immunol.* (2012), 24 (4), 431–437.
 45. Corner LA: Post mortem diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Veterinary Microbiology* (1994), 40 (1–2), 53–63.
 46. Corner LA: The role of wild animal populations in the epidemiology of tuberculosis in domestic animals: How to assess the risk. *Veterinary Microbiology* (2006), 112; 303–312.
 47. Corner LA, Gormley E, Pfeiffer DU: Primary isolation of *Mycobacterium bovis* from bovine tissues: conditions for maximising the number of positive cultures. *Veterinary Microbiology* (2012), 156, 162–171.
 48. Cosivi O, Grange JM, Daborn CJ, Raviglione MC, Fujikura T, Cousins D, Robinson RA, Huchzermeyer HFAK, de Kantor I, Meslin FX: Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries. *Emerg Infect Dis* (1998), 4: 59–70.
 49. Costello E, Egan JWA, Quigley FC, O'Reilly PF: Performance of the single intradermal comparative tuberculin test in identifying cattle with tuberculous lesions in Irish herds. *Veterinary Record* (1997), 141, 222–224.
 50. Costello E, Doherty ML, Monaghan ML, Quigley FC, O'Reilly PF: A study of cattle to cattle transmission of *M. bovis*. *Vet. J.* (1998), 155, 245–250.
 51. Cousins DV, Dawson DJ: Tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in the Australian population: cases recorded during 1970–1994. *Int J Tuberc Lung Dis* (1999), 3:715–21.
 52. Cousins DV: *Mycobacterium bovis* infection and control in domestic livestock. *Revue Scientifique et Technique*. (2001), 20 (1), 71–85, Office International des Epizooties.
 53. Cvetnic Z, Katalinic-Jankovic V, Sostaric B, Spicic S, Obrovac M, Marjanovic S, Benic M, Kirin BK, Vickovic I: *Mycobacterium caprae* in cattle and humans in Croatia. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* (2007), 11, 652–658.

54. Dalovisio JR, Stretter M, Mikota-Wells S: Rhinoceros' rhinorrhea: cause of an outbreak of infection due to airborne *Mycobacterium bovis* in zookeepers. *Clin Infect Dis* (1992),15:598–600.
55. Daniel TM: The history of tuberculosis. *Respir Med* 2006, 100(11):1862-70.
56. Dannenberg AM, Rook GAW: Pathogenesis of pulmonary tuberculosis: an interplay of tissue-damaging and macrophage-activating immune responses—dual mechanisms that control bacillary multiplication. In: Bloom, B.R. (Ed.), *Tuberculosis: pathogenesis, protection, and control*. American Society for Microbiology, (1994) Washington, DC, pp. 459–483.
57. Dannenberg AM: Pathophysiology: basic aspects. In: Schlossberg, D. (Ed.), *Tuberculosis and Nontuberculous Mycobacterial Infections*. (1999), Fourth Edition. W.B. Saunders, Philadelphia, pp. 17–47.
58. Dale JW, Brittain D, Cataldi AA, Cousins D, Crawford JT, Driscoll J, Heersma H, Lilebeak T, Quituqua T, Rastogi N, Skuce RA, Sola C, van Soolingen D, Vincent V: Spacer oligonucleotide typing of bacteria of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: recommendations for standardised nomenclature. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* (2001),5:216 –219.
59. Dean GS, Rhodes SG, Coad M, Whelan AO, Cockle PJ, Clifford DJ, Hewinson RG, Vordermeier HM: Minimum infective dose of *Mycobacterium bovis* in cattle. *Infection and Immunity* (2005),73 (1), 6467–6471.
60. DEFRA: Government Strategic Framework for the Sustainable Control of Bovine Tuberculosis (bTB) in Great Britain. DEFRA Publications (2005) , London, 68 pp.
61. DEFRA: Department of Environment, Food and Rural Affairs, Bovine TB: the facts. (2009),Link:<http://archive.defra.gov.uk/foodfarm/farmanimal/diseases/atoz/tb/documents/tb-facts.pdf>
62. de Kantor IN, Ambroggi M, Poggi S, Morcillo N, Da Silva Telles MA, Osorio Ribeiro, M, Garzon Torres MC, Llerena Polo C, Ribon W, Garcia V, Kuffo D, Asencios L, Vasquez Campos LM, Rivas C, de Waard JH: Human *Mycobacterium bovis* infection in ten Latin American countries. *Tuberculosis* (2008), 88; 358–365.
63. DeLiberto TJ, Vercauteren KC, Witmer GW: The Ecology of *Mycobacterium bovis* in Michigan. 2004 Activities Report and Conference Proceedings, Michigan Bovine Tuberculosis Eradication Project. Link: <http://www.michigan.gov/emergingdiseases>

64. de Lisle GW, Mackintosh CG, Bengis RG: *Mycobacterium bovis* in free-living and captive wildlife, including farmed deer. *Rev Sci Tech* (2001),20(1):86–111.
65. de Vos C, van der Goot JA, van Zijderveld FG, Swanenburg M, Elbers ARW: Risk-based testing of imported animals: A case study for bovine tuberculosis in The Netherlands *Preventive Veterinary Medicine* (2015) 121; 8–20
66. Dieli F, Troye-Blomberg M, Ivanyi J, Fournie JJ, Bonneville M, Peyrat MA, Sireci G, Salerno A: Vgamma9/ Vdelta2 T lymphocytes reduce the viability of intracellular *Mycobacterium tuberculosis*. *Eur. J. Immunol.* (2000)30, 1512–1519.
67. Doherty ML, Monaghan ML, Bassett HF, Quinn PJ: Effect of a recent injection of purified protein derivative on diagnostic tests for tuberculosis in cattle infected with *Mycobacterium bovis*. *Research in Veterinary Science* (1995) 58, 211–217.
68. Doherty ML, Monaghan ML, Bassett HF, Quinn PJ, Davis WC: Effect of dietary restriction on cell-mediated immune responses in cattle infected with *Mycobacterium bovis*. *Veterinary Immunology and Immunopathology* (1996), 49, 307–320.
69. Domingo M, Liebana E, Vilafranca M, Aranaz A, Vidal D, Prats N, Mateos A, Casal J, Dominguez L: A field evaluation of the interferon gamma assay and intradermal tuberculin test in Dairy cattle in Spain. *Proceedings of the Second International Conference on *Mycobacterium bovis** (1995), Dunedeen, New Zeland, 304-306.
70. Du Y, Qi Y, Yu L, Lin J, Liu S, Ni H, Pang H, Liu H, Si W, Zhao H, Wang C: Molecular characterization of *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC) isolated from cattle in northeast and northwest China. *Res. Vet. Sci.* (2011), 90 (3), 385–391
71. Duarte EL, Domingos M, Amado A, Botelho A: Spoligotype diversity of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium caprae* animal isolates. *Veterinary Microbiology* (2008), 130 415–421.
72. Durr PA, Hewinson RG, Clifton-Hadley RS: Molecular epidemiology of bovine tuberculosis. I. *Mycobacterium bovis* genotyping. *Revue Scientifique et Technique* (International Office of Epizootics) (2000),19, 675–688.
73. Dungworth DL: The respiratory system. In: Jubb, K.V.F., Kennedy, P.C., Palmer, N. (Eds.), *Pathology Of Domestic Animals*. fourth ed. (1993), Academic Press, San Diego, pp. 641–652.

74. Dürr S, Müller B, Alonso S, Hattendorf J, Laisse JM, Van Helden PD: Differences in primary sites of infection between zoonotic and human tuberculosis: results from a worldwide systematic review. *PLOS Negl Trop Dis* (2013),7:e2399.
75. Erler W, Martin G, Sachse K, Naumann L, Kahlau D, Beer J, Bartos M, Nagy G, Cvetnic Z, Zolnir-Dovc M, Pavlik I: Molecular Fingerprinting of *Mycobacterium bovis* subsp. *caprae* Isolates from Central Europe *Journal of Clin. Microb.* 2004, p. 2234–2238 Vol. 42, No. 5.
76. Faye S, Moyen JL, Gares H, Benet JJ, Garin-Bastuji B, Boschirolu ML: Determination of decisional cut-off values for the optimal diagnosis of bovine tuberculosis with a modified IFNg assay (Bovigam1) in a low prevalence area in France *Veterinary Microbiology* (2011), 151,60–67.
77. Fayyazi A, Eichmeyer B, Soruri A, Schweyer S, Herms J, Schwarz P, Radzun HJ: Apoptosis of macrophages and T cells in tuberculosis associated caseous necrosis. *J. Pathol.* (2000)191, 417–425.
78. Fenhalls G, Wong A, Bezuidenhout J, van Helden P, Bardin P, Lukey PT: In situ production of gamma interferon, interleukin-4, and tumor necrosis factor alpha mRNA in human lung tuberculous granulomas. *Infect. Immun.* (2000), 68, 2827-2836.
79. Fenhalls G, Stevens L, Bezuidenhout J, Amphlett GE, Duncan K, Bardin P, Lukey PT: Distribution of IFN-g, IL-4 and TNF-a protein and CD8 T cells producing IL-12p40 mRNA in human lung tuberculous granulomas. *Immunology* (2002),105, 325– 335.
80. Fitzgerald SD and Kaneene JB: Wildlife Reservoirs of Bovine Tuberculosis Worldwide: Hosts, Pathology, Surveillance, and Control *Veterinary Pathology* (2012),50(3) 488-499
81. Fratazzi C, Arbeit RD, Carini C, Remold HG: Programmed cell death of *Mycobacterium avium* serovar 4-infected human macrophages prevents the mycobacteria from spreading and induces mycobacterial growth inhibition by freshly added, uninfected macrophages. *J. Immunol.* (1997), 158, 4320–4327.
82. Flores-Villalva S, Suárez-Güemes F, Espitia C, Whelan AO, Vordermeier M, Gutiérrez-Pabello JA: Specificity of the tuberculin skin test is modified by use of a protein cocktail containing ESAT-6 and CFP-10 in cattle naturally infected with *Mycobacterium bovis*. *Clin Vaccine Immunol.* (2012), May;19(5):797-803.

83. Fraguas SA, Cunha-Abreu MS, Lilenbaum W, Marassi CD, Oelemann WMR, Fonseca LS: Use of ELISA as a confirmatory test for bovine tuberculosis at slaughter Preventive Veterinary Medicine Prev Vet Med. (2006), Dec 18;77(3-4):304-5.
84. Francis J: Bovine tuberculosis (1947), London: Staples Press
85. Francis J: Tuberculosis in Animals and Man. (1958), Cassell & Co. Ltd, London, p. 357.
86. Francis J, Seiler RJ, Wilkie WI, O'Boyle D, Lumsden MJ, Frost AJ: The sensitivity and specificity of various tuberculin tests using bovine PPD and other tuberculins. Veterinary Record (1978),103, 420– 435.
87. Frothingham R, Meeker-O'Connell WA: Genetic diversity in the Mycobacterium tuberculosis complex based on variable numbers of tandem DNA repeats. Microbiology (1998),144, 1189–1196.
88. Gallagher J, Jenkins PA: Mycobacterial diseases. In: Palmer SR, Soulsby L, Simpson DIH, editors. Zoonoses. New York: Oxford University Press; (1998) p. 155–64.
89. Gallagher J, Muirhead RH, Daykin JM, Smith JA, Beavan SD, Kirkham J, Turnbull AT, Davies JJ: Bovine TB and badgers (letter). Vet Rec (2005),156(17):555–6.
90. Garcia-Garcia ML, Ponce de Leon A, Jimenez-Corona ME, Palacios-Martinez M, Balandrano-Campos S, Ferreyra-Reyes L, Juarez-Sandino L, Small PM: Clinical consequences and transmissibility of drug-resistant tuberculosis in southern Mexico. Arch Intern Med (2000);160:630-6.
91. García-Jiménez WL, Benítez-Medina JM, Fernández-Llario P, Abecia JA, García-Sanchez A, Martínez R, Risco D, Ortiz-Pelaez A, Salguero FJ, Smith NH, Gómez L, Hermoso-de-Mendoza J:Comparative pathology of the natural infections by *Mycobacterium bovis* and by *Mycobacterium caprae* in wild boar (*Sus scrofa*). Transboundary and Emerging Diseases (2013). 60, 102–109.
92. Garnett BT, Delahay RJ, Roper TJ: Ranging behaviour of European badgers (*Meles meles*) in relation to bovine tuberculosis (*Mycobacterium bovis*) infection. Appl. Anim. Behav. Sci. (2005), 94, 331–340.
93. Garnier T, Eiglmeier K, Camus JC, Medina N, Mansoor H, Pryor M, DuthoyS, Grondin S, Lacroix C, Monsempe C, Simon S, Harris B, Atkin R, Doggett J, Mayes R, Keating L, Wheeler PR, Parkhill J, Barrell BG, Cole ST, Gordon SV, Hewinson RG:

- The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America (2003), 100, 7877–7882.
94. Gartner JM: *Mycobacterium bovis* infection in human beings. *Tuberculosis* 2001, 81(1/2), 71-77.
 95. Gibson A L, Hewinson G, Goodchild T, Watt B, Story A, Inwald J, Drobniewski FA: Molecular epidemiology of disease due to *Mycobacterium bovis* in humans in the United Kingdom. *J Clin Microbiol* (2004) 42: 431–434.
 96. Gonzalez-Llamazares OR, Gutierrez-Martín CB, Nistal DA, Redondo VADP, Dominguez-Rodriguez L., Rodriguez-Ferri EF: Field evaluation of the single intradermal cervical tuberculin test and the interferon-gamma assay for detection and eradication of bovine tuberculosis in Spain. *Veterinary Microbiology* (1999),70, 55–66.
 97. Good M, Duignan A: Perspectives on the history of bovine TB and the role of tuberculin in bovine TB eradication. *Veterinary Medicine International*. Volume 2011 (2011).Link:<http://dx.doi.org/10.4061/2011/410470>
 98. Gormley E, Doyle MB, McGill K, Costello E, Good M, Collins JD: The effect of the tuberculin test and the consequences of a delay in blood culture on the sensitivity of a gamma-interferon assay for the detection of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Veterinary Immunology and Immunopathology* (2004), 102, 413–420.
 99. Gormley E, Doyle MB, Fitzsimons T, McGill K, Collins JD: Diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle by use of the gamma-interferon (Bovigam) assay. *Vet Microbiol.* (2006), Feb 25;112(2-4):171-9.
 100. Gormley E, Corner LAL, Costello E, Rodriguez-Campos S: Bacteriological diagnosis and molecular strain typing of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium caprae* Research in Veterinary Science (2014), (97) S30–S43
 101. Gortazar C, Vicente J, Boadella M, Ballesteros C, Gallindo RC, Garrido J, Aranaz A, de la Fuente J: Progress in the control of bovine tuberculosis in Spanish wildlife. *Vet Microbiol.* (2011),151: 170–178.
 102. Grange JM, Yates MD: Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* infection. *Vet Microbiol* (1994), 40: 137-151.
 103. Grange JM: *Mycobacterium bovis* infection in human beings. *Tuberculosis* (2001), 81(1/2), 71-77.

104. Griffin JP, Dolan LA: The role of cattle-to-cattle transmission of *Mycobacterium bovis* in the epidemiology of tuberculosis in cattle in the Republic of Ireland: a review. *Irish Veterinary Journal* (1995), 48, 228–234.
105. Griffin JM, Williams DH, Kelly GE, Clegg TA, O’Boyle I, Collins JD, More SJ: The impact of badger removal on the control of tuberculosis in cattle herds in Ireland. *Preventive Veterinary Medicine* (2005), 67, 237–266.
106. Griffith DE: Testing for latent tuberculosis. Applying the best of intentions. *Ann Am Thorac Soc.* (2014), 11(4):594-5.
107. Guerrero A, Cobo J, Fortun J, Fortun J, Navas E, Quereda C, Asensio A, Canon J, Nosocomial transmission of *Mycobacterium bovis* resistant to 11 drugs in people with advanced HIV-1 infection. *Lancet* (1997), 350: 1738–1742.
108. Gutierrez-Pabello JA, McMurray DN, Adams LG: Upregulation of thymosin b-10 by *Mycobacterium bovis* infection of bovine macrophages is associated with apoptosis. *Infect. Immun.* (2002), 70, 2121–2127.
109. Gutierrez M, Samper S, Jimenez MS, van Embden JDA, Garcia-Marin JF, Martin C: Identification by spoligotyping of a caprine genotype in *Mycobacterium bovis* strains causing human tuberculosis. *J Clin Microbiol* (1997), 35(12):3328–30.
110. Gutierrez MC, Brisse S, Brosch R, Fabre M, Omais B, Marmiesse M, Supply P, Vincent V: Ancient origin and gene mosaicism of the progenitor of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathogens* (2005), 1, e5.
111. Haddad N, Masselot M, Durand B: Molecular differentiation of *Mycobacterium bovis* isolates. Review of main techniques and applications, *Research in Veterinary Science* (2004), 76 1–18
112. Haehy T, Griffin JM, Collins JD: The prevalence of tuberculosis in herds reconstituted following a depopulation. In: Selected papers, Tuberculosis Investigation Unit, University college Dublin, (1995),pp 12-17.
113. Hershberg R, Lipatov M, Small PM, Sheffer H, Niemann S, Homolka S, Roach JC, Kremer K, Petrov DA, Feldman MW, Gagneux S: High functional diversity in *Mycobacterium tuberculosis* driven by genetic drift and human demography. *PLoS Biology* (2008), 6, e311.
114. Hope JC, Thom ML, Villarreal-Ramos B, Vordermeier HM, Hewinson RG, Howard CJ, Exposure to *Mycobacterium avium* induces low-level protection from

- Mycobacterium bovis infection but compromises diagnosis of disease in cattle. Clin. Exp. Immunol. (2005),141, 432–439.
115. Horwitz MA, Harth G, Dillon BJ, Maslesa-Galic S. Recombinant bacillus calmette-guerin (BCG) vaccines expressing the Mycobacterium tuberculosis 30-kDa major secretory protein induce greater protective immunity against tuberculosis than conventional BCG vaccines in a highly susceptible animal model. Proc Natl Acad Sci U S A. (2000), Dec 5;97(25):13853-8.
 116. Hughes MS, Ball NW, McCarroll J, Erskine M, Taylor MJ, Pollock JM, Skuce RA, Neill, SD: Molecular analyses of mycobacteria other than the M. tuberculosis complex isolated from Northern Ireland cattle. Veterinary Microbiology (2005),108, 101–112.
 117. Humblet MF, Moyon JL, Bardoux P, Boschirolu ML, Saegerman C: The importance of awareness for veterinarians involved in cattle tuberculosis skin testing Transbound Emerg Dis. (2011), Dec;58(6):531-6.
 118. Inwald J, Hinds J, Palmer S, Dale J, Butcher P, Hewinson RG, Gordon SV: Genomic analysis of Mycobacterium tuberculosis complex strains used for production of purified protein derivative. Journal of Clinical Microbiology (2003), 41 (4), 3929–3932.
 119. Javed MT, Aranaz A, de Juan L, Bezos J, Romero B, Álvarez J, Lozano C, Mateos A, Dominguez L: Improvement of spoligotyping with additional spacer sequences for characterization of Mycobacterium bovis and M. caprae isolates from Spain. Tuberculosis (2007),87, 437–445.
 120. Jensen KA: Bovine tuberculosis in man and cattle. In Advances in the control of zoonoses. WHO/FAO Seminar on Zoonoses, Vienna, November 1952. Geneva: World Health Organization. 1953: 11.
 121. Johnson L, Dean G, Rhodes S, Hewinson G, Vordermeier M, Wangoo M: Low-dose Mycobacterium bovis infection in cattle results in pathology indistinguishable from that of high-dose infection. Tuberculosis (2007), 87, 71–76
 122. Jolley ME, Nasir MS, Surujballi OP, Romanowska A, Renteria TB, De la Mora A, Lim A, Bolin SR, Michel AL, Kostovic M, Corrigan E: Fluorescence polarization assay for the detection of antibodies to Mycobacterium bovis in bovine sera. Veterinary Microbiology (2007),120; 113–121.

123. Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, van Aqterveld M, van Soolingen D, Kuijper S, Bunschoten A, Molhuizen H, Shaw R, Goyal M, van Embden J: Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J. Clin. Microbiol.* (1997), 35:907–914.
124. Kaplan G, Post FA, Moreira AL, Wainwright H, Kreiswirth BN, Tanverdi M, Mathema B, Ramaswamy SV, Walther G, Steyn LM, Barry CE, Bekker LG: *Mycobacterium tuberculosis* growth at the cavity surface: a microenvironment with failed immunity. *Infect. Immun.* (2003),71, 7099–7108.
125. Karlsson A G, Lessel E F: *Mycobacterium bovis* nom. nov. *Int J Syst Bacteriol* (1970), 20: 273-282.
126. Karolemeas K, de la Rua-Domenech R, Cooper R, Goodchild AV, Clifton-Hadley RS, Conlan AJ, Mitchell AP, Hewinson RG, Donnelly CA, Wood JL, McKinley TJ: Estimation of the relative sensitivity of the comparative tuberculin skin test in tuberculous cattle herds subjected to depopulation. *PLoS ONE* (2012),7; e43217.
127. Kaufmann SHE, Schaible UE: 100th anniversary of Robert Koch’s Nobel Prize for the discovery of the tubercle bacillus. *Trends in Microbiology* (2005),13 (10), 469–475.
128. Keane J, Balcewicz-Sablinska MK, Remold HG, Chupp GL, Meek BB, Fenton MJ, Kornfeld H: Infection by *Mycobacterium tuberculosis* promotes human alveolar macrophage apoptosis. *Infect. Immun.* (1997),65, 298–304.
129. Keane J, Remold HG, Kornfeld H: Virulent *Mycobacterium tuberculosis* strains evade apoptosis of infected alveolar macrophages. *J. Immunol.* (2000),164, 2016–2020.
130. Kisich KO, Higgins M, Diamond G, Heifets L: Tumor necrosis factor alpha stimulates killing of *Mycobacterium tuberculosis* by human neutrophils. *Infect. Immun.* (2002),70, 4591–4599.
131. Krebs JR, Anderson R, Clutton-Brock T, Morrison I, Young D, Donnelly C: *Bovine Tuberculosis in Cattle and Badgers*. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food (MAFF) Publications, (1997), London.
132. Lalošević D, Prašević S, Davidov I, Putić S, Vasić I: *Praktikum patološke histologije*, Mostart –Zemun (2011), st. 20.
133. Lesslie IW, Hebert CN, Burn KJ, MacClancy BN, Donnelly WJC: Comparison of the specificity of human and bovine tuberculin PPD for testing cattle [a series of three related articles]. *Veterinary Record* (1975), 96, 332–341.

134. Liebana E, Aranaz A, Aldwell FE, McNair J, Neill SD, Smyth AJ, Pollock JM: Cellular interactions in bovine tuberculosis: release of active mycobacteria from infected macrophages by antigen stimulated T cells. *Immunology* (2000), 99, 23–29.
135. Liebana E, Johnson L, Gough J, Durr P, Jahans K, Clifton-Hadley R, Spencer Y, Hewinson RG, Downs SH: Pathology of naturally occurring bovine tuberculosis in England and Wales. *The Veterinary Journal* (2008), 176 (3), 354–360.
136. Lilenbaum W, Schettini JC, Souza GN, Ribeiro ER, Moreira EC, Fonseca LS: Comparison between a gamma-IFN assay and intradermal tuberculin test for the diagnosis of bovine tuberculosis in field trials in Brazil. *J. Vet. Med. B* (1999), 46 (5), 353–358.
137. Lin M, Sugden EA, Jolley ME, Stilwell K: Modification of the *Mycobacterium bovis* extracellular protein MPB70 with fluorescein for rapid detection of specific serum antibodies by fluorescence polarization. *Clin Diagn Lab Immunol.* (1996), Jul;3(4): 438-43.
138. Liss GM, Wong L, Kittle DC, Simor A, Martiquet P, Misener CR: Occupational exposure to *Mycobacterium bovis* infection in deer and elk in Ontario. *Can J Public Health* (1994),85(5):326–9.
139. Lyashchenko KP, Pollock JM, Colangeli R, Gennaro ML: Diversity of antigen recognition by serum antibodies in experimental bovine tuberculosis. *Infect. Immun.* (1998), 66, 5344–5349.
140. Marassi CD, Medeiros L, Lilenbaum W: The use of Gamma-Interferon assay to confirm a diagnosis of Bovine Tuberculosis in Brazil. *Acta Tropica* (2009),113(2):199-201
141. Marassi C, Medeiros L, FigueiredoE, Fonseca LS, Duarte R, PaschoalinV, Oelemann WMR, Lilenbaum W: A multidisciplinary approach to diagnose naturally occurring bovine tuberculosis in Brazil *Pesq. Vet. Bras.* (2013), vol.33 no.1 Rio de Janeiro.
142. McIlroy SG, Neill SD, McCracken RM: Pulmonary lesions and *Mycobacterium bovis* excretion from the respiratory tract of tuberculin reacting cattle. *Vet. Rec.* (1986),118, 718–721.
143. McInerney J, Small KJ, Caley P: The prevalence of *Mycobacterium bovis* infection in feral pigs in the Northern Territory. *Aust. Vet. J.* (1995), 72, 448–451.

144. Michel AL, Muller B, van Helden PD: Mycobacterium bovis at the animal–human interface: A problem, or not? *Veterinary Microbiology* (2010), 140; 371–381.
145. Milian-Suazo F, Harris BB, Diaz CA, Romero Torres C, Stuber T, Ojeda GA, Loredó AM, Soria MP, Payeur JB: Molecular epidemiology of Mycobacterium bovis: usefulness in international trade. *Prev. Vet. Med.* (2008), 87, 261–271.
146. Moda G, Daborn CJ, Grange JM, Cosivi O: The zoonotic importance of Mycobacterium bovis. *Tubercle Lung Dis* (1996), 77: 103-108.
147. Moda G: Non-technical constraints to eradication: The Italian experience *Veterinary Microbiology* (2006), 112, 253–258.
148. Mohan VP, Scanga CA, Yu K, Scott HM, Tanaka KE, Tsang E, Tsai MM, Flynn JL, Chan J: Effects of tumor necrosis factor alpha on host immune response in chronic persistent tuberculosis: possible role for limiting pathology. *Infect Immun.* (2001), 69(3):1847-55.
149. Monaghan ML, Doherty ML, Collins JD, Kazda JF, Quinn PJ: The tuberculin test. *Veterinary Microbiology* (1994), (40), 111–124.
150. Monaghan M, Quinn PJ, Kelly AP, McGill K, McMurray C, O’Crowley K, Bassett HF, Costello E, Quigley F, Rothel JS, Wood PR, Collins JD: A pilot trial to evaluate the interferon assay for the detection of Mycobacterium bovis infected cattle under Irish conditions. *Irish Veterinary Journal* (1997), 50, 229–232.
151. Monies RJ, Cranwell MP, Palmer N, Inwald J, Hewinson RG, Rule B: Bovine TB in domestic cats. *Vet Rec* (2000), 146:407–8.
152. Moonan PK, Chatterjee GS, Lobue AP: The molecular epidemiology of human and zoonotic Mycobacterium bovis: The intersection between veterinary medicine and public health *Preventive Veterinary Medicine* (2009), 88; 226–227
153. More SJ, Clegg TA, McGrath G, Collins JD, Corner LA, Gormley E: Does reactive badger culling lead to an increase in tuberculosis in cattle? *Veterinary Record* (2007), (11), 208–209.
154. Morris RS, Pfeiffer DU, Jackson R: The epidemiology of Mycobacterium bovis infections. *Veterinary Microbiology* (1994), 40, 153–177.
155. Morris RS, Pfeiffer DU: Directions and issues in bovine tuberculosis epidemiology and control in New Zealand. *N.Z. Vet. J* (1995), 43, 256–265.

156. Morrison WI, Bourne FJ, Cox DR, Donnelly CA, Gettinby G, McInerney JP, Woodroffe R: Pathogenesis and diagnosis of infections with *Mycobacterium bovis* in cattle. *Veterinary Record* (2000),146, 236–242.
157. Mostowy S, Cousins D, Brinkman J, Aranaz A, Behr MA: Genomic deletions suggest a phylogeny for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *The Journal of Infectious Diseases* (2002), (186) 74–80.
158. Neill SD, Hanna J, O'Brien JJ, McCracken RM: Excretion of *Mycobacterium bovis* by experimentally infected cattle. *Veterinary Record* (1988), 123, 340–343.
159. Neill SD, Hanna J, Mackie DP, Bryson TG: Isolation of *Mycobacterium bovis* from the respiratory tracts of skin testnegative cattle. *Vet Rec* (1992), 131: 45-47.
160. Neill SD, Hanna J, Pollock J, Mackie DP, Cassidy J, Clements A, Bryson DB: The diagnosis of bovine tuberculosis by blood testing. In: *Proceedings of the Society for Veterinary Epidemiology and Preventive Medicine*. Queen's University, Belfast, (1994), pp. 1–8.
161. Neill SD, Bryson DB, Pollock JM: Pathogenesis of tuberculosis in cattle. *Tuberculosis* (2001), 81, 79–86.
162. Nebreda T, Alvarez-Prida E, Blanco B, Remacha MA, Samper S, Jimenez MS: Peritoneal tuberculosis due to *Mycobacterium caprae*. *IDCases* 4 (2016), 50–52
163. Norby B, Bartlett PC, Fitzgerald SD, Granger LM, Brunning- Fann CS, Whipple DL, Payeur JB: The sensitivity of gross necropsy, caudal fold and comparative cervical tests for the diagnosis of bovine tuberculosis. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* (2004),16, 126–131.
164. O'Brien DJ, Fitzgerald SD, Lyon TJ, Butler KL, Fierke JS, Clarke KR, Schmitt SM, Cooley TM, Berry DE: Tuberculous lesions in free-ranging white-tailed deer in Michigan. *J. Wildlife Dis.* (2001), 37, 608–613.
165. OIE terrestrial manual: List of tests for international trade (1996).
166. Orme IM: The immunopathogenesis of tuberculosis: a new working hypothesis. *Trend. Microbiol.* (1998), 6, 94–97.
167. Parreiras PM, Lobato CF, Alencar PA, de Figueiredo T, Gomes MH, Boéchat N, Lage PA, Assis AR, Pereira ASM, Souza RP, Mota MPCP, Suffys NP: Drug Susceptibility of Brazilian Strains of *Mycobacterium bovis* Using Traditional and Molecular Techniques *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, (2004), Vol. 99(7): 749-752

168. Pavlik I, Dvorska L, Matilova L, Svastova P, Parmova I, Bazant J, Veleba J: Mycobacterial infections in cattle in the Czech Republic during 1990–1999. *Vet. Med. – Czech*(2002), 47, (9): 241–250
169. Pearson, C.W., Corner, L.A., Lepper, A.W.D: Tuberculin sensitivity of cattle inoculated with atypical mycobacteria isolated from cattle, feral pigs and trough water. *Australian Veterinary Journal*(1977), 53, 67–71.
170. Perez-Guerrero L, Milian-Suazo F, Arriaga-Díaz C, Romero-Torres C, Escartun-Chavez M: Molecular epidemiology of cattle and human tuberculosis in Mexico (2008), *Salud Publica de Mexico* 50, 286–291.
171. Phillips CJC, Foster CRW, Morris PA, Teverson R: The transmission of *Mycobacterium bovis* infection to cattle. *Res Vet Sci* (2003),74:1–15.
172. Pollock JM, Pollock DA, Campbell DA, Grivin RM, Crockard AD, Neill SD, Mackie DP: Dynamic changes in circulating and antigen-responsive T-cell subpopulations post-*Mycobacterium* infection in cattle. *Immunology* (1996), 87(2):236-41.
173. Pollock JM, Buddle BM, Andersen P: Towards more accurate diagnosis of bovine tuberculosis using defined antigens. *Tuberculosis* (2001), 81 (1/2), 65–69.
174. Pollock JM, Neill SD: *Mycobacterium bovis* infection and tuberculosis in cattle. *The Veterinary Journal* (2002),163, 115–127.
175. Pollock, J.M., McNair, J., Bassett, H., Cassidy, J.P., Costello, E., Aggerbeck, H., Rosenkrands, I., Andersen, P.. Specific delayed-type hypersensitivity responses to ESAT-6 identify tuberculosis-infected cattle. *J. Clin.Microbio*(2003),l. 41, 1856–1860.
176. Pollock JM, Welsh MD, McNair J: Immune responses in bovine tuberculosis: Towards new strategies for the diagnosis and control of disease. *Veterinary Immunology and Immunopathology* (2005),108, 37–43.
177. Prodinger WM, Eigentler A, Allerberger F, Schonbauer M, Glawischnig W: Infection of red deer, cattle, and humans with *Mycobacterium bovis* subsp. *Caprae* in western Austria. *Journal of Clinical Microbiology*(2002), 40, 2270–2272.
178. Prodinger WM, Brandstätter A, Naumann L, Pacciarini M, Kubica T, Boschirolini ML, Aranaz A, Nagy G, Cvetnic Z, Ocepek M, Skrypnik A, Erler W, Niemann S, Pavlik I, Moser I: Characterization of *Mycobacterium caprae* isolates from Europe by mycobacterial interspersed repetitive unit genotyping. *Journal of Clinical Microbiology* (2005),43, 4984–4992.

179. Pušić I, Lalošević D, Bugarski D, Prodanov J, Grgić Ž, Urošević M, Lupulović D: Epizootiološke karakteristike tuberkuloze goveda u Južnobačkom okrugu = Epizootiological characteristics of bovine tuberculosis in South Backa region. *Arhiv veterinarske medicine*, ISSN 1820-9955, 2, 1, str.55-63, (2009).
180. Reviriego Gordejo FJ, Vermeersch JP: Towards eradication of bovine tuberculosis in the European Union. *Vet. Microbiol.* (2006), 112, 101– 109.
181. Reddington K, O’Grady J, Dorai-Raj S, Niemann S, van Soolingen D, Barry T: A novel multiplex real-time PCR for the identification of mycobacteria associated with zoonotic tuberculosis. *PLoS One* (2011), 6, e23481.
182. Rey JL, Villon A, Saliou P: La tuberculose bovine dans le Sahel Voltaïque. Correlation avec la tuberculose humaine. Paris: Organisation de Cooperation et de Coordination pour la lutte contre les Grandes Endemies. (1977), Technical Document No. 6.738.
183. Riviere JK, Carabin Y, LeStrat P, Hendrikx P, Dufour B: Bovine tuberculosis surveillance in cattle and free-ranging wildlife in EU Member States in 2013: A survey-based review *Veterinary Microbiology* (2014), 173,323–331.
184. Robinson P, Morris D, Antic R: *Mycobacterium bovis* as an occupational hazard in abattoir workers. *Aust NZ J Med* (1988), 18: 701-703.
185. Rodríguez LP, Sánchez S, Pérez L, Herrera MS, Jiménez S, Samper MJ: Iglesias Human tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* and *M. caprae* in Spain, 2004–2007. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* (2009),13(12):1536–1541.
186. Rodriguez-Campos S, Smith NH, Boniottic MB, Aranaz A: Overview and phylogeny of *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms: Implications for diagnostics and legislation of bovine tuberculosis. *Research in Veterinary Science* 97 (2014), S5–S19
187. Rodgers JD, Connery NL, McNair J Welsh MD, Skuce RA, Bryson DG, McMurray DN, Pollock JM: Experimental exposure of cattle to a precise aerosolised challenge of *Mycobacterium bovis*: A novel model to study bovine tuberculosis *Tuberculosis* (2007), 87, 405–414
188. Rodwell TC, Kapasi AJ, Moore M, Milian-Suazo F, Harris B, Guerrero LP, Moser K, Strathdee SA, Garfein RS: Tracing the origins of *Mycobacterium bovis*_tuberculosis_in

- humans in the USA to cattle in Mexico using spoligotyping. *Int J Infect Dis.* (2010),14 Suppl 3:e129-35
189. Romero B, Aranaz A, Bezos J, Alvarez J, de Juana L, Javed TM, Mateosa A, Gomez-Mampaso E, Dominguez L: Drug susceptibility of Spanish *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates from animals. *Tuberculosis* (2007), Nov;87(6):565-71.
 190. Rothel JS, Jones SL, Corner LA, Cox JC, Wood PR: The gamma-interferon assay for diagnosis of bovine tuberculosis in cattle: conditions affecting the production of gamma-interferon in whole blood culture. *Australian Veterinary Journal* (1992),69,1–4.
 191. Rua-Domenech de la R: Human *Mycobacterium bovis* infection in the United Kingdom: Incidence, risks, control measures and review of the zoonotic aspects of bovine tuberculosis. *Tuberculosis* (2006b), (86) 77–109.
 192. Rua –Domenech de la R., Goodchild AT, Vordermeier HM, Hewinson RG, Christiansen KH, Clifton-Hadley RS: *Ante mortem* diagnosis of tuberculosis in cattle: a review of the tuberculin tests, gamma-interferon assay and other ancillary diagnostic techniques. *Res. Vet. Sci.* (2006)a, 81, 190–210.
 193. Ruettinger A, Nieter J, Skrypnik A, Engelmann I, Ziegler A, Moser I, Monecke S, Ehrlich R, Sachse K: Rapid Spoligotyping of *Mycobacterium tuberculosis* Complex Bacteria by Use of a Microarray System with Automatic Data Processing and Assignment *Journal of Clinical Microbiology* (2012), p. 2492–2495
 194. Ryan TJ, Buddle BM, de Lisle GW: An evaluation of the gamma-interferon test for detecting bovine tuberculosis in cattle 8 to 28 days after tuberculin skin testing. *Research in Veterinary Science* (2000), 69, 57–61.
 195. Samper S, Martin C: Spread of extensively drug-resistant tuberculosis. *Emerg Infect Dis* (2007), 13: 647–648.
 196. Saunders BM, Cooper AM: Restraining mycobacteria: role of granulomas in mycobacterial infections. *Immunol. Cell Biol.* (2000), 78, 334–341.
 197. Sauret J, Jolis R, Ausina V, Castro E, Cornudella R: Human tuberculosis due to *Mycobacterium bovis*: report of 10 cases. *Tubercle Lung Dis* (1992),73:388–91.
 198. Seah TG, Rook GAW: IL-4 influences apoptosis of mycobacterium-reactive lymphocytes in the presence of TNF α . *J. Immunol.* (2001) 167, 1230–1237.

199. Scorpio A, Zhang Y: Mutations in *pncA*, a gene encoding pyrazinamidase/nicotinamidase, cause resistance to the antituberculous drug pyrazinamide in tubercle bacillus. *Nat Med* (1996), 2:662–7.
200. Schiller I, Oesch B, Vordermeier HM, Palmer M.V., Harris, B.N., Orloski, K.A., Buddle, B.M., Thacker, T.C., Lyashchenko, K.P., Waters, WR: Bovine tuberculosis: a review of current and emerging diagnostic techniques in view of their relevance for disease control and eradication. *Transbound. Emerg. Dis.* (2010a), 57, 205–220.
201. Schiller I, Vordermeier HM, Waters WR, Kyburz A, Cagiola M, Whelan A, Palmer MV, Thacker T, Meijlis J, Carter C, Gordon S, Egnuni T, Hardegger R, Marg-Haufe B, Raeber A, Oesch B: Comparison of tuberculin activity using the interferon-assay for the diagnosis of bovine tuberculosis. *Vet. Rec.* (2010b), 167:322–326.
202. Schiller I, Waters WR, Vordermeier HM, Jemmi T, Welsh M, Keck N, Whelan A, Gormley E, Boschirola ML, Moyon JL, Vela C, Cagiola M, Buddle MB, Palmer M, Thacker T, Oesch B : Bovine tuberculosis in Europe from the perspective of an officially tuberculosis free country: Trade, surveillance and diagnostics. *Veterinary Microbiology* (2011), 151;153–159.
203. Schliesser T: Die Bekämpfung der Rindertuberkulose-Tierversuch der Vergangenheit. *Prax Pneumonol* (1974), 28 Supplement: 870-874.
204. Schmitt SM, O’Brien DJ, Bruning-Fann, CS, Fitzgerald SD: Bovine tuberculosis in Michigan wildlife and livestock. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* (2002), 969, 262–268.
205. Schroeder BHR, Doherr MG, Moyon JL, Gormley E, Raeber AJ: Evaluation of the diagnostic performance of peptide cocktails in the interferon gamma assay for diagnosis of tuberculosis in cattle. 2nd Congress of the European Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians. (2012), 1–4 July, Kazimierz Dolny, Poland, S4-O-03.
206. Sechi LA, Zanetti S, Sanguinetti M, Molicotti P, Romano L, Leori G, Delogu G, Boccia S, La Sorda M, Fadda G: Molecular basis of rifampin and isoniazid resistance in *Mycobacterium bovis* strains isolated in Sardinia, Italy. *Antimicrob Agents Chemother* (2001), 45:1645–8.
207. Sheridan M: Progress in tuberculosis eradication in Ireland *Veterinary Microbiology* (2011), 151; 160–169

208. Small PM, Hopewell PC, Singh SP, et al. The epidemiology of tuberculosis in San Francisco: a population-based study using conventional and molecular methods. *N Engl J Med* (1994),330:1703-9
209. Sjögren I, Hillerdal O. Bovine tuberculosis in man; reinfection or endogenous exacerbation. *Scand J Resp Dis* (1978), 59:167–70.
210. Smith NH, Hewinson RG, Kremer K, Brosch R, Gordon SV: Myths and misconceptions: the origin and evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature Reviews in Microbiology* (2009),7, 537–544.
211. Smith NH, Berg S, Dale J, Allen A, Rodriguez S, Romero B., et al., European 1: a globally important clonal complex of *Mycobacterium bovis*. *Infection, Genetics and Evolution* (2011),11, 1340–1351.
212. Smith NH: The global distribution and phylogeography of *Mycobacterium bovis* clonal complexes. *Infection Genetics and Evolution* (2012),12, 857–865.
213. Snider DE: The tuberculin skin test. *American Review of Respiratory Diseases* (1982), 125 (3), 108–118.
214. Sreevatsan S, Pan X, Stockbauer KE, Stockbauer KE, Connell ND, Kreiswirth BN, Whittam TS, Musser JM. Restricted structural gene polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis* complex indicates evolutionarily recent global dissemination. *Proc Nat Acad Sci USA* (1997),94:9869–74.
215. Supply P, Lesjean S, Savine E, Kremer K, Van Soolingen D, Locht C: Automated high-throughput genotyping for study of global epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* based on mycobacterial interspaced repetitive units. *J. Clin. Microbiol.* (2001),39, 3563–3571.
216. Supply P, Marceau M, Mangenot S, Roche D, Rouanet C, Khanna V, Majlessi L, Criscuolo A, Tap J, Pawlik A, Fiette L, Orgeur M, Fabre M, Parmentier C, Frigui W, Simeone R, Boritsch EC, Debrie AS, Willery E, Walker D, Quail MA, Ma L, Bouchier C, Salvignol G, Sayes F, Cascioferro A, Seemann T, Barbe V, Locht C, Gutierrez MC, Leclerc C, Bentley SD, Stinear TP, Brisse S, Medigue C, Parkhill J, Cruveiller S, Brosch R: Genomic analysis of smooth tubercle bacilli provides insights into ancestry and pathoadaptation of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature Genetics* (2013), 45, 172–179.

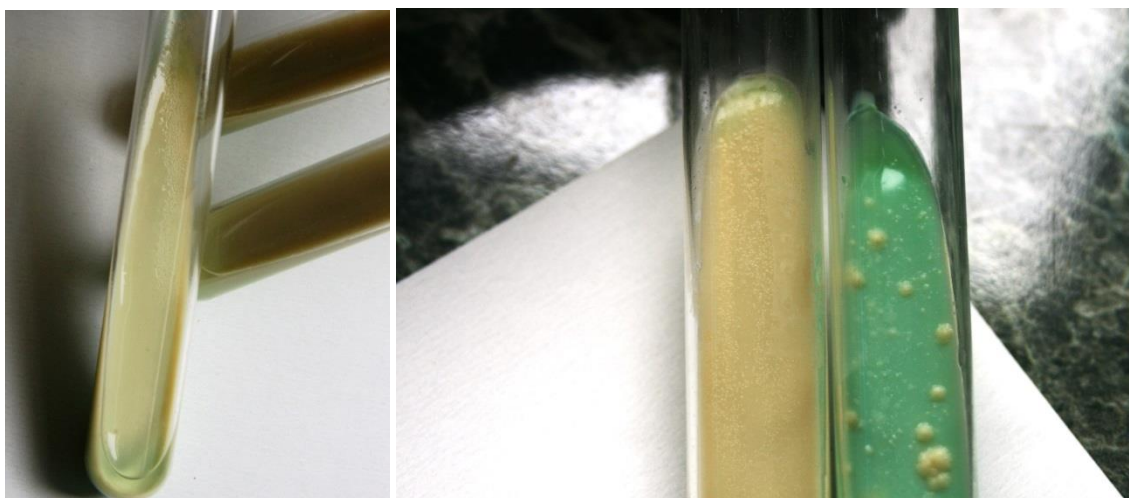
217. Surujballi OP, Romanowska A, Sugden EA, Turcotte C, Jolley ME: A fluorescence polarization assay for the detection of antibodies to *Mycobacterium bovis* in sera. *Veterinary Microbiology* (2002),87, 149–157.
218. Taylor GM, Murphy E, Hopkins R, Rutland P, Chistov Y: First report of *Mycobacterium bovis* DNA in human remains from the Iron Age. *Microbiology*. (2007), 153(Pt 4):1243-9.
219. Thorns CJ, Morris JA: The immune spectrum of *Mycobacterium bovis* infections in some mammalian species: a review. *Veterinary Bulletin, Weybridge* (1983), 53, 543–550.
220. Thom M, Morgan JH, Hope JC, Villareal-Ramos B, Martin M, Howard CJ: The effect of repeated tuberculin skin testing of cattle on immune responses and disease following experimental infection with *Mycobacterium bovis*. *Veterinary Immunology and Immunopathology* (2004) 102, 399–412.
221. Torgerson PR, Torgerson DJ: Public health and bovine tuberculosis: what's all the fuss about? *Trends in Microbiology* (2009), Vol.18 No.2, 67-72.
222. Turner OC, Basaraba RJ, Orme IM: Immunopathogenesis of pulmonary granulomas in the guinea pig after infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* (2003)71, 864–871.
223. Tweedle NE, Livingstone P: Bovine tuberculosis control and eradication programs in Australia and New Zealand. *Veterinary Microbiology* (1994), 40, 23–39.
224. Van Crevel R, Karyadi E, Preyers F, Leenders M, Kullberg BJ, Nelwan RHH, van der Meer JWM: Increased production of interleukin 4 by CD4+ and CD8+ T cells from patients with tuberculosis is related to the presence of pulmonary cavities. *J. Infect. Dis.* (2000),181, 1194–1197.
225. van Soolingen D: Molecular epidemiology of tuberculosis and other mycobacterial infections: main methodologies and achievements. *J. Intern. Med.* 2001, 249 (1), 1–26.
226. Vazquez-Chacon CA, Martínez-Guarneros A, Couvin D, Gonzalez-y-Merchand JA, Rivera-Gutierrez S, Escobar-Gutierrez A, De-la-Cruz Lopez JJ, Gomez-Bustamante A, Gonzalez-Macal GA, Gonçalves Rossi LM, Muniz-Salazar R, Rastogi N, Vaughan G: Human multidrug-resistant *Mycobacterium bovis* infection in Mexico *Tuberculosis* (2015), 95 , 802-809.

227. Viera AJ, Garrett JM: Understanding Interobserver Agreement: The Kappa Statistic (Fam Med (2005),37(5):360-3.
228. Vordermeier M, Aranaz A, Pollock JM: Immunodiagnosis of bovine tuberculosis. Tuberculosis (2001),81(1/2), 177–180.
229. Vordermeier HM, Chambers MA, Buddle BM, Pollock JM, Hewinson RG: Progress in the development of vaccines and diagnostic reagents to control tuberculosis in cattle. Vet J. (2006), Mar;171(2):229-44. Review.
230. Vordermeier HM, Gordon SV, Hewinson RG: Advances in immunological diagnosis: antigen mining to define *M. bovis* antigens for the differential diagnosis of vaccinated and infected animals. In: *M. bovis V Conference*, Wellington, New Zealand, (2009), Proceedings. p. 32.
231. Vordermeier HM, Gordon SV, Hewinson RG: Mycobacterium bovis antigens for the differential diagnosis of vaccinated and infected cattle. Vet. Microbiol. (2011),15:8–13.
232. Waters WR, Nonnecke BJ, Palmer MV, Robbe-Austermann S, Bannantine JP, Stabel JR, Whipple DL, Payeur JB, Estes DM, Pitzer JE, Minion FC: Use of recombinant ESAT6:CFP-10 fusion protein for differentiation of infections of cattle by *Mycobacterium bovis* and by *M. avium* subsp. *avium* and *M. avium* subsp. *paratuberculosis*. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology (2004),11 (4), 729–735.
233. Waters WR, Palmer MV, Thacker TC, Bannantine JP, Vordermeier HM, Hewinson RG, Greenwald R, Esfandiari J, McNair J, Pollock JM, Andersen P, Lyashchenko KP: Early antibody responses to experimental *Mycobacterium bovis* infection of cattle. Clin. Vaccine Immunol. (2006), 13, 648–654.
234. Waters WR, Nonnecke BJ, Olsen SC, Palmer MV: Effects of pre-culture holding time and temperature on interferon- γ responses in whole blood cultures from *Mycobacterium bovis*-infected cattle, Veterinary Microbiology (2007), 119, 277–282.
235. Waters WR, Buddle BM, Vordermeier HM, Gormley E, Palmer MV, Thacker TC, Bannantine JP, Stabel JR, Linscott R, Martel E, Milian F, Foshaug W, Lawrence JC: Development and evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for use in the detection of bovine tuberculosis in cattle. Clin. Vaccine Immunol. (2011),18 (11),1882–1888.

236. Waters WR, Palmer MV, Buddle BM, Vordermeier HM: Bovine tuberculosis vaccine research: historical perspectives and recent advances. *Vaccine* (2012),30 (16), 2611–2622.
237. Waters W.R., Mayara F. Maggioli Jodi L. McGill, Konstantin P. Lyashchenko Mitchell V. Palmer Relevance of bovine tuberculosis research to the understanding of human disease: Historical perspectives, approaches, and immunologic mechanisms *Vet Immunol Immunopathol.* (2014), Jun 15;159(3-4):113-32.
238. Wedlock DN, Skinner MA, Parlane NA: Vaccination of cattle with DNA vaccines encoding the mycobacterial antigens MPB70 and MPB83: protein boosting induces antibody and does not enhance vaccine efficiency. *Tuberculosis* (2000)83, 339–349.
239. Wedlock DN, Skinner MA, De Lisle GW, Buddle BM: Control of *Mycobacterium bovis* infections and the risk to human populations (2002), *Microbes Infect.* 4, 471–480.
240. Welsh DM, Cunningham RT, Corbett DM, Girvin RM, McNair J, Skuce RA, Bryson DG, Pollock JM: Influence of pathological progression on the balance between cellular and humoral responses in bovine tuberculosis. *Immunology* (2005)114, 101–111.
241. Whipple DL, Bolin CA, Davis AJ, Jarnagin JL, Johnson DC, Nabors RS, Payeur JB, Saari DA, Wilson AJ, Wolf MM: Comparison of sensitivity of the caudal fold skin test and commercial gamma-interferon assay for diagnosis of bovine tuberculosis. *American Journal of Veterinary Research* (1995), 56, 415–419.
242. Whipple DL, Bolin CA, Miller JM: Distribution of lesions in cattle infected with *Mycobacterium bovis*. *J. Vet. Diagn. Invest.* (1996), 8, 351–354.
243. Whipple DL, Palmer MV, Slaughter RE, Jones SL: Comparison of purified protein derivatives and effect of skin testing on results of a commercial gamma-interferon assay for diagnosis of tuberculosis in cattle. *Journal of Veterinary Diagnosis and Investigation* (2001),13, 117–122.
244. Wood PR, Corner LA, Rothel JS, Baldock C, Jones SL, Cousins DB, McCormick BS, Francis BR, Creeper J, Tweedle NF: Field comparison of the interferon-gamma assay and intradermal tuberculin test for the diagnosis of bovine tuberculosis. *Australian Veterinary Journal* (1991) 68, 286–290.

245. Wood, P.R., Corner, L.A., Rothel, J.S., Ripper, J.L., Fifis, T., McCormick, B.S., Francis, B., Melville, L., Small, K., De Witte, K., Tolson, J., Ryan, T.J., de Lisle, G.W., Cox, J.C., Jones, S.L., (1992), A field evaluation of serological and cellular diagnostic tests for bovine tuberculosis. *Veterinary Microbiology* 31, 71–79.
246. Wood PR, Rothel JS: In vitro immunodiagnostic assays for bovine tuberculosis. *Veterinary Microbiology* (1994), 40, 125–135.
247. Wood PR, Jones SL, Bovigam: an in vitro cellular diagnostic test for bovine tuberculosis. *Tuberculosis* 81, (2001), 147–155.

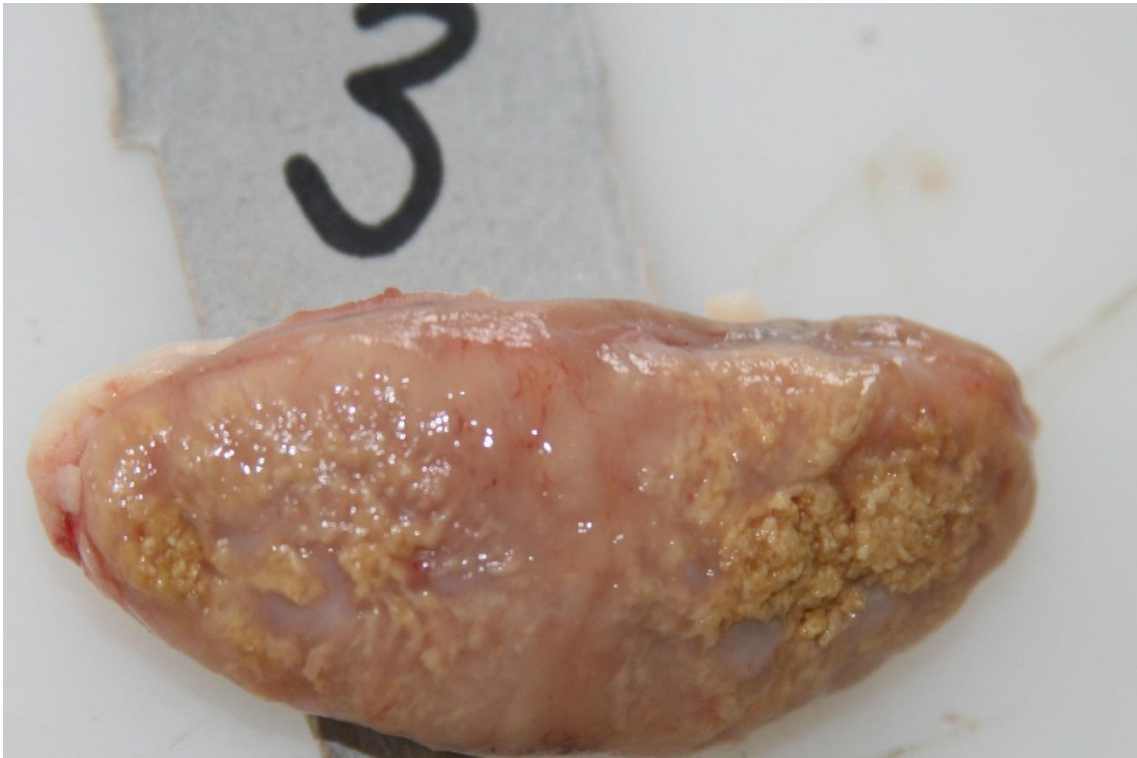
9. PRILOG-FOTODOKUMENTACIJA



Slika1 i 2. Sitne disgonične kolonije *M.caprae* na podlogama po Löwenstein-Jensen-u i uporedni prikaz kolonija *M.caprae* i *M.tuberculosis*



Slika3. Izolati *M.caprae* iz uzoraka ispitivanih govoda



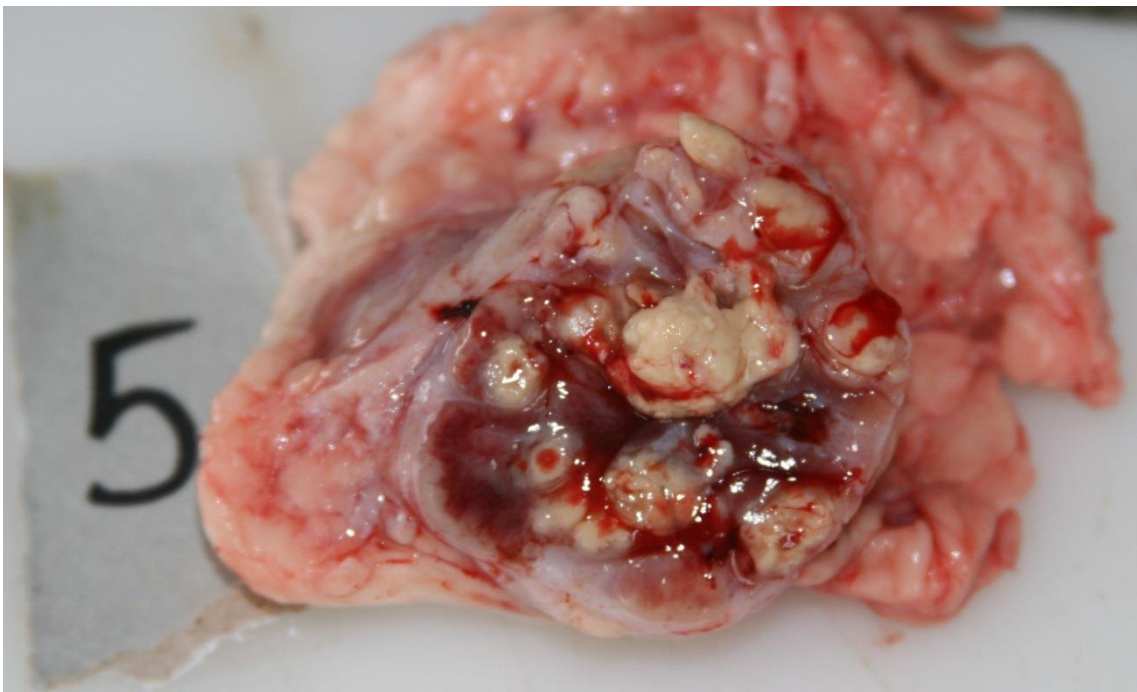
Slika 4. Medijastinalni limfni čvor- *Lymphadenitis caseosa tuberculosa et partim calcificata*



Slika 5. Pluća goveda- kazeozna masa okružena fibroznom kapsulom- *Tuberculosis caseo-cavernosa pulmonum*



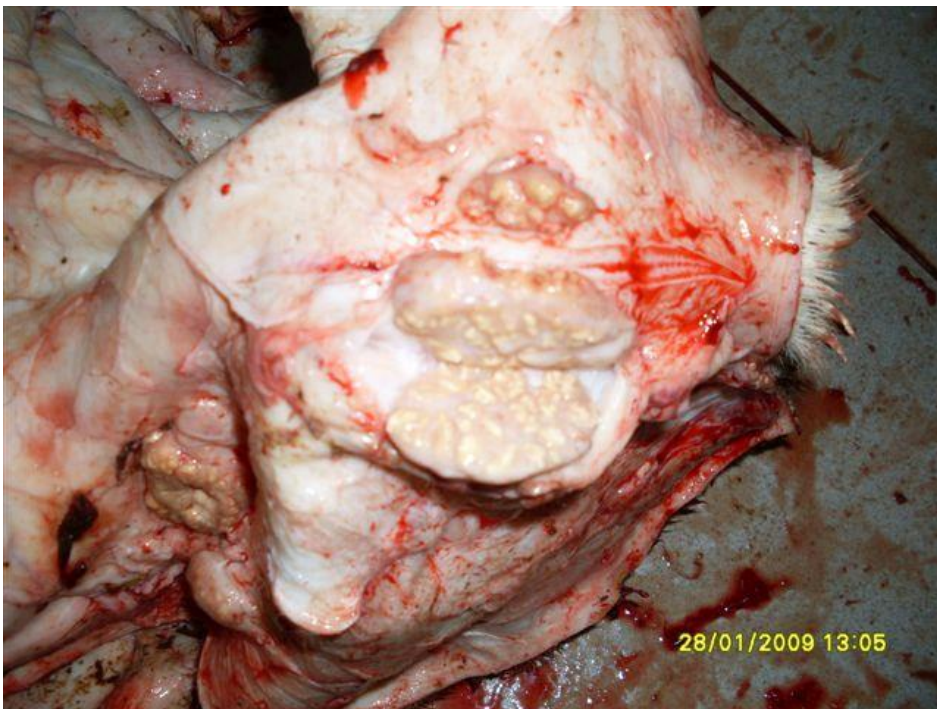
Slika 6. Pluća goveda- *Pneumonia caseosa tuberculosa*



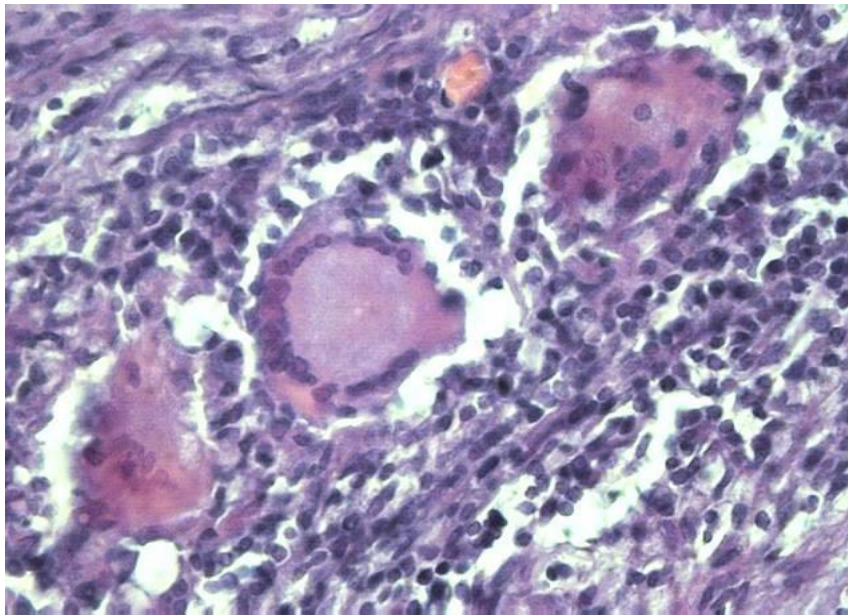
Slika 7. Retrofaringealni limfni čvor- *Lymphadenitis caseosa tuberculosa*



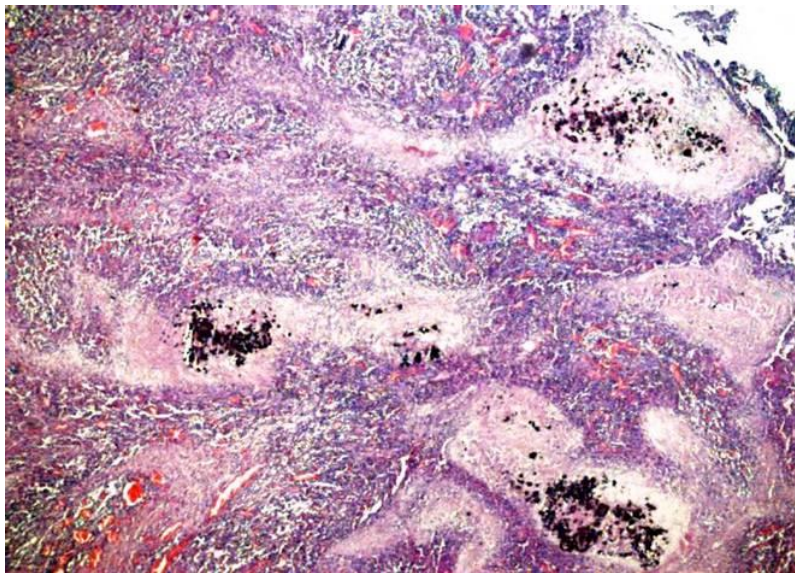
Slika 8. Isečak konsolidovanog tkiva pluća-*Tuberculosis miliaris pulmonum*



Slika 9. Supramamarni limfni čvor- *Lymphadenitis caseosa tuberculosa*



Slika 10. Histološki preparat- na uvećanju 400x uočavaju se karakteristične džinovske ćelije Langhansovog tipa



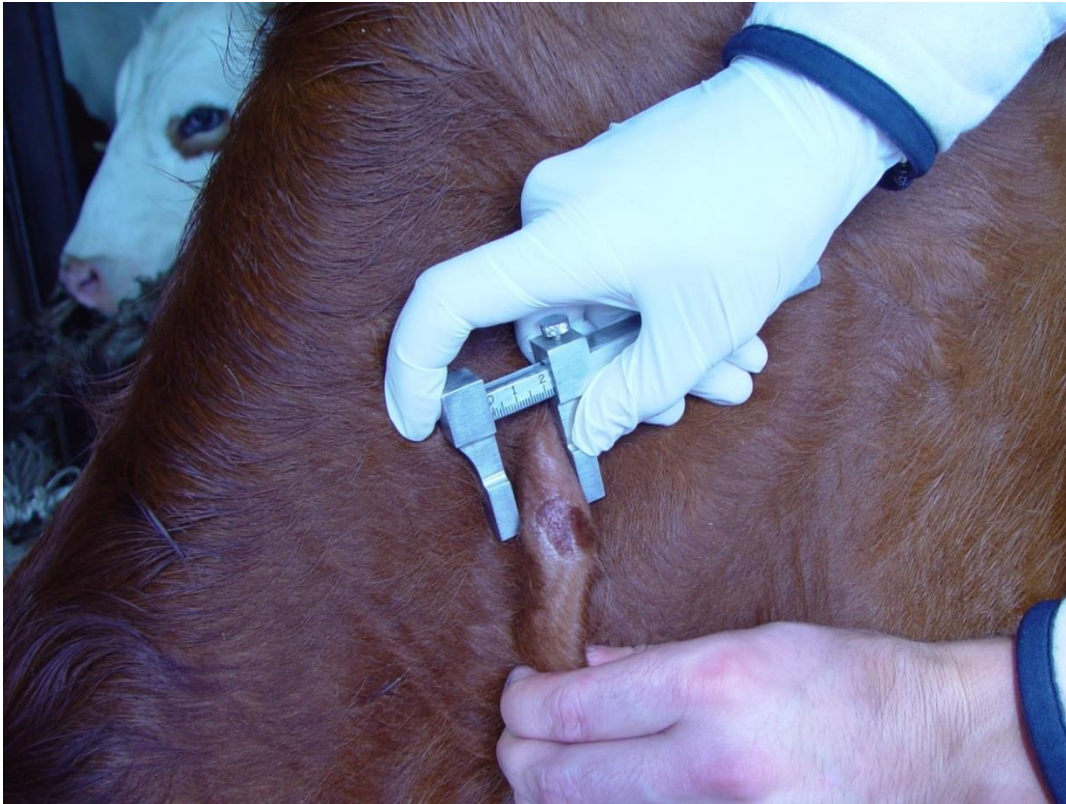
Slika 11. Histološki preparat plućnog tkiva na uvećanju 50x-kazeozna nekroza i mikrokalifikacije



Slika 12. Pozitivna tuberkulinska reakcija-difuzan otok i zadebljanje kožnog nabora veće od 40mm



Slika 13. Pozitivna tuberkulinska reakcija- difuzan otok i nekroza na mestu aplikacije tuberkulina B



Slika 14. Pozitivna reakcija- prisutan tipičan tuberkulinski otok-difuzan, temperiran, bolan sa nekrozom na mestu aplikacije tuberkulina B

BIOGRAFIJA

Ivan Pušić je rođen 28.12.1970. godine, u Zrenjaninu, gde je završio osnovnu školu i gimnaziju "Koča Kolarov". Fakultet veterinarske medicine u Beogradu upisao je 1989, gde je diplomirao 1997 godine sa prosečnom ocenom 8,75 (osam 75/100). Poslediplomske studije je upisao 1998/9 godine, smer Patologija i terapija životinja i 2005. Godine odbranio magistarsku tezu pod naslovom: „Epizootiološke karakteristike Morbus Aujeszky (MA) na području Vojvodine i pojava bolesti kod mesojeda" na fakultetu veterinarske medicine u Beogradu, pred komisijom u sastavu: prof. dr Bosiljka Đuričić, mentor, dr Sonja Radojičić i dr Sava Lazić. U novembru 2011. godine je prijavio temu za doktorsku disertaciju pod naslovom: „Izolacija, identifikacija i molekularna karakterizacija uzročnika tuberkuloze goveda u Vojvodini".

Od 2000. Godine do danas, zaposlen je u Naučnom institutu za veterinarstvo "Novi Sad", u okviru Zavoda za epizootiologiju, kliničku dijagnostiku, patologiju i DDD na poslovima epizootiologa.

U naučno-istraživačkom radu, projektima i objavljenim naučnim radovima Ivan Pušić je usmeren na proučavanje epizootiologije, dijagnostike, imunoprofilakse, suzbijanja i iskorenjivanja zaraznih i parazitskih bolesti domaćih životinja. U periodu od 2000-2015 godine učestvovao je u realizaciji ukupno dvanaest projekata. Istovremeno je objavljivao rezultate istraživanja u časopisima i zbornicima radova, na savetovanjima i skupovima u zemlji i inostranstvu. U periodu od 2000-2015 učestvovao je kao autor ili koautor u objavljivanju 147 radova. Pri tome u u 5 radova proučavana je tema epizootiologije, dijagnostike i suzbijanja tuberkuloze goveda. Aktivnost u naučnoistraživačkom radu se nastavlja tako da je aktivni učesnik u okviru dva projekta sa periodom realizacije 2011-2016.

BIBLIOGRAFIJA (IZVOD IZ PERIODA 2007-2015)

1. Medić S., Nitzan Kaluski D., Šeguljev Z., Obrenović J., Rudan P., Lazarević M., Jandrić-Kočoč J., Sajenković D., **Pušić I.**, Bugarski D., Vidanović D., Šekler M.: Q fever outbreak in the village of Noćaj, Srem county, Vojvodina province, Serbia, January to February 2012. *Eurosurveillance*, ISSN 1560-7917, 17, 15, rad 20143, 2012 (eng), M21 8,0
2. Prodanov J., Došen R., **Pušić I.**, Bugarski D., Valčić M.: Passive immunity evaluation in piglets originating from sows vaccinated with china strain of classical swine fever virus = Ispitivanje pasivnog imuniteta kod prasadi poreklom od krmača vakcinisanih kina sojem virusa klasične kuge svinja. *Acta Veterinaria*, ISSN 0567-8315, 57, 5/6, str.413-427, 2007 (eng), M23 3,0
3. Petrović J., **Pušić I.**, Urošević M.: Sylvatic trichinosis in the area of Vojvodina. *Abstracts, Game Meat Hygiene in Focus*, Vienna, 11-12 October, 2012, editors A.Bauer, P.Paulsen, F.J.M.Smulders, Vienna, Institute of Meat Hygiene, 2012, Str.61, ISBN 3-901950-10-9 (eng), M34 0,5, Jovičin M., Kovačević M., Milanov D., Milovanović A., Bugarski D., Pušić I., Barna T., Lazov Z., Dražić M.: KOLPOSKOP za savremenu dijagnostiku reproduktivnog stanja polnih organa i znakova polnog žara krava plotkinja : isprava o malom patentu : broj 1278U. Beograd, Zavod za intelektualnu svojinu, 2012 M92 8,0
4. Petrović J., **Pušić I.**, Apić J., Milanov D., Grgić Ž., Đorđević V., Matekalo-Sverak V.: Silvatična trihinelozna - uloga divljih životinja u ciklusu širenja trihineloze u Srbiji = Sylvatic trichinosis - role of wild animals in cycle of spread of trichinosis in Serbia. *Veterinarski glasnik*, ISSN 0350-2457, 66, 3-4, str.175-183, 2012 (srp), M24 3,0
5. Sekulić S., Božić A., Zarkov (Jovanović) M., Keković G., Podrogac J., Novakov Mikić A., Martac L., Barna T., Milovanović A., **Pušić I.**, Stojanović D., Pepelčević N.: Changes in the Anterior Presentation in Sheep Fetuses Due to Their Ventro-Sacral Position in the Second Half of Gestation. *Philippine Journal of Veterinary Medicine*, ISSN 0031-7705, 49, 1, pp.51-56, 2012 (eng), M23 3,0
6. Lupulović D., Maksimović-Zorić J., Vasković N., Bugarski D., Plavšić B., Ivanović N., Petrović T., **Pušić I.**, Marčić D., Grgić Ž., Lazić S.: First Report on the Efficiency of Oral Vaccination of Foxes against Rabies in Serbia. *Zoonoses and Public Health*, ISSN 1863-1959, 62, In press, 2015 (eng), M21 8,0
7. **Pušić I.**, Lupulović D., Prodanov-Radulović J., Urošević M., Grgić Ž.: Serological study on Brucella spp. and small ruminant lentivirus in dairy goats in Vojvodina = Serološko ispitivanje prisustva infekcije mlečnih koza lentivirusima i brucella vrstama u Vojvodini. *Proceedings, 10th International Symposium Modern Trends in Livestock Production*, Belgrade, 2 - 4 October, 2013, Institute for Animal Husbandry, editor in chief Zlatica Pavlovski, Beograd, Institute for Animal Husbandry, 2013, Str.1015-1021, ISBN 978-86-82431-69-5 (eng), M33 1,0
8. **Pušić I.**, Milićević V., Savić S., Prodanov J., Grgić Ž., Bugarski D., Stojanov I.: A preliminary trial to evaluate the gamma-interferon assay for the detection of tuberculosis in cattle under local conditions in Serbia. *LUCRARI știintifice*, ISSN 1221-5295, 42, br.1, str.125-130, 2009 (eng), M52 1,5

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Potpisani Ivan Pušić

broj upisa: Magistar veterinarskih nauka, Zakon o izmenama i dopunama Zakona o visokom obrazovanju iz 2008. godine

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom „Izolacija, identifikacija i molekularna karakterizacija uzročnika tuberkuloze goveda u Vojvodini“

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 07. 09. 2016.

Prof.

Prilog 2.

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora: Ivan Pušić

Broj upisa

Studijski program Magistar veterinarskih nauka, Zakon o izmenama i dopunama Zakona o visokom obrazovanju iz 2008. godine

Naslov rada: „Izolacija, identifikacija i molekularna karakterizacija uzročnika tuberkuloze goveda u Vojvodini“

Mentor: prof dr Sonja Radojičić

Potpisani Ivan Pušić

izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis doktoranda

U Beogradu,

07. 09. 2016.

Prof.

Prilog 3.

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

„Izolacija, identifikacija i molekularna karakterizacija uzročnika tuberkuloze goveda u Vojvodini“

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio.

1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poleđini lista).

Potpis doktoranda

U Beogradu, 07. 09. 2016.