

UNIVERZITET U BEOGRADU
FAKULTET VETERINARSKE MEDICINE

Danica R. Bogunović

MOLEKULARNA I SEROLOŠKA
ISTRAŽIVANJA PRISUSTVA BAKTERIJE
COXIELLA BURNETII U TKIVIMA PASA I
KRPELJIMA (ACARI: IXODIDAE)
SAKUPLJENIM SA ISPITIVANIH
ŽIVOTINJA

Doktorska disertacija

Beograd, 2018

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE

Danica R. Bogunović

MOLECULAR AND SEROLOGICAL
EXAMINATION OF THE PRESENCE OF
THE BACTERIUM *COXIELLA BURNETII*
IN THE TISSUES OF DOGS AND TICKS
(ACARI: IXODIDAE) RECOVERED FROM
THE EXAMINED ANIMALS

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2018

MENTORI:

Dr Zoran Kulišić, redovni profesor

Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu

Dr Sonja Radojičić, redovni profesor

Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu

ČLANOVI KOMISIJE:

Dr Dušan Mišić, vanredni profesor

Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu

Dr Tamara Ilić, vanredni profesor

Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu

Dr Snežana Tomanović, viši naučni saradnik

Institut za medicinska istraživanja Univerziteta u Beogradu

Datum odbrane: _____

Doktorska disertacija pod nazivom: Molekularna i serološka istraživanja prisustva bakterije Coxiella burnetii u tkivima pasa i krpeljima (Acari: Ixodidae) sakupljenim sa ispitivanih životinja“ realizovana je u okviru projekta „Razvoj i standardizacija molekularnih i imunskih metoda u dijagnostici bakterijskih zoonoza“ (ev. br. TR 31088), čiji je rukovodilac prof. dr Sonja Radojičić, a koji je finansiran od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

**MOLEKULARNA I SEROLOŠKA ISTRAŽIVANJA PRISUSTVA
BAKTERIJE *COXIELLA BURNETII* U TKIVIMA PASA I KRPELJIMA
(ACARI: IXODIDAE) SAKUPLJENIM SA ISPITIVANIH ŽIVOTINJA**

Rezime

U ovoj doktorskoj disertaciji ispitano je prisustvo uzročnika kju groznice - bakterije *Coxiella burnetii* (*C. burnetii*) kod nevlasničkih pasa poreklom sa teritorije grada Beograda, primenom molekularnih i seroloških metoda. Molekularni metod je korišćen za otkrivanje uzročnika u reproduktivnim tkivima nevlasničkih pasa, kao i u krpeljima prisutnim na ispitivanim životinjama, dok je imunoenzimskim testom utvrđeno prisustvo specifičnog serološkog odgovora kod ispitivanih životinja. Za otkrivanje prisustva DNK *C. burnetii* u uzrocima korišćena je lančana reakcija polimeraze (*Trans*-PCR) kojom se umnožava IS1111 fragment *C. burnetii*, dok je za otkrivanje specifičnih antitela protiv *C. burnetii* u serumima ispitivanih pasa korišćen modifikovani komercijalni imunoenzimski test (ELISA).

U istraživanju je sakupljeno 316 krpelja sa 51 nevlasničkog psa i identifikovane su tri vrste krpelja: *Rhipicephalus sanguineus*, *Ixodes ricinus* i *Dermacentor reticulatus*. Prisustvo DNK *C. burnetii* ustanovljeno je u 10,53% (24/228) krpelja vrste *R. sanguineus*, koji su uzorkovani sa sedam pasa. Reproductivna tkiva pasa sakupljena su od ukupno 105 pasa - 74 ženke (70,48%) i 31 muškaka (29,52%). DNK *C. burentii* je ustanovljena kod 20,95% (22/105) pasa i to u 16,13% (5/31) uzoraka semenika pasa, odnosno u 22,97% (17/74) uzoraka materica i jajnika. Kod 29,52% (31/105) pasa je

ustanovljeno prisustvo specifičnih antitela protiv *C. burnetii* i to 32,26% (10/31) mužjaka i 28,38% (21/74) ispitanih ženki. Ukupno 43,81% (46/105) jedinki bilo je pozitivno primenom barem jednog testa (*Trans*-PCR i ELISA).

Do sada, nije bilo podataka o prisustvu uzročnika kju groznice kod pasa na teritoriji Republike Srbije. Prisustvo antitela protiv *C. burnetii* u serumima pasa i DNK *C. burnetii* u reproduktivnim tkivima ne vlasničkih pasa i krpeljima poreklom sa ispitivanih jedinki, ukazuje na to da je uzročnik kju groznice prisutan u populaciji ne vlasničkih pasa sa teritorije Beograda. Takođe, psi mogu predstavljati rezervoare uzročnika kju gorznice na terenu i mogu se koristiti kao *sentinel* prilikom pojave oboljenja kod ljudi.

Ključne reči: *Coxiella burnetii*, psi, krpelji, PCR, ELISA

Naučna oblast: Veterinarska medicina

Uža naučna oblast: Parazitologija

UDK broj: 576.89:636.7:595.42

**MOLECULAR AND SEROLOGICAL EXAMINATION OF THE
PRESENCE OF THE BACTERIUM *COXIELLA BURNETII* IN THE
TISSUES OF DOGS AND TICKS (ACARI: IXODIDAE) RECOVERED
FROM THE EXAMINED ANIMALS**

Summary

In this doctoral dissertation, the presence of the causative agent of Q fever - the bacterium *Coxiella burnetii* (*C. burnetii*) in stray dogs has been examined using molecular and serological methods. Molecular method was used for the detection of the agent in the reproductive tissues of stray dogs, as well as in the ticks recovered from the examined animals, while immunoenzyme test was used for the detection of specific serological response in the examined animals. A polymerase chain reaction (*Trans*-PCR) targeting IS1111 element of *C. burnetii* was used for the detection of *C. burnetii* DNA in the samples, while a modified commercial immunoassay (ELISA) was used for the detection of specific antibodies against *C. burnetii* in the sera of the examined dogs.

In this study, 316 ticks were recovered from 51 stray dogs and three tick species were identified: *Rhipicephalus sanguineus*, *Ixodes ricinus* and *Dermacentor reticulatus*. The presence of *C. burnetii* DNA was established in 10.53% (228/24) *R. sanguineus* ticks, which originated from seven dogs. Reproductive tissues of dogs were collected from a total of 105 dogs - 74 females (70.48%) and 31 males (29.52%). The presence of *C. burentii* DNA has been detected in 20.95% (22/105) dogs. *C. burnetii* DNA was detected in

16.13% (5/31) samples of dog testicles and in 22.97% (17/74) samples of uteri and ovaries. The presence of specific antibodies against *C. burnetii* has been established in 29.52% (31/105) dogs' sera - 32.26% (10/31) males and 28.38% (21/74) females. A total of 43.81% (46/105) animals were positive using at least one test (*Trans*-PCR i ELISA).

Until now, there have been no data regarding the presence of Q fever agent in dogs in the territory of the Republic of Serbia. The presence of antibodies against *C. burnetii* in dogs' sera and *C. burnetii* DNA in the reproductive tissues of stray dogs and ticks recovered from the examined animals, indicates that Q fever agent is present in the population of stray dogs from the territory of Belgrade city. Also, dogs can represent reservoirs of the causative agent of Q fever in the field and they can be used as *sentinel* when the disease occurs in humans.

Key words: *Coxiella burnetii*, dogs, ticks, PCR, ELISA

Major Field of Study: Veterinary Medicine

Special Field of Study: Parasitology

UDC Number: 576.89:636.7:595.42

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. PREGLED LITERATURE	4
2.1. ISTORIJAT SAZNANJA O KJU GROZNICI.....	4
2.2. ETIOLOŠKI AGENS	5
2.2.1. Otpornost <i>C. burnetii</i> u spoljašnjoj sredini	6
2.2.2. Patogeneza i mehanizmi rezistencije.....	7
2.3. FILOGENETSKI I GENOMSKI ASPEKTI <i>C. BURNETII</i>	9
2.3.1. Endosimbionti krpelja slični <i>C. burnetii</i> (<i>Coxiella</i> -like endosymbionts - <i>CLE</i>).....	11
2.4. REZERVOARI.....	12
2.4.1. Domaći preživari	12
2.4.2. Psi i mačke	13
2.4.3. Divlje životinje	13
2.4.4. Krpelji.....	14
2.4.5. Slobodnoživeće amebe.....	15
2.5. PUTEVI INFEKCIJE	15
2.5.1. Inhalacija.....	15
2.5.2. Direktni kontakt	16
2.5.3. Ingestija	16
2.5.4. Transkutano/perkutano prenošenje	16
2.5.5. Transfuzija krvi	17
2.5.6. Prenosenje seksualnim putem	17
2.6. FAKTORI RIZIKA ZA NASTANAK INFEKCIJE	17
2.7. KLINIČKA SLIKA	19
2.7.1. Klinička slika kod ljudi.....	19
2.7.2. Klinička slika kod životinja	21
2.8. GEOGRAFSKA RASPROSTRANJENOST KJU GROZNICE	21
2.9. DIJAGNOSTIKA	23
2.9.1. Izolacija <i>C. burnetii</i>	23

2.9.1.2.	<i>Aksenični medijum</i>	23
2.9.2.	Imunohistohemija	24
2.9.3.	Molekularne metode	24
2.9.3.1.	<i>Umnožavanje ponavljajuće IS1111 sekvence u cilju otkrivanja prisustva DNK C. burnetii u krpeljima</i>	25
2.9.4.	Molekularna tipizacija C. burnetii	25
2.9.5.	Serologija	26
2.9.5.1.	<i>Reakcija vezivanja komplementa (RVK)</i>	27
2.9.5.2.	<i>Imunofluorescencija (IF)</i>	27
2.9.5.3.	<i>ELISA</i>	28
2.10.	TERAPIJA	28
2.11.	PREVENCIJA	28
3.	CILJ I ZADACI ISTRAŽIVANJA	30
4.	MATERIJAL I METODE RADA	32
4.1.	ISPITIVANI MATERIJAL	32
4.2.	KRV (KRVNI SERUMI) POREKLOM OD PASA	33
4.2.1.	Uzorkovanje krvi i priprema seruma za serološka ispitivanja	33
4.3.	REPRODUKTIVNA TKIVA PASA – MATERICE, JAJNICI I SEMENICI	33
4.3.1.	Uzorkovanje reproduktivnih tkiva poreklom od nevlasničkih pasa	33
4.3.2.	Homogenizacija reproduktivnih tkiva i priprema za ekstrakciju nukleinske kiseline	34
4.3.3.	Ekstrakcija nukleinske kiseline pomoću komercijalnog kita za ekstrakciju	34
4.4.	KRPELJI	36
4.4.1.	Uzorkovanje krpelja sa nevlasničkih pasa	36
4.4.2.	Morfološka identifikacija i determinacija krpelja	36
4.4.3.	Obrada krpelja - ispiranje i homogenizacija	37
4.4.4.	Zbirni uzorci krpelja	37
4.4.5.	Ekstrakcija nukleinske kiseline iz zbirnih uzoraka i pojedinačnih krpelja pomoću komercijalnog kita za ekstrakciju	37
4.5.	POZITIVNA I NEGATIVNA KONTROLA	40
4.5.1.	Pozitivna i negativna kontrola u molekularnim ispitivanjima	40
4.5.2.	Pozitivna i negativna kontrola u serološkim ispitivanjima	40
4.6.	MOLEKULARNA ISPITIVANJA	40
4.6.1.	Metoda Trans-PCR („touchdown“ PCR)	40

4.6.2.	Priprema smeše za reakciju	41
4.6.3.	Lančana reakcija polimeraze - PCR.....	42
4.6.4.	Elektroforeza i vizuelizacija PCR proizvoda.....	43
4.6.5.	Prečišćavanje dobijenog proizvoda.....	44
4.6.6.	Sekvenciranje i tumačenje rezultata sekvenciranja	44
4.7.	SEROLOŠKA ISPITIVANJA.....	45
4.7.1.	Komercijalni indirektni ELISA kit (<i>PrioCHECKTM Ruminant Q fever Ab Plate Kit, LSIVetTM, Francuska</i>).....	45
4.7.2.	Modifikacija komercijalnog indirektnog ELISA testa i šah titracija .	46
4.8.	LOKACIJE I INSTITUCIJE GDE SU ISTRAŽIVANJA SPROVEDENA	48
4.9.	STATISTIČKA OBRADA REZULTATA	49
5.	REZULTATI	50
5.1.	REZULTATI MORFOLOŠKE IDENTIFIKACIJE I DETERMINACIJE KRPELJA POREKLOM SA ISPITIVANIH PASA	50
5.2.	REZULTATI DISTRIBUCIJE KRPELJA POREKLOM SA ISPITIVANIH PASA	55
5.3.	REZULTATI MOLEKULARNIH ISPITIVANJA PRISUSTVA DNK <i>C. BURNETII</i> U KRPELJIMA POREKLOM SA ISPITIVANIH PASA	59
5.4.	REZULTATI MOLEKULARNIH ISPITIVANJA PRISUSTVA DNK <i>C. BURNETII</i> U REPRODUKTIVNIM TKIVIMA ISPITIVANIH PASA	67
5.5.	REZULTATI ISPITIVANJA SERUMA PASA NA PRISUSTVO ANTITELA PROTIV <i>C. BURNETII</i> PRIMENOM MODIFIKOVANOG KOMERCIJALNOG ELISA TESTA <i>PRIOCHECKTM RUMINANT Q FEVER AB PLATE KIT, LSIVETTM, FRANCUSKA</i>	72
5.6.	UPOREDNI PRIKAZ REZULTATA DOBIJENIH MOLEKULARNIM I SEROLOŠKIM ISPITIVANJIMA	77
6.	DISKUSIJA.....	81
7.	ZAKLJUČCI.....	100
8.	LITERATURA.....	103

1. UVOD

Kju groznica je zoonozno oboljenje rasprostranjeno u celom svetu, sa izuzetkom Antarktika i Novog Zelanda, čiji je uzročnik gram-negativna bakterija *Coxiella burnetii* (*C. burnetii*). Oboljenje je prvi put opisano kao febrilno stanje nepoznate etiologije među klaničnim radnicima u Australiji, a zbog nedostatka podataka o uzročniku, nazvano je "Kju (Q)" groznica (od eng. "*query*" = upitnik). Pojava najveće epidemije kju groznice koja je ikada zabeležena u svetu, a dogodila se u Holandiji u periodu 2007-2010. godine sa preko 4000 dijagnostikovanih slučajeva, dovela je do značajnog porasta interesovanja za istraživanje epidemiologije oboljenja u različitim zemljama. Kju groznica i danas ostaje oboljenje sa mnoštvom polemika i nejasnoća vezanih za patogenezu, epizootologiju i epidemiologiju, što i dalje opravdava naziv koji nosi.

Tradicionalno, kju groznica se vezuje za ruralne sredine i kontakt sa inficiranim materijalom poreklom od preživara, a kao najčešći put infekcije navodi se inhalacija uzročnika. Međutim, u poslednjim decenijama opisane su epidemije koje su izazvane kontaktom ljudi sa inficiranim psima, zbog čega je značajno porastao broj istraživanja vezanih za ulogu ljubimaca u epidemiologiji kju groznice u različitim zemljama. Ovo se naročito odnosi na urbane sredine, gde ne postoji kontakt sa domaćim preživarima, koji je jedan od najčešće opisanih izvora infekcije ljudi.

Klinička slika i patogenezna, odnosno prisustvo uzročnika i/ili specifičnih antitela u serumu najbolje su izučeni kod ljudi. Nažalost, za životinje nisu definisani parametri vezani za dijagnostiku oboljenja i zaključci se uglavnom izводе iz opisanih slučajeva oboljenja ljudi. S obzirom na to da je *C. burnetii* visoko virulentna i izuzetno otporna u spoljašnjoj sredini i da je inhalacija najčešći put infekcije, izolacija uzročnika u laboratoriji nije rutinski metod, zbog visokog rizika od nastanka infekcije laboratorijskog osoblja prilikom rada sa uzročnikom. Zbog toga se za dijagnostiku kod životinja i dalje najčešće koriste serološki testovi, ali sve češće u upotrebi su i molekularne metode.

Uzimajući u obzir to da je kju groznica enzoosko oboljenje u Vojvodini i da se sporadično javlja u centralnoj Srbiji, svrha ovog istraživanja je bila da se ispita prisustvo *C. burnetii* u populaciji slobodnih, ne vlasničkih pasa i krpelja koji na njima parazitiraju, radi definisanja njihove uloge kao rezervoara, odnosno *sentinel* za *C. burnetii* na teritoriji grada Beograda. Do sada, u dostupnoj literaturi, nisu postojali podaci vezani za istraživanja kju groznice kod ove vrste životinja na teritoriji Republike Srbije. Kao uzorci za serološka istraživanja korišćeni su serumi pasa, a za molekularna istraživanja su korišćena reproduktivna tkiva pasa uzorkovana nakon sterilizacije i kastracije, kao i krpelji koji su bili prisutni na psima. Radi sticanja uvida u prisustvo *C. burnetii* u tkivima pasa i krpeljima korišćena je molekularna metoda *Trans-PCR*. Kao indirektna potvrda kontakta sa uzročnikom korišćen je imunoenzimski test kojim se dokazuju specifična antitela kod pasa. Na tržištu trenutno postoje samo komercijalni serološki testovi koji su prilagođeni za upotrebu na uzorcima poreklom od domaćih preživara, tako da je u ovom istraživanju izvršena modifikacija testa, zamenom konjugata iz kita antiglobulinima specifičnim za imunoglobuline G klase pasa. Za molekularna istraživanja odabran je metod kojim se umnožava ponavljajuća sekvenca IS1111 *C. burnetii*, a koji

se pokazao kao pouzdan metod u primeni na različitim uzorcima sa malim brojem bakterija (vaginalni brisevi, mleko, feces). Fragment IS1111 se javlja u više kopija u genomu *C. burnetii*, zbog čega ovaj metod ima višu osetljivost u odnosu na metode koje otkrivaju gene koji se javljaju u jednoj kopiji u genomu. Višestruki markeri, poput ovog, brže se otkrivaju zbog veće početne koncentracije u genomu, što je značajno kada je uzročnik prisutan u veoma malom broju u ispitivanom uzorku.

Populacija nevlasničkih pasa odabrana je za istraživanje jer je potpuno nezaštićena ektoantiparaziticima, ne prima nikakvu hemoprofilaksu, a kreće se slobodno, čime se povećava verovatnoća da će doći u kontakt sa uzročnikom, odnosno sa krpeljima nosiocima *C. burnetii*.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. ISTORIJAT SAZNANJA O KJU GROZNICI

Kju groznicu je prvi put opisao Edvard Holbruk Derik 1935. godine (*Derrick, 1937*) nakon učestalih pojava febrilnog oboljenja nepoznate etiologije među klaničnim radnicima u Brizbejnu (Kvinslend, Australija). Iako je uspevao da inficira zamorce inokulisanjem krvi i urina poreklom od inficiranih pacijenata, Derik nije uspevao da izoluje uzročnika. Zbog nedostatka podataka o uzročniku, oboljenje je nazvao "Kju (Q)" groznica (od eng. "query" = upitnik). Frank Mekfarlan Burnet i Mejvis Frimen 1937. godine izolovali su uzročnika iz krvi zamorca inficiranog urinom jednog od Derekovih pacijenata. Ustanovili su da etiološki agens prolazi kroz filtere za bakterije, a u razmazima slezine veštački inficiranog miša uočili su intracelularna telašca koja liče na rikecije. Novi mikroorganizam nazvali su *Rickettsia burnetii* (*Burnet i Freeman, 1937*).

Nezavisno od istraživačke grupe u Australiji, Herald Koks je 1938. godine prvi put izolovao nepoznatog agensa iz krpelja vrste *Dermacentor andersoni* (*D. andersoni*) u laboratoriji „Rocky Mountain“ u Montani (Sjedinjene Američke Države - SAD). Zabeleženo je da etiološki agens prolazi kroz filtere za bakterije i da poseduje sposobnost inficiranja laboratorijskih životinja. Krpelji iz kojih je izolovan agens sakupljeni su u blizini mesta *Nine Mile Creek*, pa je febrilno oboljenje životinja nazvao *Nine Mile* groznica, a zbog sličnosti s rikecijama, uzročnik je nazvan *Rickettsia*

diaporica. Uspešna je bila infekcija laboratorijskih životinja preko krpelja *D. andersoni*, a uzočnik je ustanovljen i u jajima i razvojnim stadijumima krpelja. Nakon slučajne infekcije jednog radnika u laboratoriji ustanovljeno je da je uzročnik infektivan i za ljude (Davis i sar., 1938).

Nekoliko godina kasnije, zaključeno je da su grupe istraživača iz Australije i SAD, potpuno nezavisno jedna od druge, otkrile istog uzročnika. Pošto je uzročnik posedovao određena svojstva rikecija (bojenje i kulturelne karakteristike), ali i sposobnost prolaska kroz filtere za bakterije i pokazivao izuzetnu otpornost na fizičke i hemijske agense (za razliku od rikecija), preporučeno je da se svrsta u novi rod i nazove *Coxiella burnetii*, u čast obe istraživačke grupe (Philip, 1948a).

Tokom četrdesetih godina XX veka usledila je pojava nezavisnih epidemija kju groznice u SAD (Hornibrook i sar., 1940; Beck i sar., 1949) ali i u Evropi, gde je uzročnik prvi put izolovan iz pacijenta u Grčkoj. Kju groznica je zapravo bila endemsko oboljenje na Balkanskom poluostrvu tokom trajanja Drugog svetskog rata, a Nemci su oboljenje zvali „Balkanski grip“. Uzročnik je bio prisutan i u mleku preživara i smatralo se da je jedan od puteva infekcije konzumiranje sirovog mleka poreklom od inficiranih životinja (Caminopetros, 1948). Za vreme Drugog svetskog rata epidemija je opisana i među vojnim trupama SAD u Italiji (Robbins i Rustigian, 1946).

Danas je kju groznica oboljenje koje je rasprostranjeno u celom svetu, sa izuzetkom Antarktika i Novog Zelanda.

2.2. ETIOLOŠKI AGENS

Uzročnik kju groznice je *Coxiella burnetii* (*C. burnetii*), mali, gram-negativni kokobacil širine 0,2-0,4 μm i dužine 0,4-1,0 μm . Posедуje ćelijsku membranu koja je slična gram-negativnim bakterijama, ali se za bojenje koriste specifične metode za bojenje rikecija po Gimenez-u (Maurin i Raoult,

1999). Tradicionalno, *C. burnetii* je definisana kao obligatno intracelularni patogen koji može da se uzgaja samo u kulturi ćelija ili embrioniranim kokošjim jajima (*van Schaik, 2013*). Međutim, novija otkrića pokazuju da *C. burnetii* može da se uzgaja i u akseničnom medijumu (u odsustvu ćelija domaćina) (*Omsland i sar., 2011; Sandoz i sar., 2014*). U organizmu inficiranih životinja i ljudi *C. burnetii* dovodi do infekcije ćelija monocitno-makrofagnog sistema i adaptirana je da preživi u kiseloj sredini fagolizozoma (pH 4,5). Kod životinja, inficirani fagociti su najčešće locirani u plućima, mlečnoj žlezdi, semenicama, limfnim čvorovima, materici i posteljici, a mogu se naći i u jetri i kardiovaskularnom sistemu (*Mege i sar., 1997; Arricau-Bouvery i Rodolakis, 2005*). Uzročnik je visoko virulentan, a za infekciju aerogenim putem dovoljno je svega 1-10 živih bakterija (*Sawyer i sar., 1987*).

2.2.1. Otpornost *C. burnetii* u spoljašnjoj sredini

U prirodi se *C. burnetii* javlja u dve morfološke forme. Prva je tzv. velika ćelijska forma (*LCV - large cell variant*), koja je metabolički aktivna, replikujuća, intracelularna forma, pleomorfna, granularne strukture i dužine do 2 µm. Drugi oblik je mala ćelijska forma (*SCV - small cell variant*), koja je metabolički neaktivna i odgovorna je za nastanak infekcije. Ova forma se nalazi ekstracelularno, poseduje debeo ćelijski zid i gustu strukturu, štapičastog je oblika i dužine 0,45 µm. Mala ćelijska forma ulazi u eukariotske ćelije, a kisela sredina u fagolizozomu aktivira njen metabolizam i prelazak u intracelularnu veliku formu. U velikoj ćelijskoj formi se odvija proces sličan sporulaciji i tom prilikom se formiraju endogene pseudospore, koje se potom preobraze u malu ćelijsku formu koja napušta ćeliju domaćina (*Maurin i Raoult, 1999*). Uzročnik preživljava u spoljašnjoj sredini upravo kao mala ćelijska forma. Termin „spore“ usvojen je zbog izuzetne otpornosti *C. burnetii* u spoljašnjoj sredini i zbog sličnosti sa endosporama drugih bakterija. Međutim, ove spore se ne boje klasičnim

metodama bojenja pravih spora, zbog čega je termin komparativne prirode. Zahvaljujući formiranju pseudospora *C. burnetii* poseduje izuzetnu otpornost na nepovoljne spoljašnje uticaje, kao što su isušivanje, nizak i visok pH, hemijski agensi (amonijum hlorid, hipohlorna kiselina) i UV zračenje (Scott i Williams, 1990; McCaul, 1991), što joj omogućava da dugo preživi u spoljašnjoj sredini, van domaćina. Upravo je ekstremna otpornost *C. burnetii* bila razlog da se pedesetih godina XX veka usvoje više temperature pasterizacije mleka (Enright i sar., 1957). Zbog izuzetne otpornosti i stabilnosti u spoljašnjoj sredini, visoke virulencije i mogućnosti nastanka infekcije inhalacionim putem, Centar za kontrolu i prevenciju oboljenja u SAD (CDC - Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, SAD) je klasifikovao *C. burnetii* kao biološko oružje kategorije B.

2.2.2. Patogeneza i mehanizmi rezistencije

Patogenost i virulencija *C. burnetii* zavise od vrste inficirane životinje, načina infekcije, soja, kao i količine unetih bakterija (Glazunova i sar., 2005). Nakon infekcije *C. burnetii* pasivno ulazi u ćelije eukariota kao mala ćelijska forma, biva obložena membranom fagozoma koji se spaja s lizozomom i formira fagolizozom. U fagolizozomu *C. burnetii* odlazi u acidifikovani odeljak koji liči na degradirani fagolizozom (Howe i sar., 2010). Mala ćelijska forma se transformiše u metabolički aktivnu veliku ćelijsku formu u kiseloj vakuoli koja potiče od lizozoma. Bakterija aktivno učestvuje u stvaranju intracelularne vakuole. Vakuole u kojima se replikuju bakterije progresivno dobijaju karakteristike nalik fagolizozomu (kiseo pH, kiseli hidrolizati i katjonski peptidi) (Voth i Heinzen, 2007). Osnova patogeneze *C. burnetii* leži u sposobnosti preživljavanja u kiseloj sredini fagolizozoma (pH 4,7-5,2). Acidofilne osobine podstiču metabolizam i preuzimanje hranljivih materija neophodnih za metaboličke procese. Umnožavanje može da se prekine podizanjem pH u fagolizozomima i na ovoj osetljivosti bakterije se zasniva terapija hlorokvinom (Maurin i Raoult, 1999). Međutim,

mehanizam koji podstiče rast bakterije u eukariotskim ćelijama je još uvek nepoznat.

Postoje dve antigene forme *C. burnetii*, tzv. faza I i faza II, analogno glatkim i hrapavim formama drugih gram-negativnih bakterija. Faza I je prirodna, infektivna forma *C. burnetii*, koja je izolovana iz ljudi, životinja i artropoda. Faza II je avirulentna forma, koja se dobija nakon nekoliko pasaža *in vitro* u ćelijskim kulturama ili embrioniranim jajima. Faza I poseduje kompletni lipopolisaharid (LPS) ćelijskog zida, slično glatkim formama gram-negativnih bakterija. Kod faze II, usled mutacije gena ili genetičkog preuređivanja, sintetiše se LPS kome nedostaju razgranati šećeri i neke proteinske antigene determinante i ovakva građa LPS odgovara hrapavoj formi gram-negativnih bakterija. Potpuni LPS faze I poseduje segmente LPS-a faze II. Do sada nije izvršena izolacija faze II iz domaćina i ona se dobija samo u laboratorijskim uslovima. Prirodna, virulentna faza I može da preživi u monocitima i makrofagima, dok avirulentna faza II ubrzo biva razložena od strane komponenti komplemента. Prelazak iz faze I u fazu II u laboratorijskim uslovima je praćen ireverzibilnim promenama LPS-a, koje nastaju usled trajnih delecija u genomu (*Thompson i sar., 2003*).

Virulencija sojeva *C. burnetii* zavisi i od ekspresije LPS-a ćelijskog omotača. U ćelijama domaćina javlja se faza I *C. burnetii*, kod koje se sintetiše kompletni LPS, a posledično i površinski antigeni. LPS faze I otežava vezivanje i aktivaciju komponenti sistema komplemента, a na taj način odlaže ili sprečava lizu bakterijskog zida. Kompletni LPS je jedini faktor virulencije *C. burnetii* koji je, za sada, ustanovljen u imunokompetentnom životinjskom modelu, a ima ulogu da štiti patogena od urođenog imunološkog odgovora domaćina (*Shannon i sar., 2005*). LPS pokriva spoljašnje proteine omotača *C. burnetii* i na taj način sprečava brz imunološki odgovor domaćina i razlaganje od strane sistema komplemента. Zbog nepotpune građe LPS-a faze II mnogi površinski proteini postaju

otkriveni i dostupni za reakciju imunološkog sistema domaćina i uzročnik ubrzo biva inaktivisan sistemom komplementa (*Maurin i Raoult, 1999; Arricau-Bouvery i Rodolakis, 2005; Shannon i sar., 2005*). Antitela protiv faze II su prisutna u bilo kom stadijumu infekcije. Usled nekompletnog sastava LPS-a faze II, za prevenciju oboljenja efikasne su samo vakcine sačinjene od faze I *C. burnetii*.

Imunološki odgovor kod ljudi indukuje stvaranje antitela protiv faze I i faze II. Antitela protiv faze I su u vezi sa hroničnom infekcijom, a antitela protiv faze II sa akutnom infekcijom. Merljiv titar antitela protiv faze II nastaje 7-15 dana nakon pojave kliničkih simptoma i smanjuje se tokom 3-6 meseci. Smatra se da su titri faze II IgG ≥ 200 i/ili IgM ≥ 50 u vezi sa akutnom infekcijom. Pri tome, titri IgG protiv faze II viši od titra IgG protiv faze I ukazuju na akutnu infekciju. Titri faze I IgG $\geq 1/800$ su povezani sa hroničnim tokom kju groznice (*Fournier i sar., 1998*). Za dijagnostiku je najbolje vršiti ispitivanje parnih seruma uzorkovanih u razmaku 3-6 nedelja, pri čemu se četverostruko povećanje titra parnog seruma smatra potvrdom infekcije.

Kod životinja još uvek nisu dovoljno ispitani odnosi titra antitela faze I i faze II prilikom akutne i hronične infekcije, zbog čega je otežana interpretacija rezultata seroloških ispitivanja u različitim zemljama, kao i definisanje akutne, odnosno, hronične forme oboljenja.

2.3. FILOGENETSKI I GENOMSKI ASPEKTI C. BURNETII

Uzročnik kju groznice je prvobitno svrstavan u grupu Alfaproteobakterija (Rickettsiales: Rickettsiaceae) i godinama je izučavan u okviru rikecija. Na osnovu genetičkih analiza izvršena je reklasifikacija vrste i sada je *C. burnetii* svrstana u grupu Gamaproteobakterija zajedno sa *Legionella spp.*, *Francisella tularensis* i *Rickettsiella spp.* (*Weisburg i sar., 1989; Seshadri i sar., 2003*). Današnja klasifikacija *C. burnetii* obuhvata:

Carstvo:	Bacteria
Kolo:	Proteobacteria
Klasa:	Gammaproteobacteria
Red:	Legionellales
Famijija:	Coxiellaceae
Rod:	<i>Coxiella</i>
Vrsta:	<i>Coxiella burnetii</i>

Do 2000. godine *C. burnetii* je bila jedini opisani pripadnik roda, kada je otkrivena *Coxiella cheraxi* u prirodno inficiranim slatkovodnim rakovima (*Cheryx quadricarinatus*) poreklom iz farmskog uzgoja. Analizom 16S rRNK sekvence ustanovljena je sličnost 95,5% sa *C. burnetii* (Tan i Owens, 2000).

Prvo sekvenciranje genoma *C. burnetii* je izvršeno 2003. godine (Seshadri i sar., 2003) i to faze I *Nine Mile RSA493* referentnog soja, izolovanog 1935. godine iz krpelja *D. andersoni* (Davis i sar., 1938). Genom referentnog soja *Nine Mile* poseduje 83 pseudogena, što ukazuje na to da je redukcija genoma u progresiji, a prisustvo 29 sekvenci insercionih elemenata potvrđuje visoku genomsku plastičnost. Nakon 2003. godine izvršeno je sekvenciranje celih genoma još nekih sojeva, koji potiču iz značajnih epidemija koje su se u svetu dogodile poslednjih decenija (Beare i sar., 2009; D'Amato i sar., 2014a, 2015). Zaključeno je da je *C. burnetii* stekla neke gene virulencije i metabolizma preko horizontalnog transfera gena (Moses i sar., 2017). Proliferacija mobilnih genetičkih elemenata i ekstenzivno preuređivanje su odlike bakterija koje su, evolutivno gledano, nedavno prešle na način života vezan za domaćina, što ukazuje na to da je obligatni intracelularni rast *C. burnetii* skorijeg porekla (McCutcheon i Moran, 2012). Pretpostavlja se da je *C. burnetii* skoro evoluirala u patogena kičmenjaka iz endosimbionta krpelja, usled spontanih mutacija ili

horizontalnog transfera gena poreklom iz patogena koji koinficiraju istog krpelja ili domaćina kičmenjaka. Niska genetička raznovrsnost sojeva, takođe, ide u prilog teoriji da je *C. burnetii* relativno skoro postala patogen kičmenjaka (Duron i sar., 2015a).

Sojevi *C. burnetii* uglavnom imaju visoku genomsku sličnost, sa zatvorenim pangénomom. Međutim, neki sojevi poseduju izvesne karakteristike za koje se pretpostavlja da su u vezi sa virulencijom i sposobnošću da dovedu do nastanka velikih epidemija. Na primer, soj iz Francuske Gvajane poseduje deleciju od 6105 bp (parova baza) u odnosu na referentni *Nine Mile* soj. Pretpostavlja se da je ova redukcija genoma mehanizam koji je odgovoran za pojačanu virulenciju, s obzirom na to da je ovo najvirulentniji do sada opisani soj u svetu, a prisutan je samo u Francuskoj Gvajani (D'Amato i sar., 2015). Takođe, soj Z3055, sličan soju *NL-Limburg* koji je uzrok najveće epidemije koja se dogodila u Holandiji, poseduje mnoštvo mutacija za koje se pretpostavlja da dovode do promena u površinskim antigenima i odsustva imunološkog odgovora, što je tada omogućilo eksplozivno širenje epidemije u populaciji koja nije bila u kontaktu s ovim sojem bakterije (D'Amato i sar., 2014b; Hammerl i sar., 2015).

2.3.1. Endosimbionti krpelja slični *C. burnetii* (*Coxiella*-like endosymbionts - CLE)

Iako evoluciono poreklo *C. burnetii* ni do danas nije u potpunosti razjašnjeno, veliki doprinos opisu filogenije dali su rezultati istraživanja endosimbionata krpelja koji su slični *C. burnetii* (*Coxiella*-like endosymbionts - CLE). CLE krpelja su najbliži srodnici *C. burnetii* i široko su rasprostranjeni u krpeljima, što ukazuje na to da je *C. burnetii* skoro evoluirala iz pretka koji je bio u vezi sa krpeljima (Duron i sar., 2015a; Gottlieb i sar., 2015; Smith i sar., 2015). Genomi CLE su mali (0,7 i 1,7 Mbp) (Gottlieb i sar., 2015), dok

su svi poznati genomi *C. burnetii* znatno veći (2,0 – 2,1 Mbp). *CLE* krpelja nemaju sposobnost inficiranja ćelija sisara, niti mogu da se umnožavaju u *ACCM-2* medijumu prilagođenom za rast *C. burnetii* (Omsland i sar., 2011; Duron i sar., 2015a). U prilog tome ide i podatak da je analizom jedinog do sada sekvenciranog genoma *CLE* krpelja vrste *Amblyomma americanum* ustanovljeno da je genom značajno redukovan i da ne poseduje gene virulencije (Smith i sar., 2015). Međutim, iz krpelja i bioptata gangrenoznih promena sa kože glave pacijenata sa SENLAT sindromom (gangrena kože glave i limfadenopatija nastala nakon uboda krpelja) izolovana je nova *Coxiella*-like vrsta „*Candidatus Coxiella massiliensis*“. Dalja istraživanja su neophodna da bi se definisalo da li je nova bakterija uzročnik opisanog sindroma, jer bi u tom slučaju ona bila predstavnik evolucije iz endosimbionta krpelja u patogena ljudi (Angelakis i sar., 2016).

2.4. REZERVOARI

2.4.1. Domaći preživari

Domaći preživari se najčešće navode kao rezervoari *C. burnetii* u ruralnim sredinama, a mogu izlučivati uzročnika bez ispoljavanja kliničkih simptoma. Kod negravidnih životinja oboljenje najčešće protiče asimptomatski. Perzistentno inficirani preživari mogu da izlučuju bakterije u mleku, urinu, fecesu, a u izuzetno velikom broju uzročnici se mogu naći u plodovim vodama i pobačenim plodovima. U placenti inficiranih životinja broj *C. burnetii* može da iznosi čak 10^9 /g tkiva (Babudieri, 1959). Izlučivanje uzročnika može trajati i nekoliko meseci (Maurin i Raoult, 1999; Arricau-Bouvery i sar., 2003; Rodolakis i sar., 2007; Rodolakis, 2009; Rousset i sar., 2009). Krave su najčešće asimptomatski rezervoari i najviše uzročnika izlučuju u mleku, a samo 5% u vaginalnom iscetku. Ovce su najčešće inficirana vrsta, a uzročnika izlučuju fecesom, vaginalnim iscetkom i

mlekom, dok koze u većoj količini izlučuju uzročnika mlekom, a znatno manje vaginalnim iscetkom i fecesom (Rodolakis i sar., 2007).

2.4.2. Psi i mačke

Psi i mačke mogu biti rezervoari *C. burnetii*, što je za epidemiologiju kju groznice od posebnog značaja u urbanim sredinama, zbog bliskog kontakta ovih vrsta s ljudima. Opisani su slučajevi inficiranja ljudi koji su bili u kontaktu sa inficiranim psima (Rauch i sar., 1987; Laughlin i sar., 1991; Buhariwalla i sar., 1996; Komiya i sar., 2003) i mačkama (Langley i sar., 1988; Marrie i sar., 1988a, 1988b; Pinsky i sar., 1991; Nagaoka i sar., 1998). Prvi sekvencirani soj izolovan iz psa poreklom je iz Kanade (Dog UTAD soj). Analizom sojeva *C. burnetii*, uzročnika oboljenja kod ljudi u Kanadi, ustanovljeno je da pripadaju istom genotipu, koji je dosad izolovan samo u Kanadi. Ovaj podatak ide u prilog činjenici da psi imaju značaj kao rezervoari u epidemiologiji kju groznice (D'Amato i sar., 2014a). U SAD je ustanovljeno prisustvo *C. burnetii* u reproduktivnim tkivima klinički zdravih vlasničkih mačaka (Cairns i sar., 2007).

2.4.3. Divlje životinje

Smatra se da divlje životinje služe kao rezervoari *C. burnetii* u prirodi. U Australiji, gde je kju groznica endemsko i enzoosko oboljenje, kao značajan rezervoar se opisuju različite vrste torbara (Bennett i sar., 2011; Cooper i sar., 2012, 2013). Glavni rezervoari najpatogenijeg do sada opisanog soja poreklom sa teritorije Francuske Gvajane su lenjivci (Davoust i sar., 2014; Eldin i sar., 2015). U različitim endemskim regijama Španije kao rezervoari se navode sitni glodari, ali i divlje svinje, divlji preživari i ptice (Barandika i sar., 2007, 2008; Astobiza i sar., 2011; Bolaños-Rivero i sar., 2017). Postoje i navodi koji ukazuju na mogućnost uloge morskih sisara kao rezervoara *C. burnetii* (Kersh i sar., 2012), a u Francuskoj je ustanovljeno da

značaj imaju migratorne vrste ptica iz Afrike i Azije (*Socolovschi i sar., 2012*).

2.4.4. Krpelji

Za razliku od većine bolesti koje prenose vektori, za kju groznicu nije neophodno prisustvo artropode kao vektora za prenošenje uzročnika sa rezervoara na domaćina sisara. Međutim, iako je inhalacija primarni put infekcije, smatra se da u prirodi među životinjama patogen cirkuliše preko krpelja i da su oni odgovorni za heterospecijsko prenošenje i prostornu disperziju među kičmenjacima (*Duron i sar., 2015b; Eldin i sar., 2017*). U više sprovedenih istraživanja kao faktor rizika za nastanak infekcije kod preživara se navodi infestacija krpeljima (*Cantas i sar., 2011; van Engelen i sar., 2014*), a dokazana je i korelacija između seropozitivnih perživara i *C. burnetii*-pozitivnih krpelja koji su parazitirali na njima (*Psaroulaki i sar., 2006*). Takođe, ustanovljeno je da krpelji predstavljaju ekološku vezu u prirodi između divljih i domaćih životinja (*Cooper i sar., 2013*).

Preko 40 vrsta iksodidnih krpelja i bar 14 vrsta argasidnih krpelja mogu biti nosioci *C. burnetii* (*Babudieri, 1959; Eldin i sar., 2017*). Uzročnik je izolovan i iz drugih vrsta artropoda (buve, grinje, stenice) ali kod njih nije dokazano transovarijalno prenošenje (na potomstvo), niti prenošenje uzročnika na kičmenjake. Upravo su prvi sojevi *C. burnetii* izolovani iz uzoraka tvrdih krpelja: *D. andersoni* (referentni soj *Nine Mile*) u Montani (*Davis i sar., 1938*) i *Haemaphysalis humerosa* u Australiji (*Smith i Derrick, 1940*).

Krpelji u svim stadijumima mogu da unesu uzročnika kada se hrane na inficiranoj životinji, međutim, eksperimentalno je dokazano da rezervoari *C. burnetii* ne postaju svi krpelji koji se hrane na inficiranoj životinji (*Smith, 1940; Smith i Derrick, 1940; Balashov i Daiter, 1973*). Uzročnik je u krpeljima prisutan u epitelnim ćelijama creva, hemolimfi, Malpigijevim

sudovima, pljuvačnim žlezdama i jajnicima (Smith, 1940; Smith i Derrick, 1940; Babudieri, 1959; Balashov i Daiter, 1973). Dokazano je da se *C. burnetii* prenosi transovarijalno i transstadijalno kod većine iksodidnih i argasidnih vrsta krpelja (Smith i Derrick, 1940; Babudieri, 1959). Efikasnost transstadijalnog prenošenja je oko 100%, dok je kod transovarijalnog od 30-60% (Smith i Derrick, 1940; Balashov i Daiter, 1973).

U krpeljima *C. burnetii* može da preživi preko 1000 dana, a nedostatak krvnog obroka, hranjenje na imunizovanom domaćinu i niske temperature ne utiču na preživljavanje u telu krpelja (Balashov i Daiter, 1973). Uz to, prisustvo *C. burnetii* u organizmu krpelja metabolički ne utiče na same krpelje (Smith i Derrick, 1940; Balashov i Daiter, 1973). Prilikom hranjenja na životinji krpelji izlučuju velike količine *C. burnetii* fecesom (od 10^3 do 10^{10} /g fecesa), u kome uzročnici mogu da prežive do 635 dana (Smith i Derrick, 1940; Philip, 1948b; Balashov i Daiter, 1973).

2.4.5. Slobodnoživeće amebe

U *in vitro* uslovima *C. burnetii* može da se razmnožava u slobodnoživećim amebama, što ukazuje na to da one mogu služiti kao rezervoari u prirodnim uslovima. Međutim, neophodna su dalja istraživanja koja bi definisala ulogu slobodnoživećih ameba kao rezervoara u prirodnom ciklusu *C. burnetii* (La Scola i Raoult, 2001).

2.5. PUTEVI INFEKCIJE

2.5.1. Inhalacija

Najčešći put infekcije uzročnikom kju groznice je inhalacija aerosola kontaminiranog sekretima i ekskretima poreklom od inficiranih životinja (Marrie i sar., 1989; Maurin i Raoult, 1999; Parker i sar., 2006; Wade i sar., 2006; Tissot-Dupont i Raoult, 2008; Amitai i sar., 2010).

2.5.2. Direktni kontakt

Direktno izlaganje inficiranim životinjama i kontakt s njihovim proizvodima (posteljica, pobačeni plodovi, koža, vuna, prostirka) može dovesti do infekcije (Wade i sar., 2006; Schimmer i sar., 2014a, 2014b). Slučajevi masovne pojave pobačaja kod koza opisani su nakon što su na poljoprivrednom sajmu bile u kontaktu sa inficiranim životinjama koje su tamo i pobacile (Sanford i sar., 1994).

2.5.3. Ingestija

S obzirom na to da inficirane životinje mogu izlučivati uzročnika i preko mleka, sirovo mleko može predstavljati izvor infekcije (Maurin i Raoult, 1999), a temperature pasterizacije mleka efikasno uništavaju *C. burnetii* (Huebner i sar., 1949). Međutim, postoje oprečna mišljenja i kontradiktorni rezultati, iz različitih istraživanja, u vezi sa hipotezom da konzumiranje mleka i mlečnih proizvoda poreklom od inficiranih životinja može dovesti do infekcije ljudi (Benson i sar., 1963; Krumbiegel i Wisniewski, 1970; Rodolakis, 2009), tako da je ova tema i dalje predmet polemika. U istraživanju u Francuskoj u 64% mlečnih proizvoda ustanovljeno je prisustvo DNK *C. burnetii*, međutim, izolacija živih bakterija je bila neuspešna (Eldin i sar., 2013). Psi se mogu inficirati ingestijom posteljica i sirovog mleka poreklom od inficiranih životinja (Maurin i Raoult, 1999).

2.5.4. Transkutano/perkutano prenošenje

Prenošenje *C. burnetii* ubodom krpelja dokazano je kod pasa (Mantovani i Benazzi, 1953). Postoje opisani slučajevi koji ukazuju i na mogućnost infekcije ljudi ovim putem (Beaman i Hung, 1989; Rolain i sar., 2005a; Nett i sar., 2012). Genomske analize španskih izolata *C. burnetii* poreklom iz domaćih i divljih životinja, krpelja i ljudi pokazale su da svi pripadaju istoj genomskoj grupi (González-Barrío i sar., 2016). U enzootskim oblastima na Kipru dokazano je da postoji značajna korelacija između

seropozitivnih domaćih preživara i krpelja nosilaca *C. burnetii* (Psaroulaki i sar., 2006). Perkutana infekcija može nastati i preko oštećenja na koži, usled kontaminacije dlake i kože životinje fecesom krpelja u kome *C. burnetii* može biti prisutna u velikom broju (Philip, 1948b).

2.5.5. Transfuzija krvi

Transfuzijom krvi može doći do infekcije (Kersh i sar., 2013) ali se smatra da je ovaj put prenošenja zanemarljiv. Međutim, trijažom davalaca krvi u Holandiji, nakon pojave jedne od najvećih epidemija kju groznice u svetu, otkriveno je prisustvo antitela protiv faze II *C. burnetii* kod 4,4% ispitanih (Slot i sar., 2014), zbog čega bi u endemskim oblastima prilikom pojave oboljenja trebalo uzimati u obzir i ovaj put prenošenja.

2.5.6. Prenosenje seksualnim putem

Kod ljudi je opisan slučaj prenošenja kju groznice seksualnim putem, kada je molekularno dokazano prisustvo uzročnika u spermi inficiranog čoveka (Milazzo i sar., 2001). Ovaj put prenošenja je dokazan kod eksperimentalno inficiranih miševa, a uzročnik je dokazan i u spermi mužjaka miševa (Kruszewska i Tylewska-Wierzbanowska, 1992, 1993). Takođe, žive bakterije su dokazane i u spermi prirodno inficiranih seropozitivnih bikova, što ide u prilog hipotezi da u prirodnim uslovima prenošenje *C. burnetii* seksualnim putem može imati značaja u epizootologiji kju groznice (Kruszewska i Tylewska-Wierzbanowska, 1997).

2.6. FAKTORI RIZIKA ZA NASTANAK INFEKCIJE

Analizom pojava većih epidemija kju groznice definisani su faktori koji su značajni za njihovu pojavu, kao što su blizina inficiranih životinja urbanim sredinama (najčešće malih preživara), gustina populacije i kretanje životinja, kao i meteorološki faktori (Boden i sar., 2014; de Rooij i sar., 2016). Ljudi se najčešće inficiraju inhalacijom prašine kontaminirane izlučevinama

inficiranih životinja (*Marrie, 1990*). Tradicionalno, u vezi sa infekcijom ljudi najčešće se navodi kontakt sa domaćim preživarima. U ovom smislu najugroženije kategorije su farmeri, veterinari, radnici na liniji klanja, ali i osoblje u laboratorijama koje rukuje infektivnim materijalom (*Maurin i Raoult, 1999*). Seoski turizam, poseta prirodnim rezervatima i učešće u safariju u afričkim zemljama opisani su kao faktor rizika za pojave epidemija kju groznice kod ljudi (*Potzman i sar., 2000*).

Male epidemije mogu se javiti nakon kontakta ljudi sa kućnim ljubimcima – psima (*Rauch i sar., 1987; Laughlin i sar., 1991; Buhariwalla i sar., 1996; Komiya i sar., 2003*) i mačkama (*Langley i sar., 1988; Marrie i sar., 1988a, 1988b*) i najčešće su posledica kontakta sa gravidnim životinjama prilikom porođaja, kao i sa njihovim mladuncima. Iako se pojava kju groznice najčešće vezuje za ruralne sredine i kontakt sa domaćim životinjama *Tozer i sar. (2011)* zaključili su da je seroprevalencija *C. burnetii* ista kod ljudi i u ruralnim i urbanim sredinama. *Tozer i sar. (2014)* ustanovili su visoku prevalenciju *C. burnetii* u urinu pasa i mačaka, što ukazuje na to da ljubimci mogu imati ulogu u prenošenju *C. burnetii* na ljude u urbanim sredinama i da potencijalni rizik za ljude ne predstavlja samo kontakt sa inficiranim gravidnim životinjama, već i sa životinjama koje su klinički zdrave.

Kao glavni faktori rizika u najvećoj epidemiji u Holandiji navode se porast intenzivnog gajenja koza u periodu 1985-2009. godine i uvoz velikog broja inficiranih životinja. Sa životinjama su uneseni i novi genotipovi u imunološki naivnu zajednicu, a dodatni faktor rizika je bila blizina farmi naseljenim mestima, ali i nedostatak adekvatnog veterinarskog nadzora (*Eldin i sar., 2017*).

Neobično velika epidemija kju groznice, ako se uzme u obzir izrazita udaljenost farmi domaćih životinja, opisana je u školskom internatu u

gradu Tel Avivu (Izrael). Pojava infekcije je povezana sa kontaminiranim sistemom za klimatizaciju prostora. Pretpostavlja se da je sistem kontaminiran ekskretima brojnih slobodnih mačaka koje su se nalazile u okolini dvorišta kompleksa, a kod kojih je ustanovljena visoka seroprevalencija antitela protiv *C. burnetii* (Amitai i sar., 2010).

Često se diagnostikuju slučajevi kju grozince kod osoba koje uopšte nisu bile u kontaktu sa životinjama, što se najčešće pripisuje ulozi vetra, kojim se kontaminirani aerosol može preneti na udaljenost od bar 30 km (Tissot-Dupont i sar., 2004). U Francuskoj postoje hiperendemske zone za kju groznicu, u kojima infekcija nastaje usled rasejavanja *C. burnetii* preko vetra maestrala koji duva iz smera lokalnih poseda na kojima se gaje ovce (Tissot-Dupont i sar., 1999, 2004). Značaj uloge vetra u pojavama epidemija opisan je i u Engleskoj (Hawker i sar., 1998).

U Australiji (Cooper i sar., 2012; Harris i sar., 2013) i Francuskoj Gvajani (Eldin i sar., 2015) koje imaju tropsku klimu, zabeleženo je da se epidemije kju groznice javljaju dva do tri meseca nakon kišnih sezona. U Australiji se kišne sezone povezuju sa porastom populacije makropoda (kengura i valabija), a u Francuskoj Gvajani s porastom populacije lenjivaca. Navedene vrste imaju ulogu rezervoara i značaj u epidemiologiji kju groznice u ovim endemskim oblastima.

2.7. KLINIČKA SLIKA

2.7.1. Klinička slika kod ljudi

Tradicionalno, kju groznica se kod ljudi javlja u akutnoj i hroničnoj formi. Akutna forma najčešće protiče asimptomatski, ali se mogu javiti simptomi slični simptomima gripa, atipična pneumonija ili hepatitis, a ređe srčana oboljenja, osip po koži i neurološki simptomi. U hroničnom toku najčešći oblik oboljenja je endokarditis (čak 75% slučajeva), zatim

vaskularne infekcije, hronični hepatitis, hronično zapaljenje pluća, ređe osteoartritis i osteomijelitis. Kod trudnica može doći do pojave pobačaja. Inkubacija iznosi 2-3 nedelje. Nakon primarne infekcije oko 60% nelečenih slučajeva protiče asimptomatski, a oko 40% razvije neke od simptoma akutne forme oboljenja. Kod predisponiranih pacijenata (pacijenti s vaskularnim oboljenjima, imunodeficijentne osobe, trudnice) dolazi do razvoja hronične forme i manifestacije oboljenja najčešće u vidu endokarditisa i vaskularnih infekcija, odnosno pobačaja kod trudnica (*Angelakis i Raoult, 2010*).

Međutim, noviji podaci iz literature pokazuju da se poslednjih godina vode polemike o definisanju hronične forme kju groznice. *Million i Raoult* (2017) navode da je termin „hronična kju groznica“ u cilju definisanja kardiovaskularnih infekcija (naročito endokarditisa) zastareo i da treba da se napusti, a da je prihvatljiviji termin perzistentna fokalna infekcija. To argumentuju podacima koje su objavili *Million i sar.*, (2013), koji navode da se endokarditis javlja kod većine akutno obolelih pacijenata koji nisu primili terapiju, a imaju promene na srčanim zaliscima, ali se endokarditis kod akutno obolelih neće javiti ako se primenjuje profilaktička terapija. Dodatno, u literaturi je nedavno objavljen podatak o proliferativnom zapaljenju srčanih zalistaka kod akutno obolelih pacijenata (*Million i sar.*, 2016). Takođe, visoki titri antitela nisu definitivni dokaz perzistentne fokalne infekcije, što se pokazalo u epidemiji u Francuskoj Gvajani, gde je perzistentna fokalna infekcija retko dijagnostikovana uprkos ustanovljenom vrlo visokom titru antitela (*Eldin i sar.*, 2017).

Kliničke manifestacije kju groznice zavise od soja, njegove virulencije, ali i imunološkog odgovora domaćina, odnosno specifičnih faktora rizika karakterističnih za pacijenta, a postojeće promene na srčanim zaliscima povećavaju rizik od nastanka endokarditisa.

2.7.2. Klinička slika kod životinja

Kju groznica je opisana kod različitih vrsta životinja, najčešće domaćih preživara, ali i kod divljih sisara, kućnih ljubimaca, ptica i reptila (*Babudieri, 1959*). Oboljenje kod životinja najčešće protiče asimptomatski, ali može dovesti do nastaka pneumonije ili pobačaja, prevremenog rađanja, kao i rođenja slabo vitalne mladunčadi (*Arricau-Bouvery i Rodolakis, 2005*). Domaći preživari su najčešće hronično inficirani, a jedini vidljiv klinički simptom je pobačaj, prevremeno rađanje mladunčadi, kao i promene na plodovima. Pobačaji su češći kod malih preživara nego kod goveda, kod kojih se kao posledica infekcije uglavnom javljaju sterilitet i promene na plodovima (*Lang, 1990*). Infekcija posteljice ustanovljena je kod krava sa različitim titrima antitela u uzorcima mleka. Međutim, na kotiledonima dolazi do manje izraženih promena uz odsustvo zapaljenja, čime se može objasniti veliki broj asimptomatskih slučajeva kod krava (*Hansen i sar., 2011*). Nakon eksperimentalne infekcije koza, pobačaj se javlja u drugoj trećini graviditeta kod svih ispitivanih životinja. Neposredno pred pobačaj javlja se gnojno-nekrotično zapaljenje posteljice, a promene na organima i mogućnost otkrivanja DNK *C. burnetii* tek 120 dana posle pobačaja (*Sánchez i sar., 2006*). Uprkos istraživanjima sprovedenim u raznim zemljama, koje opisuju prisustvo uzročnika kod pasa i mačaka, podaci o patogenezi i kliničkoj slici kod ovih vrsta ostaju oskudni. Infekcija kod gravidnih kuja može dovesti do rane smrti mladunčadi (*Buhariwalla i sar., 1996*).

2.8. GEOGRAFSKA RASPROSTRANJENOST KJU GROZNICE

Kju groznica je oboljenje prisutno svuda u svetu sa izuzetkom Novog Zelanda i Antarktika (*Hilbink i sar., 1993*). Međutim, u većini zemalja nije obavezno prijavljivanje pojave oboljenja, tako da se značaj najčešće pridaje pojavi većih epidemija. Kao što je već rečeno, najveća epidemija koja se ikada dogodila u svetu opisana je u Holandiji u periodu između 2007-2010.

godine. Tom prilikom prijavljeno je preko 4.000 obolelih, a procenjuje se da je ukupno bilo i više od 40.000 (*Delsing i sar., 2010*), što je sigurno doprinelo značajnom porastu istraživanja vezanih za kju groznicu u mnogim zemljama u prethodnoj deceniji. Kju groznica je endemsko oboljenje i u Australiji (*Cooper i sar., 2012; Shapiro i sar., 2016*), Španiji (*Barandika i sar., 2007; González-Barrio i sar., 2016; Bolaños-Rivero i sar., 2017*), na Kipru (*Spyridaki i sar., 2002; Psaroulaki i sar., 2006, 2014*) i u Iranu (*Fard i Khalili, 2011; Asadi i sar., 2014; Rezaei i sar., 2016; Esmailnejad i Hasiri, 2017; Khalili i sar., 2018*), gde su vršena opsežna istraživanja, a prisustvo uzročnika je ustanovljeno kako kod ljudi, tako i kod domaćih i divljih životinja, kao i u krpeljima. Hiperendemsko područje za kju groznicu je teritorija Francuske Gvajane, gde su zabeležene epidemije s prevalencijom od čak 100% (uobičajena stopa je oko 60%), usled prisustva do sada najpatogenijeg opisanog soja, koji je prisutan samo na tom području (*D'Amato i sar., 2015; Eldin i sar., 2017*).

U Republici Srbiji kju groznica se pojavljuje u endemo-epidemijskoj formi na teritoriji Vojvodine, dok se u centralnoj Srbiji javljaju sporadični slučajevi (*Nedić i sar., 2003*). U Vojvodini je kju groznica označena kao profesionalno oboljenje (*Španović i sar., 2017*). Uzročnik je ustanovljen i u mleku krava na farmama u Vojvodini sa prevalencijom od 16,8% (*Vidić i sar., 2008*). U Mađarskoj je prvi put u regionu molekularno i serološki ustanovljeno prisustvo *C. burnetii* kod pasa (*Hornok i sar., 2013*). Međutim, do sada, u dostupnoj literaturi, nije bilo podataka o molekularnim i serološkim istraživanjima prisustva uzročnika kju groznice kod pasa, kako u Srbiji, tako i u ostalim zemljama u regionu.

2.9. DIJAGNOSTIKA

2.9.1. Izolacija *C. burnetii*

Zbog izuzetno visoke virulencije *C. burnetii*, rad sa kontaminiranim materijalom i kultivaciju uzročnika bi trebalo da vrši iskusno laboratorijsko osoblje, u laboratorijama koje poseduju nivo biosigurnosti III. Izolacija uzročnika se najčešće vrši na HEL (*Human Erythroleukemia Cell Line*) ćelijskim linijama, koje se inkubiraju na temperaturi 37 °C, u atmosferi s 5% CO₂, u trajanju najčešće 5-7 dana. Umnožavanje uzročnika može da se izvodi i na fibroblastima i *Vero* ćelijskoj liniji (*Verda reno* – epitelene ćelije bubrega afričkog zelenog majmuna). Inokulacija se takođe može vršiti na žumančetnu kesu pet dana starih kokošjih embriona, koje se na prisustvo uzročnika ispituju nakon 10-15 dana. Prema potrebi, kod visoko kontaminiranih uzoraka, može se koristiti inokulacija u laboratorijske životinje – miševе i zamorce (*OIE*, 2018).

2.9.1.2. *Aksenični medijum*

Godinama su striktno obligatna intracelularna priroda *C. burnetii* i dugi periodi kultivacije predstavljali eksperimentalnu prepreku u izučavanju kju groznice. Poslednjih godina je načinjen napredak razvijanjem akseničnog medijuma u kome se može umnožavati *C. burnetii*. Prvobitno je razvijen aksenični medijum koji omogućava rast *C. burnetii* u mikroaerobnim uslovima (*Omsland i sar.*, 2009), a ubrzo nakon toga razvijen je i poboljšani medijum druge generacije nazvan ACCM2 (*acidified cysteine citrate medium 2*) sa kiselim pH, inkubiran u 2,5% atmosferi s kiseonikom, koji podržava umnožavanje i održivost *C. burnetii* (*Omsland i sar.*, 2011; *Sandoz i sar.*, 2014). U novijim istraživanjima opisan je i medijum koji sadrži samo aminokiseline (kao jedini izvor ugljenika i energije), koje podstiču rast i razmnožavanje i poboljšavaju opstanak *C. burnetii* (*Sandoz i sar.*, 2016).

2.9.2. Imunohistohemija

Otkrivanje prisustva *C. burnetii* u tkivima se može vršiti u svežim tkivima ili tkivima prethodno fiksiranim u formalinu i uklopljenim u parafin. Otkrivanje se vrši primenom poliklonskih ili monoklonskih antitela (Maurin i Raoult, 1999), a dobar je metod izbora u sumnjivim slučajevima - kada je izolacija uzročnika iz uzoraka negativna ili nije moguća (npr., u jako kontaminiranim uzorcima) (Simten i sar., 2018).

2.9.3. Molekularne metode

Za otkrivanje DNK *C. burnetii* u ćelijskim kulturama i u različitim uzorcima može se primenjivati metoda konvencionalne lančane reakcije polimeraze (*polymerase chain reaction - PCR*) (Stein i Raoult, 1992; Berri i sar., 2000), PCR u dva stupnja - *nested PCR* (Zhang i sar., 1998) i PCR u stvarnom vremenu - *qPCR* (Klee i sar., 2006; Panning i sar., 2008), otkrivanjem pojedinačnih specifičnih sekvenci ili višestrukih specifičnih sekvenci koje se u genomu javljaju u više kopija. U upotrebi su metode koje otkrivaju gene poput višestruke sekvence IS1111, superoksid dismutaza gen (*sodB*), *com1* gen koji kodira protein spoljašnje membrane mase 27 kDa, operon toplotnog šoka koji kodira dva proteina toplotnog šoka (*htpA* i *htpB*), izocitrat dehidrogenaza gen (*icd*), kao i 16S rRNK. Otkrivanje ponavljajućih regiona kao što je IS1111, koji se u genomu *C. burnetii* javlja u više kopija (7-110 u zavisnosti od soja), povećava osetljivost metode (Klee i sar., 2006), jer se višestruki markeri brže otkrivaju zbog veće početne koncentracije u genomu, što je značajno u uzorcima u kojima je uzročnik prisutan u vrlo niskim koncentracijama. Metod koji otkriva ponavljajući region sličan transpozonu IS1111 - *Trans-PCR*, pokazao se kao odličan za otkrivanje DNK *C. burnetii* u uzorcima sa malim brojem bakterija (vaginalni brisevi, mleko, feces) (Berri i sar., 2000). Međutim, iako poseduju visoku specifičnost, nedostatak metoda kojima se otkrivaju ponavljajući regioni je nemogućnost

određivanja koncentracije *C. burnetii* u uzorku, pa se u tu svrhu mora koristiti metod pomoću kog se umnožava neki specifični pojedinačni gen.

2.9.3.1. Umnožavanje ponavljajuće IS1111 sekvence u cilju otkrivanja prisustva DNK *C. burnetii* u krpeljima

Do 2015. godine smatralo se da je IS1111 element specifičan za *C. burnetii*, kada je otkriveno da veliki broj CLE krpelja sadrži ovaj element u svom genomu (Duron, 2015; Pearson i sar., 2016). To može dovesti do pogrešne identifikacije i lažne interpretacije prevalencije i prenošenja *C. burnetii* kada se dati metod primenjuje u istraživanjima prisustva uzročnika u krpeljima. Zbog toga se u tim slučajevima za postavljanje definitivne dijagnoze mora izvršiti sekvenciranje umnoženih DNK proizvoda ili bi paralelno s umnožavanjem IS1111 elementa trebalo izvršiti umnožavanje još nekog pojedinačnog gena *C. burnetii* (Duron i sar., 2015b).

2.9.4. Molekularna tipizacija *C. burnetii*

Genotipizacija je neophodan metod za razumevanje epidemija i epizootija i otkrivanje izvora infekcije kod ljudi i životinja. U početnim epidemiološkim istraživanjima vezanim za kju groznicu korišćeno je sekvenciranje 16S rRNK, sekvenciranje 16S-23S rRNK, sekvenciranje β -podjedinice RNK polimeraze (*rpoB*) i ITS sekvenciranje (*internal transcribed spacer*), ali ubrzo se pokazalo da ne poseduju dovoljno karakteristika za razlikovanje sojeva i genotipizaciju *C. burnetii* (D'Amato i sar., 2016). Geni ili regioni unutar genoma koji su odabrani u metodama za otkrivanje uzročnika su optimalno visoko konzervirani među sojevima, a geni ili regioni unutar genoma koji se koriste za molekularnu tipizaciju treba da variraju među sojevima. Prilikom molekularne tipizacije koriste se specifični regioni – lokusi, a određeni modeli raspodele su karakteristični za jedan soj. Za genotipizaciju sojeva *C. burnetii* danas se najčešće koriste MLVA (*multi-locus variable number of tandem repeats analysis*) i MST (*multi-*

locus sequence typing), jer imaju najveću moć razlikovanja genotipova. Prvi put kada je korišćen MLVA metod (Svraka i sar., 2006) na osnovu sekvenci iz 21 izolata *C. burnetii*, definisano je pet glavnih klastera i devet MLVA tipova. Kasnije je ovaj metod poboljšan, korišćenjem dva panela markera da bi se povećala sposobnost razlikovanja i iz 42 izolata definisano je 36 MLVA tipova (Arricau-Bouvery i sar., 2006). Međutim, ponovljivost ovog metoda je niska zbog nestabilnosti umnoženih segmenata DNK i postojanja značajnih neusaglašenosti u rezultatima dobijenim između različitih laboratorija (van Belkum, 2007). Korišćenjem MST genotipizacije (Glazunova i sar., 2005) identifikovano je 30 različitih genogrupa i tri monofiletske grupe među 173 izolata *C. burnetii*. Metod je veoma dobar i omogućava efikasno praćenje puteva infekcije u različitim regionima i definisanje geografskog porekla pojedinih genotipova. Primenom MLVA i MST metoda danas je moguće razlikovati 36 genotipova *C. burnetii*.

SNP (*single nucleotide polymorphisms*) genotipizacija je razvijena u periodu pojave epidemije u Holandiji, kao metod koji je direktno primenljiv na uzorke poreklom od životinja i ljudi, bez potrebe za obogaćivanjem u kulturi (Huijsmans i sar., 2011). Razvijeno je deset SNP-a za razlikovanje, korišćenjem pet sekvenci celih genoma koji su dostupni u Banci gena i identifikovano je pet različitih genotipova. Takođe, razvijen je SNP metod koji je izveden iz MST genotipizacije (Hornstra i sar., 2011), čime je povećana baza genotipova genotipizacijom 43 netipizirana izolata metodom MST.

Razvoj metoda tipizacije sojeva *C. burnetii* je i dalje u toku, kao i istraživanja u vezi sa standardizacijom MLVA panela za genotipizaciju.

2.9.5. Serologija

Dijagnostika kju groznice kod ljudi i životinja se najčešće vrši primenom seroloških metoda. Najčešće su u upotrebi reakcija vezivanja

komplementa (RVK), indirektna imunofluorescencija (IF) i imunoenzimske metode (ELISA) (Slabá i sar., 2005; Rousset i sar., 2007). Serološki testovi su odlični za trijažu većeg broja uzoraka. Međutim, ovi testovi imaju mnoga ograničenja, kao što je otežana interpretacija rezultata kod pojedinačnih životinja, jer životinje izlučuju *C. burnetii* i pre sinteze antitela, kod nekih jedinki uopšte ne dolazi do specifične serokonverzije, a postoje i seronegativne kliconoše (Berri i sar., 2001; Arricau-Bouvery i sar., 2003; Rousset i sar., 2009). Takođe, rutinski serološki testovi kod životinja (ELISA, RVK) ne mogu da razlikuju da li je životinja bila u kontaktu sa uzročnikom, da li je inficirana ili izlučuje uzročnika, jer ne postoji stvarna veza između serološkog odgovora i izlučivanja uzročnika. Prisustvo pojedinih klasa imunoglobulina protiv faze I i faze II *C. burnetii* nije dovoljno istraženo kod životinja, pa interpretacija rezultata može varirati među laboratorijama.

2.9.5.1. Reakcija vezivanja komplementa (RVK)

Reakcija vezivanja komplementa (RVK) ima visoku specifičnost, ali je osetljivost niska u poređenju s IF i ELISA, zbog čega je u veterinarskoj dijagnostici sve manje u upotrebi (Slabá i sar., 2005; Rousset i sar., 2007). Antitela akutne faze se teško dijagnostikuju primenom RVK. Za izvođenje RVK koristi se mešavina antigena faze I i faze II *C. burnetii*. Titri između 1/10 i 1/40 javljaju se kod latentne infekcije; titri $\geq 1/80$ kod jedne ili više životinja u grupi od 5-10 životinja su odlike aktivne infekcije (OIE, 2018).

2.9.5.2. Imunofluorescencija (IF)

U humanoj medicini imunofluorescencija (IF) je referentni metod za dijagnostiku obolelih od kju groznice. Za izvođenje testa se koriste obe faze *C. burnetii*. Primenom IF kod ljudi mogu da se razlikuju akutno oboleli od hronično inficiranih. Prilikom akutne infekcije antitela imunoglobulina G klase protiv faze II su povišena, dok su tokom hronične infekcije povišena antitela protiv obe faze. Na tržištu ne postoje IF testovi namenjeni za

primenu na životinjama. Može se vršiti prilagođavanje testa za primenu na životinjama, korišćenjem pločica obloženih fazom I i fazom II i zamenom antiglobulina-konjugata ljudi konjugatom namenjenim odgovarajućoj vrsti životinja. Interpretacija rezultata u smislu definisanja akutne i hronične forme bolesti nije procenjena kod životinja (OIE, 2018).

2.9.5.3. ELISA

ELISA je metod izbora za primenu u veterinarskoj medicini u poređenju sa RVK i IF, jer je laka za izvođenje, podesna je za trijažu velikog broja životinja, a ima visoku specifičnost (Slabá i sar., 2005; Rousset i sar., 2007, 2009; Niemczuk i sar., 2014). Ovim testom nije moguće razlikovati antitela protiv faze I i faze II, jer su mikrotitracione ploče obložene antigenima obe faze *C. burnetii*. Serumi se najčešće ispituju u razređenjima od 1/100 do 1/400, u zavisnosti od testa. Za dijagnostiku u veterinarskoj medicini dostupni su ELISA kitovi različitih proizvođača za otkrivanje antitela u različitim uzorcima (serum, plazma, mleko) kod domaćih preživara.

2.10. TERAPIJA

Najefikasniji antibiotik u terapiji *C. burnetii* je doksiciklin, mada su opisani i rezistentni sojevi (Rolain i sar., 2005b, 2005c). Tetraciklini i fluorokvinoloni su se pokazali kao efikasni protiv *C. burnetii*, pa je preporučeno da se koristi kombinacija doksiciklina i fluorokvinolona u terapiji hroničnih formi oboljenja (Raoult, 1993). Do danas nije zabeležena rezistencija na sulfametoksazol-trimetoprim koji se može koristiti tokom trudnoće.

2.11. PREVENCIJA

Da bi se sprečila pojava oboljenja kod ljudi neophodan je aktivni nadzor oboljenja kod životinja. Higijenske mere podrazumevaju

neškodljivo uklanjanje pobačenih plodova i posteljica prilikom pojave pobačaja kod životinja. Takođe, nužno je sprečavanje ingestije pobačenih tkiva od strane pasa i mačaka. Kontaminirana prostirka bi takođe trebalo da se neškodljivo ukloni. Tokom vetrovitih sezona bi trebalo izbegavati prenošenje prostirki i stajskog đubriva, da bi se sprečilo prenošenje uzročnika na veće udaljenosti. Trebalo bi vršiti suzbijanje krpelja u prirodi i na životinjama primenom akaricida. Prilikom uvođenja novih životinja u objekte treba voditi računa o njihovom zdravstvenom stanju, a isto se odnosi i na sajmove i izložbe gde je prisutan veliki broj životinja na malom prostoru.

Danas su u upotrebi samo inaktivisane vakcine poreklom od *Nine Mile* soja *C. burnetii*. Vakcinacija domaćih preživara se primenjuje u cilju smanjenja stope pobačaja i širenja infekcije. U Evropi je dostupna inaktivisana vakcina faze I „*Coxevac*“, koja je efikasna u smanjenju broja pobačaja i bakterija u vaginalnom iscetku, fecesu i mleku, ali se vakcinacijom ne sprecača kliconoštvo (*Arricau-Bouvery* i sar., 2005; *O'Neill* i sar., 2014). Preporuka je da se vakcinacija vrši pre prvog graviditeta kod neinficiranih životinja (*Hogerwerf* i sar., 2011). Međutim, ukoliko su životinje već inficirane vakcinacija nije efikasna u sprečavanju pojave pobačaja (*Guatteo* i sar., 2008). Takođe, nisu dostupne vakcine kojima bi mogle da se razlikuju vakcinisane životinje od prirodno inficiranih.

U Australiji je od 1989. godine dostupna vakcina za ljude „*Q vax*“, koja se preporučuje za primenu kod ljudi koji se bave rizičnim zanimanjima (veterinari, radnici u mesnoj industriji i poljoprivredi). Ova vakcina je korišćena u Evropi kod ugroženih kategorija ljudi prilikom pojave epidemije u Holandiji (*Isken* i sar., 2013). Međutim, za sada je Australija jedina zemlja u kojoj se vrši aktivna vakcinacija ugroženih kategorija ljudi protiv kju groznice (*Sellens* i sar., 2018).

3. CILJ I ZADACI ISTRAŽIVANJA

Ciljevi istraživanja ove doktorske disertacije su:

1. Morfološka identifikacija i determinacija iksodidnih krpelja skinutih sa nevlasničkih pasa sa teritorije grada Beograda.
2. Ispitivanje prisustva *C. burnetii* u krpeljima i reproduktivnim tkivima nevlasničkih pasa sa teritorije grada Beograda.
3. Utvrđivanje seroprevalencije kod ispitivanih pasa ELISA testom, nastale kao posledica kontakta sa uzročnikom kju groznice.

Za ostvarivanje postavljenih ciljeva definisani su i zadaci istraživanja:

1. Sakupljanje uzoraka krvi, materica, jajnika i semenika pri hirurškoj intervenciji (sterilizacija, odnosno kastracija) nevlasničkih pasa obuhvaćenih programom sterilizacije, odnosno kastracije u sklopu Strategije rešavanja problema nevlasničkih pasa i mačaka na teritoriji grada Beograda i Programa kontrole i smanjenja populacije napuštenih pasa i mačaka na teritoriji grada Beograda, proisteklog u okviru Strategije („*Službeni list grada Beograda*“ br. 37/11).
2. Sakupljanje krpelja sa nevlasničkih pasa podvrgnutih prethodno pomenutim hirurškim intervencijama.

3. Obrada uzoraka za ispitivanje - odvajanje krvnih seruma, homogenizacija reproduktivnih tkiva, pakovanje i čuvanje do dalje obrade.
4. Identifikacija i determinacija vrste, razvojnog stadijuma i pola krpelja, ispiranje krpelja u opadajućim koncentracijama etanola, mehanička homogenizacija u fosfatnom puferu, pakovanje i čuvanje do dalje obrade.
5. Ekstrakcija DNK iz uzoraka reproduktivnih tkiva pasa i krpelja pomoću komercijalnog kita za ekstrakciju.
6. Molekularna detekcija prisustva DNK *C. burnetii* u ekstrahovanoj DNK iz uzoraka krpelja i reproduktivnih tkiva pasa prema protokolu *Berri i sar.* (2000).
7. Prečišćavanje dobijenih nukleotidnih sekvenci pomoću komercijalnog kita za prečišćavanje.
8. Određivanje redosleda nukleotida umnoženih sekvenci, obrada sekvenci i upoređivanje sa analognim sekvencama deponovanim u Banci gena u cilju utvrđivanja sličnosti i razlika između njih.
9. Serološka ispitivanja krvnih seruma pasa ELISA testom radi otkrivanja prisustva antitela protiv *C. burnetii* kod ispitivanih pasa.
10. Statistička obrada dobijenih rezultata.

4. MATERIJAL I METODE RADA

4.1. ISPITIVANI MATERIJAL

Uzorci za ispitivanja su prikupljeni na Katedri za hirurgiju, ortopediju i oftalmologiju i Katedri za porodiljstvo, sterilitet i veštačko osemenjavanje Fakulteta veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu, prilikom sprovođenja programa sterilizacije, odnosno kastracije nevlasničkih pasa u sklopu Strategije rešavanja problema nevlasničkih pasa i mačaka na teritoriji grada Beograda i Programa kontrole i smanjenja populacije napuštenih pasa i mačaka na teritoriji grada Beograda, proisteklog u okviru Strategije („Službeni list grada Beograda“ br. 37/11). Pre hirurške intervencije, izvršen je klinički pregled svake životinje i tom prilikom nijedna životinja nije pokazivala simptome koji bi ukazivali na neko infektivno oboljenje. Prilikom kliničkog pregleda, telo svake životinje je pregledano i na prisustvo krpelja. Nakon hirurškog zahvata - sterilizacije i kastracije pasa, a tokom trajanja anestezije, od ispitivanih životinja prikupljeni su uzorci krvi i reproduktivna tkiva - materice i jajnici ženki, odnosno semenici mužjaka.

Ministarstvo poljoprivrede i zaštite životne sredine - Uprava za veterinu, shodno Zakonu o dobrobiti životinja, Zakonu o opštem upravnom postupku i Zakonu o državnoj upravi, donelo je rešenje broj 323-07-00364/2017-05/3 od 13.07.2017. godine kojim je odobreno ovo istraživanje.

Krv i reproduktivna tkiva uzorkovani su od 105 polno zrelih nevlasničkih pasa poreklom sa teritorije grada Beograda (31 mužjak i 74 ženke), dok su krpelji uzorkovani sa 51 psa (40 ženki i 11 mužjaka) u okviru grupe ispitivanih jedinki. Uzorci su prikupljeni u periodu od aprila do novembra.

4.2. KRV (KRVNI SERUMI) POREKLOM OD PASA

4.2.1. Uzorkovanje krvi i priprema seruma za serološka ispitivanja

Krv za serološka ispitivanja uzorkovana je u količini od 4 ml u sterilne epruvete punkcijom *venae cephalicae antebrachii*, uz poštovanje principa asepse i antiseptike. Svi uzorci su propisno obeleženi i istog dana, u ručnom frižideru (4-8 °C) transportovani u laboratoriju Katedre za zarazne bolesti životinja i bolesti pčela Fakulteta veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu. Krv je ostavljena da spontano koaguliše, a zatim je izvršeno centrifugiranje u trajanju 15 min., na 2.000×g. Izdvojeni serumi su alikvotirani u sterilne mikroepuvete i čuvani na temperaturi -20 °C do dalje obrade.

4.3. REPRODUKTIVNA TKIVA PASA - MATERICE, JAJNICI I SEMENICI

4.3.1. Uzorkovanje reproduktivnih tkiva poreklom od nevlasničkih pasa

Reproduktivna tkiva - materice, jajnici i semenici pasa uzorkovana su nakon završene hirurške intervencije (sterilizacije, odnosno kastracije), pakovana u sterilne plastične kese i propisno obeležena. Svi uzorci su istog dana, u ručnom frižideru (4-8 °C) transportovani u laboratoriju Katedre za zarazne bolesti životinja i bolesti pčela Fakulteta veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu.

4.3.2. Homogenizacija reproduktivnih tkiva i priprema za ekstrakciju nukleinske kiseline

Obrada prikupljenih reproduktivnih tkiva pasa vršena je u aparatu *Bag Mixer 400 P (Interscience, Francuska)*, jačine 8 udaraca/s. Metod je odabran iz razloga što se na taj način maksimalno smanjuju rizici stvaranja aerosola i mogućnost nastanka laboratorijskih infekcija, s obzirom na to da je u pitanju zatvorena čelična konstrukcija, koja sprečava curenje uzorka i kontaminaciju okoline. Takođe, na ovaj način se izbegavaju rizici unakrsne kontaminacije uzoraka, a garantovana je optimalna bakterijska ekstrakcija obrađenih uzoraka.

Reproduktivna tkiva pasa su najpre usitnjena pomoću sterilnih makazica i skalpela, a potom razređena sterilnim fiziološkim rastvorom u razmeri 1:1, u kesama sa filterom *Bag Filter P (Interscience, Francuska)* poroznosti <250 µm, koje su kompatibilne s aparatom *Bag Mixer 400 P*. Za homogenizaciju tkiva korišćen je program od 8 udaraca/s u trajanju 210 s. Homogenizovani uzorci poreklom od mužjaka sačinjeni su od tkiva semenika, a homogenizovani uzorci poreklom od ženki sačinjeni su od tkiva materica i jajnika. Nakon izvršene homogenizacije, filtrirani materijal je alikvotiran u sterilne mikroeprevete i čuvan na temperaturi -20 °C do dalje obrade.

4.3.3. Ekstrakcija nukleinske kiseline pomoću komercijalnog kita za ekstrakciju

Nukleinska kiselina iz homogenizata reproduktivnih tkiva ekstrahovana je pomoću komercijalnog kita za ekstrakciju *GeneJET Genomic DNA Purification Kit 250 preps (Thermo Fisher Scientific, SAD)*, prema uputstvu proizvođača.

Postupak ekstrakcije nukleinske kiseline obuhvatao je sledeće korake:

1. Prethodno homogenizovano reproduktivno tkivo pasa uneseno je u sterilnu mikroeprevetu zapremine 1,5 ml u količini 200 μ l i resuspendovano u 180 μ l rastvora za digestiju. Potom je dodat rastvor proteinaze K u količini 20 μ l i cela suspenzija je dobro izmešana na vibracionoj mešalici (*Thermo Fisher Scientific, SAD*) da bi se dobio homogenizovan sadržaj.
2. Inkubacija uzorka je izvršena u vibrirajućem vodenom kupatilu *Thermo-Shaker TS-100 (Biosan, Letonija)*, na temperaturi 56 °C u trajanju 3 h, do potpune lize uzorka, odnosno dok se ne razlože svi delovi tkiva.
3. U narednom koraku dodato je 20 μ l rastvora RNaze, dobro izmešano na vibracionoj mešalici i ostavljeno da se inkubira na sobnoj temperaturi (21 \pm 5 °C) u trajanju 10 min.
4. U suspenziju je dodato 200 μ l rastvora za liziranje i dobro promešano na vibracionoj mešalici u trajanju 15 s, do nastanka potpuno homogenizovane mešavine.
5. Suspenziji je dodato 400 μ l 50% etanola i homogenizovano mešanjem na vibracionoj mešalici.
6. Mešavina je potom prenetu u *GeneJET Genomic DNA Purification* kolonu koja je postavljena u sabirnu eprvetu (obezbeđene od strane proizvođača kao sastavni deo kita). Izvršeno je centrifugiranje kolone na 6.000 \times g u trajanju 1 min. Sabirna eprveta sa sadržajem koji je prošao kroz filter je odbačena i kolona je postavljena u novu sabirnu eprvetu zapremine 2 ml (obezbeđene od strane proizvođača).
7. U kolonu je dodato 500 μ l radnog rastvora pufera I za ispiranje (u koji je na početku rada dodat 96-100% etanol prema uputstvu proizvođača) i centrifugirano na 8.000 \times g u trajanju 1 min. Sadržaj koji je prošao kroz kolonu je odbačen, a kolona je vraćena u istu sabirnu eprvetu.

8. U narednom koraku u kolonu je dodato 500 μ l radnog rastvora pufera II za ispiranje (u koji je na početku rada dodat 96-100% etanol prema uputstvu proizvođača) i centrifugirano na maksimalnoj brzini centrifuge (13.000 \times g) u trajanju 3 min. Sabirna epruveta sa sadržajem koji je prošao kroz kolonu je odbačena i kolona je prenetu u novu sterilnu mikroeprevetu zapremine 1,5 ml.
9. Kao završni korak dodato je 200 μ l pufera za ispiranje u centar kolone, inkubirano na sobnoj temperaturi u trajanju 2 min. i potom centrifugirano na 8.000 \times g u trajanju 1 min.

Kolone su odbačene, a ekstrahovana DNK dobijena ovim postupkom je alikvotirana u sterilne mikroeprevete i čuvana na temperaturi -20 °C do dalje upotrebe.

4.4. KRPELJI

4.4.1. Uzorkovanje krpelja sa nevlasničkih pasa

Pomoću pincete krpelji su pažljivo skinuti sa životinja i stavljeni u zasebne staklene bočice sa dodatkom 70% etanola. Svi uzorci su propisno obeleženi, shodno životinji sa koje potiču i istog dana u ručnom frižideru (4-8 °C) transportovani u laboratoriju Katedre za parazitologiju Fakulteta veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu, gde je izvršena morfološka identifikacija i determinacija krpelja.

4.4.2. Morfološka identifikacija i determinacija krpelja

Morfološka identifikacija i determinacija krpelja izvršena je pomoću stereomikroskopa (*Carl Zeiss*, Jena, Nemačka), uveličanja 100x i na taj način krpelji su klasifikovani u familije, rodove i vrste prema standardnom taksonomskom ključu (*Estrada-Peña* i sar., 2004). Krpelji su grupisani prema poreklu, odnosno životinji sa koje potiču, zatim prema vrsti, razvojnom

stadijumu i polu i čuvani na temperaturi -20 °C do ekstrakcije nukleinske kiseline.

4.4.3. Obrada krpelja - ispiranje i homogenizacija

Pojedinačni uzorci krpelja su najpre ispirani u seriji rastvora opadajućih koncentracija etanola (70%, 50%, 30%). Nakon konačnog ispiranja u sterilnoj destilovanoj vodi, krpelji su osušeni na sterilnom filter papiru. Svaki krpelj je stavljen u posebnu sterilnu plastičnu mikroeprevetu zapremine 1,5 ml i usitnjen pomoću sterilnog metalnog sečiva. U sledećem koraku, dodat je sterilni fosfatni pufer (*phosphate buffer saline* - PBS) u svaku epruvetu, u odnosu 1:1 (sa zapreminom krpelja). Krpelji su potom mehanički usitnjeni i homogenizovani pomoću sterilnog metalnog štapića i konačno je ceo sadržaj izmešan na vibracionoj mešalici *Thermo-Shaker TS-100* (*Biosan*, Letonija). Homogenizovani materijal je čuvan na temperaturi -20 °C do dalje obrade.

4.4.4. Zbirni uzorci krpelja

Na osnovu vrste, razvojnog stadijuma i pola krpelja, kao i psa sa kog potiču, formirani su zbirni uzorci krpelja koji su obuhvatali od 3-10 uzoraka, u zavisnosti od veličine krpelja (zbirne uzorke sa više od pet krpelja su činile lutke ili larve krpelja). Svaki zbirni uzrak je sadržao usitnjene delove svakog pojedinačnog krpelja i deo homogenizata dobijen prilikom obrade pojedinačnih uzoraka u prethodnom koraku, u konačnoj zapremini 200 µl.

4.4.5. Ekstrakcija nukleinske kiseline iz zbirnih uzoraka i pojedinačnih krpelja pomoću komercijalnog kita za ekstrakciju

Prvobitno je izvršena ekstrakcija nukleinske kiseline zbirnih uzoraka pomoću komercijalnog kita za ekstrakciju nukleinske kiseline. Nakon izvođenja lančane reakcije polimeraze sa zbirnim uzorcima, prema

prethodno opisanom protokolu *Berri i sar. (2000)* i dobijanjem pozitivnih uzoraka, pristupilo se ekstrakciji nukleinske kiseline iz pojedinačnih uzoraka krpelja, koji su se nalazili u okviru pozitivnih zbirnih uzoraka.

Nukleinska kiselina iz zbirnih uzoraka i pojedinačnih uzoraka krpelja ekstrahovana je na isti način, pomoću komercijalnog kita za ekstrakciju *GeneJET Genomic DNA Purification Kit 250 preps (Thermo Fisher Scientific, SAD)*, prema uputstvu proizvođača.

Postupak ekstrakcije nukleinske kiseline obuhvatao je sledeće korake:

1. Zbirni uzorci, odnosno homogenizati pojedinačnih krpelja, uneseni su u sterilnu mikroeprevetu zapremine 1,5 ml u količini 200 μ l i resuspendovani u 180 μ l rastvora za digestiju. Potom je dodat rastvor proteinaze K u količini 20 μ l i suspenzija je dobro izmešana na vibracionoj mešalici (*Thermo Fisher Scientific, SAD*) da bi se dobio homogenizovan sadržaj.
2. Inkubacija uzorka je izvršena u vibrirajućem vodenom kupatilu *Thermo-Shaker TS-100 (Biosan, Letonija)*, na temperaturi 56 °C u trajanju 8 h, do potpune lize uzorka, odnosno dok se ne razlože svi delovi.
3. U narednom koraku dodato je 20 μ l rastvora RNaze, dobro izmešano na vibracionoj mešalici i ostavljeno da se inkubira na sobnoj temperaturi (21 \pm 5 °C) u trajanju 10 min.
4. U suspenziju je dodato 200 μ l rastvora za liziranje i dobro promešano na vibracionoj mešalici u trajanju 15 s, do dobijanja potpuno homogenizovane mešavine.
5. Suspenziji je dodato 400 μ l 50% etanola i sve je homogenizovano mešanjem na vibracionoj mešalici.

6. Mešavina je potom prenetu u *GeneJET Genomic DNA Purification* kolonu koja je postavljena u sabirnu epruvetu (obezbeđene od strane proizvođača kao sastavni deo kita). Izvršeno je centrifugiranje kolone na $6.000\times g$ u trajanju 1 min. Sabirna epruveta sa sadržajem koji je prošao je odbačena i kolona je postavljena u novu sabirnu epruvetu zapremine 2 ml (obezbeđene od strane proizvođača).
7. U kolonu je dodato 500 μ l radnog rastvora pufera I za ispiranje (u koji je na početku rada dodat 96-100% etanol prema uputstvu proizvođača) i centrifugirano na $8.000\times g$ u trajanju 1 min. Sadržaj koji je prošao kroz kolonu je odbačen, a kolona je vraćena u istu sabirnu epruvetu.
8. U narednom koraku u kolonu je dodato 500 μ l radnog rastvora pufera II za ispiranje (u koji je na početku rada dodat 96-100% etanol prema uputstvu proizvođača) i centrifugirano na maksimalnoj brzini centrifuge ($13.000\times g$) u trajanju 3 min. Sabirna epruveta sa sadržajem koji je prošao kroz kolonu je odbačena i kolona je prenetu u novu sterilnu mikroepriuvetu zapremine 1,5 ml.
9. Kao završni korak dodato je 200 μ l pufera za ispiranje u centar kolone, inkubirano na sobnoj temperaturi u trajanju 2 min. i potom centrifugirano na $8.000\times g$ u trajanju 1 min.

Kolone su odbačene, a ekstrahovana DNK dobijena ovim postupkom je alikvotirana u sterilne mikroepriuvete (četiri alikvota od po 50 μ l) i čuvana na temperaturi $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ do dalje upotrebe.

4.5. POZITIVNA I NEGATIVNA KONTROLA

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

4.5.1. Pozitivna i negativna kontrola u molekularnim ispitivanjima

U svakoj lančanoj reakciji polimeraze korišćene su pozitivna i negativna kontrola. Kao pozitivna kontrola korišćena je DNK *C. burnetii* ekstrahovana iz celih ćelija faze I *C. burnetii* namenjenih za izvođenje reakcije vezivanja komplementa (*Bioveta a.s. International*, Češka). Ekstrakcija nukleinske kiseline za pozitivnu kontrolu izvršena je pomoću komercijalnog kita za ekstrakciju *GeneJET Genomic DNA Purification Kit 250 preps* (*Thermo Fisher Scientific*, SAD), prema uputstvu proizvođača, na prethodno opisan način. Kao negativna kontrola u PCR smešu je dodata sterilna destilovana voda umesto nukleinske kiseline.

4.5.2. Pozitivna i negativna kontrola u serološkim ispitivanjima

Kao pozitivna kontrola u serološkom ispitivanju korišćen je serum psa pozitivnog na prisustvo antitela protiv *C. burnetii* dobijen iz *Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail - Anses, Laboratoire de Sophia Antipolis* (Francuska), zahvaljujući dr *Karim Sidi-Boumedine*. Kao negativna kontrola korišćen je serum sigurno zdravog vlasničkog psa pre polne zrelosti, starosti šest meseci.

4.6. MOLEKULARNA ISPITIVANJA

4.6.1. Metoda *Trans*-PCR („*touchdown*“ PCR)

Molekularna identifikacija *C. burnetii* u ekstrahovanoj DNK iz uzoraka krpelja i reproduktivnih tkiva pasa vršena je primenom lančane reakcije polimeraze *Trans*-PCR („*touchdown*“ PCR) kojom se umnožava IS1111 fragment ponavljajućeg regiona sličnog transpozonu (*Berri i sar.*,

2000). Fragment IS1111 se javlja u više kopija u genomu *C. burnetii*, zbog čega ovaj metod ima višu osetljivost u odnosu na metode koje otkrivaju gene koji se javljaju u jednoj kopiji u genomu. Primena ovog metoda pokazala je veću specifičnost i osetljivost u odnosu na druge metode za otkrivanje *C. burnetii* u različitim uzorcima. Efikasnost otkrivanja *C. burnetii* je znatno poboljšana, što je naročito značajno za primenu u kliničkim uzorcima. Protokol „touchdown“ podrazumeva program u kom se temperatura hibridizacije postepeno spušta za po jedan stepen u svakom narednom ciklusu, dok se ne dostigne izračunata temperatura topljenja prajmera. Početna temperatura hibridizacije treba da je nekoliko stepeni viša od izračunate temperature topljenja prajmera. Nakon toga se ciklus nastavlja na postignutoj temperaturi hibridizacije.

Najpre je izvršeno ispitivanje zbirnih uzoraka krpelja, a kada su dobijene trake odgovarajuće veličine izvršeno je ispitivanje prisustva DNK *C. burnetii* i u pojedinačnim uzorcima krpelja, koji su se nalazili u okviru pozitivnih zbirnih uzoraka.

4.6.2. Priprema smeše za reakciju

PCR reakcija je izvedena na 10 µl svakog uzorka ekstrahovane DNK, u konačnoj zapremini smeše od 25 µl. Konačna mešavina sastojala se od 2 µM svakog prajmera, 200 µM svakog dNTP, 3 mM MgCl₂ i 0,5 U *Taq* DNA polimeraze (*Termo Fisher Scientific, SAD*).

U reakciji su korišćeni prajmeri – oligonukleotidne sekvence *Trans-1* (*forward* prajmer) i *Trans-2* (*reverse* prajmer) čiji je redosled nukleotida prikazan u tabeli 1. Korišćene oligonukleotidne sekvence daju fragment dužine 687 bp (*Hoover i sar., 1992*) koji je specifičan za ponavljajući region sličan transpozonu – IS1111.

Tabela 1. Redosled nukleotida oligonukleotidnih sekvenci – prajmera korišćenih za izvođenje lančane reakcije polimeraze

Naziv prajmera	Redosled nukleotida
<i>Trans-1 (forward)</i>	5'-TAT GTA TCC ACC GTA GCC AGT C-3'
<i>Trans-2 (reverse)</i>	5'-CCC AAC AAC ACC TCC TTA TTC-3'

4.6.3. Lančana reakcija polimeraze - PCR

Umnožavanje specifičnih fragmenata DNK dužine 687 bp, izvršeno je u aparatu *Mastercycler® ep gradient S* (Eppendorf, Nemačka). Parametri izvođenja *Trans*-PCR reakcije prikazani su u tabeli 2.

Da bi se verifikovala ponovljivost rezultata PCR reakcije su izvođene dva puta na svakom uzorku.

Tabela 2. Parametri izvođenja *Trans*-PCR reakcije

	Početna denaturacija	95 °C, 60 s
	denaturacija	95 °C, 30 s
5 ciklusa	hibridizacija^a	66-61 °C, 60 s
	Ekstenzija	72 °C, 60 s
	denaturacija	94 °C, 30 s
35 ciklusa	hibridizacija	61 °C, 30 s
	ekstenzija	72 °C, 60 s
	Završna ekstenzija	72 °C, 10 min.

^a Temperatura je snižavana za po 1 °C u svakom narednom ciklusu u okviru pet uzastopnih ciklusa.

4.6.4. Elektroforeza i vizuelizacija PCR proizvoda

Vizuelizacija dobijenih PCR proizvoda vršena je primenom metode horizontalne elektroforeze u agaroznom gelu. Agarozni gel je pripremljen rastvaranjem čiste agaroze (*Serva*, Nemačka) u 1x TBE puferu (*Thermo Scientific*, SAD) u konačnoj koncentraciji 1%. Rastvorena agarozna je zagrevana u mikrotalasnoj pećnici u trajanju 5 min. Za vizuelizaciju molekula DNK korišćena je boja *Midori Green DNA Stain* (*NIPPON Genetics EUROPE, GmbH*, Nemačka) koja je dodata direktno u gel. Nakon laganog mešanja, gel sa bojom je razliven u kadicu za elektroforezu, u koju su prethodno postavljeni češljevi za formiranje bunarčića i ostavljen je da se ohladi na sobnoj temperaturi. Kada je gel očvrsnuo, češljevi su izvađeni, a gel postavljen u sistem za elektroforezu i preliven rastvorom 1x TBE pufera (*Thermo Scientific*, SAD) do oznake na zidu sistema. U bunarčiće u gelu unošene su smeše sačinjene od 10 µl PCR proizvoda i 2 µl boje *DNA Gel Loading Dye (6x)* (*Thermo Scientific*, SAD). Prilikom svakog puštanja elektroforeze, pored ispitivanih uzoraka, u bunarčiće su unošene pozitivna i negativna kontrola. Kao pozitivna kontrola korišćena je DNK ekstrahovana iz celih ćelija faze I *C. burnetii* namenjenih za izvođenje reakcije vezivanja komplementa (*Bioveta a.s. International*, Češka), a kao negativna kontrola korišćena je sterilna destilovana voda. U početne bunarčiće unesena su 2 µl masenog DNK markera *Mass ruler DNK 100 bp ladder* (*Thermo Scientific*, SAD), koji je takođe prethodno pomešan sa bojom. Elektrode sistema za elektroforezu (*Serva, Bluepower 500, GmbH*, Nemačka) spojene su sa jedinicom za napajanje i elektroforeza je izvršena pri naponu 100 V, u trajanju 40 min. Nakon završene elektroforeze, gel je pažljivo izvađen iz kadice i postavljen pod UV svetlo transiluminatora (*Vilber Lourmat*, Nemačka), radi vizuelizacije PCR proizvoda. Umnožene sekvence su vizuelno identifikovane na gelu kao trake definisane dužine 687 bp i fotografisane.

4.6.5. Prečišćavanje dobijenog proizvoda

Umnožene sekvence prečišćene su pomoću komercijalnog kita za prečišćavanje *GeneJET™ PCR Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, SAD)* prema uputstvu proizvođača.

Postupak prečišćavanja umnoženih sekvenci obuhvatao je sledeće korake:

1. Vezujući pufer je dodat u razmeri 1:1 sa PCR proizvodom i promešan na vibracionoj mešalici. Rastvor je pokazivao žutu boju, što je pokazatelj toga da je pH optimalna za dalju reakciju vezivanja DNK.
2. Rastvor je prenet u *GeneJet Purification* kolonu i centrifugiran 30 s. Nakon centrifugiranja filtrirani sadržaj je odbacivan.
3. U narednom koraku u kolonu je dodato 700 µl pufera za ispiranje (u koji je na početku rada dodat 96-100% etanol prema uputstvu proizvođača) i centrifugirano 30 s. Nakon centrifugiranja filtrirani sadržaj je odbacivan.
4. Prazna kolona je ponovo centrifugirana u trajanju 60 s da bi se u potpunosti uklonio eventualno preostali pufer.
5. Kolona je potom prenet u novu, sterilnu mikroeprevetu zapremine 1,5 ml. Zatim je na membranu kolone dodato 50 µl pufera za ispiranje i sadržaj je centrifugiran u trajanju 60 s.
6. Kolona je odbačena, a filtrirani sadržaj je podeljen na dva dela u sterilne mikroeprevete, propisno upakovan i poslat na sekvenciranje.

4.6.6. Sekvenciranje i tumačenje rezultata sekvenciranja

Sekvenciranje je izvršeno u oba smera korišćenjem usluga komercijalnog servisa za sekvenciranje (*Macrogen, Europe*). Za sekvenciranje su korišćene prethodno navedene oligonukleotidne sekvence za izvođenje

Trans-PCR reakcije. Dobijene sekvence su obrađene i analizirane korišćenjem softvera *BioEdit* (Hall, 1999) i *MEGA 7.0* (Kumar i sar., 2016) i upoređene sa odgovarajućim analognim sekvencama deponovanim u Banci gena (*GeneBank*), korišćenjem osnovnog pretraživača za upoređivanje sekvenci (*Basic Local Alignment Search Tool - BLAST*) u cilju utvrđivanja stepena sličnosti između njih.

4.7. SEROLOŠKA ISPITIVANJA

4.7.1. Komercijalni indirektni ELISA kit (*PrioCHECK™ Ruminant Q fever Ab Plate Kit, LSIVet™, Francuska*)

Za utvrđivanje prisustva antitela protiv *C. burnetii* u serumu ispitanih pasa korišćen je komercijalni ELISA kit namenjen za preživare (*PrioCHECK™ Ruminant Q fever Ab Plate Kit, LSIVet™, Francuska*), koji se zasniva na principu indirektno imunoenzimske metode.

Pojedinačne trake od po osam bunarčića su obložene antigenima faze I i faze II *C. burnetii*. Antigen potiče od soja koji je izolovan iz ovaca koje su pobacile, od strane Francuskog nacionalnog instituta za istraživanja u poljoprivredi (*L'Institut national de la recherche agronomique - INRA*). Validacija od strane *INRA* i *in-house* validacija, pokazale su da ovaj soj ima veću osetljivost za otkrivanje pozitivnih životinja od ELISA kitova koji kao antigen koriste fazu I i fazu II *Nine Mile* soja *C. burnetii* poreklom iz krpelja.

Ispitivani uzorci i kontrolni serumi se nanose na dno bunarčića obloženih antigenom *C. burnetii*, pri čemu se specifična anti-*C. burnetii* antitela vezuju za antigen na dnu bunarčića. Nakon ispiranja bunarčića dodaje se konjugat sa G-proteinom obeleženim peroksidazom (*HRP - horse radish peroxidase*), koji se vezuje za antitela koja su se prethodno specifično vezala za antigene na dnu bunarčića. Nakon ispiranja eliminiše se višak nevezanog konjugata i dodaje se hromogeni supstrat. Plava boja je

posledica oksidacije supstrata HRP-konjugatom. Dodavanjem rastvora za zaustavljanje reakcije boja reakcije postaje žuta. Rezultati se potom očitavaju na ELISA čitaču, pri čemu je intenzitet žute boje u pozitivnim uzorcima direktno proporcionalan količini specifičnih antitela u uzorku.

4.7.2. Modifikacija komercijalnog indirektnog ELISA testa i šah titracija

Konjugat sa G-proteinom obeleženim peroksidazom (*HRP - horseradish peroxidase*) zamenjen je antitelima usmerenim protiv imunoglobulina G klase pasa (*Anti-Dog IgG (whole molecule) - Peroxidase antibody produced in rabbit, Sigma-Aldrich, SAD*).

Optimalno razređenje seruma i anti-antitela konjugovanih peroksidazom (*Anti-dog IgG whole molecule - Peroxidase antibody produces in rabbit, Sigma Aldrich, SAD*) određeni su šah titracijom. Za optimizaciju testa, kao pozitivna kontrola u serološkom testiranju korišćen je serum psa pozitivnog na prisustvo antitela protiv *C. burnetii*. Pozitivan serum je testiran u razređenjima 1/100, 1/200 i 1/400, a konjugovana anti-antitela u razređenjima 1/10.000, 1/20.000 i 1/25.000. Svi uzorci su testirani u duplikatu. Kao optimalne vrednosti uzete su one kod kojih je odnos srednje vrednosti očitanih optičkih gustina (*optical density - OD*) pozitivne i negativne kontrole >2 , pri čemu je OD pozitivne kontrole $>0,400$.

Svi ostali koraci su rađeni prema uputstvu proizvođača, sa hemikalijama obezbeđenim u okviru komercijalnog kita.

Postupak izvođenja modifikovanog ELISA testa obuhvatao je sledeće korake:

1. Ispitivani serumi, pozitivna i negativna kontrola razređeni su rastvorom za razređenje seruma u konačnom odnosu 1/200 i naneseni na dno bunarčića. Svi uzorci, kao i pozitivna i negativna kontrola su ispitivani u

duplikatu. Nakon nanošenja uzoraka, ploče su lagano promešane, pokrivene aluminijumskom folijom i ostavljene u termostat da se inkubiraju na temperaturi 37 °C u trajanju od 1 sat.

2. Nakon inkubacije sadržaj ploča je odbačen, a potom su bunarčići ploča tri puta ispirani rastvorom za ispiranje (koji je na početku rada razređen sterilnom dejonizovanom vodom prema uputstvu proizvođača). Prilikom ispiranja na dno svakog bunarčića je naneto po 300 µl rastvora za ispiranje.
3. Anti-antitela su najpre razređena rastvorom za konjugat iz kita u konačnom odnosu 1/25.000. Zatim je dodato po 100 µl konjugata na dno svakog bunarčića. Ploče su lagano promešane, pokrivene aluminijumskom folijom i ostavljene u termostat da se inkubiraju na temperaturi 37 °C u trajanju od 1 sat.
4. Nakon inkubacije sadržaj ploča je odbačen, a potom su bunarčići ploča tri puta ispirani rastvorom za ispiranje (koji je na početku rada razređen sterilnom dejonizovanom vodom prema uputstvu proizvođača). Prilikom ispiranja na dno svakog bunarčića je naneto po 300 µl rastvora za ispiranje.
5. U svaki bunarčić je potom dodato po 100 µl C-supstrata. Ploče su lagano izmešane i ostavljene nepokrivene, na tamno mesto, da se inkubiraju na sobnoj temperaturi (21±4 °C) u trajanju 10 min.
6. U sledećem koraku u svaki bunarčić je dodato po 100 µl rastvora za zaustavljanje reakcije istim redosledom kao što je dodavan i C-supstrat i ploče su lagano izmešane.
7. Reakcija, odnosno optička gustina, je očitavana na talasnoj dužini 450 nm na aparatu *Multiskan Thermo Scientific* (*Thermo Fisher Scientific*, SAD) u roku od 5 min od zaustavljanja reakcije.

4.8. LOKACIJE I INSTITUCIJE GDE SU ISTRAŽIVANJA SPROVEDENA

Istraživanja u okviru ove doktorske disertacije su sprovedena u sledećim institucijama i laboratorijama:

1. Na Katedri za hirurgiju, ortopediju i oftalmologiju i Katedri za porodiljstvo Fakulteta veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu, gde je sprovedeno uzorkovanje materijala poreklom od nevlasničkih pasa (krv, reproduktivna tkiva – materice, jajnici i semenici i krpelji).
2. U laboratoriji Katedre za zarazne bolesti životinja i bolesti pčela Fakulteta veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu, gde je sprovedena obrada uzoraka krvi i reproduktivnih tkiva poreklom od nevlasničkih pasa, zatim ekstrakcija nukleinske kiseline iz uzoraka reproduktivnih tkiva i krpelja poreklom od nevlasničkih pasa, kao i serološka ispitivanja.
3. U laboratoriji Katedre za parazitologiju Fakulteta veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu, gde je urađena morfološka identifikacija i determinacija krpelja, kao i obrada krpelja i priprema za ekstrakciju nukleinske kiseline.
4. U laboratoriji Katedre za mikrobiologiju Fakulteta veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu, gde su izvršena molekularna istraživanja (lančana reakcija polimeraze i elektroforeza).
5. U komercijalnom servisu za sekvenciranje – *Macrogen, Europe*, gde je urađeno sekvenciranje umnoženih DNK sekvenci.

4.9. STATISTIČKA OBRADA REZULTATA

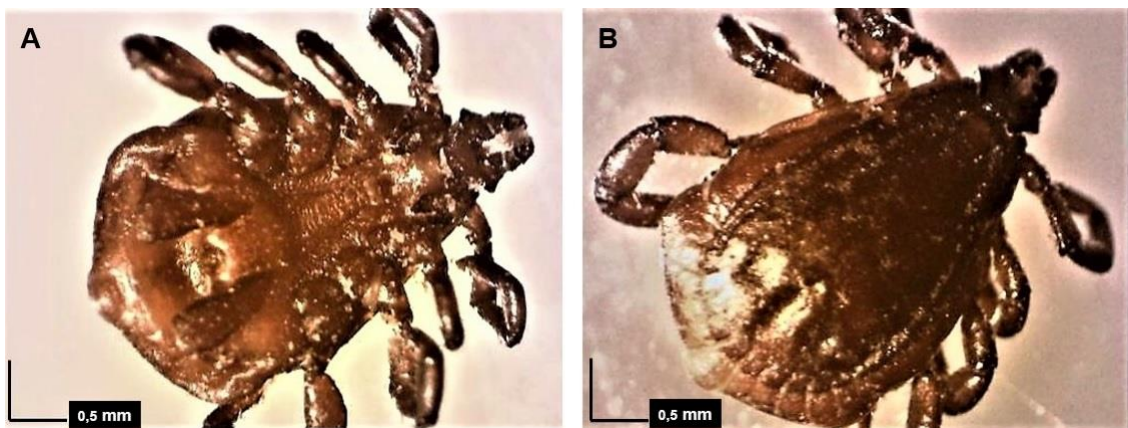
Rezultati su statistički obrađeni u programu *IBM SPSS Statistics 21*. Za analizu dobijenih rezultata upotrebljene su deskriptivne statističke metode, *Pearson-ov* χ^2 test i *Kappa* statistička analiza. Rezultati su predstavljeni tabelarno, slikama i grafikonima.

5. REZULTATI

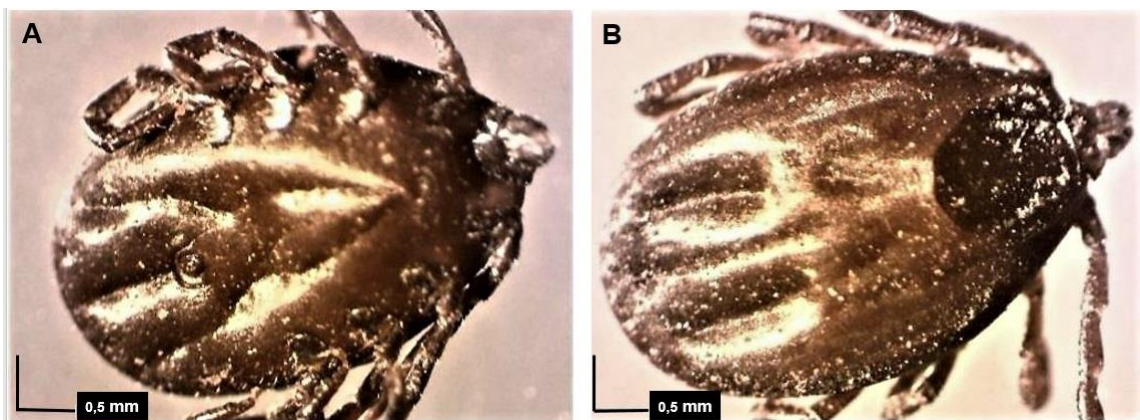
5.1. REZULTATI MORFOLOŠKE IDENTIFIKACIJE I DETERMINACIJE KRPELJA POREKLOM SA ISPITIVANIH PASA

U ovom istraživanju identifikovane su tri vrste krpelja poreklom sa nevlasničkih pasa: *Rhipicephalus sanguineus* (*R. sanguineus*) - braon pseći krpelj, *Ixodes ricinus* (*I. ricinus*) i *Dermacentor reticulatus* (*D. reticulatus*).

U okviru vrste *R. sanguineus* ustanovljena su sva tri stadijuma - adulti (mužjaci i ženke) i preadultni stadijumi - lutke i larve (slika 1, 2, 3). Uzorci su imali sledeće morfološke karakteristike: baza kapituluma šestougaoanog oblika, sa oštrim lateralnim uglovima, kratke palpe i rostrum (slika 4A), a širok prostor između *area porosa*; genitalni otvor ženki sa ventralne strane, oblika proširenog latiničnog slova „U“, peritrema sa zašiljenim krajem, oblika zapete; posteriorna margina dorzalnog štita (*scutum*) ženki, larvi i lutki jasno sinusoidnog oblika (sa jasnom konkavnom krivinom posteriorno iza očiju) koji zauzima jednu trećinu tela (slika 2B, 3A), dok kod mužjaka prekriva celu dorzalnu površinu tela (slika 1B); na ventralnoj strani mužjaka par velikih adanalnih štitića (slika 1A, 5B); posteriorni žlebovi na dorzalnom štitu (tri žleba) mužjaka jasno izraženi, duboki i naborane strukture, a lateralni žlebovi glatke strukture (slika 1B); kaudalni produžetak na zadnjoj strani tela prisutan kod nasisanih mužjaka u vidu ispupčenja (slika 1A, 5B); punktacije koje po rasporedu odgovaraju vrsti, prisutne na dorzalnom štitu svih stadijuma.



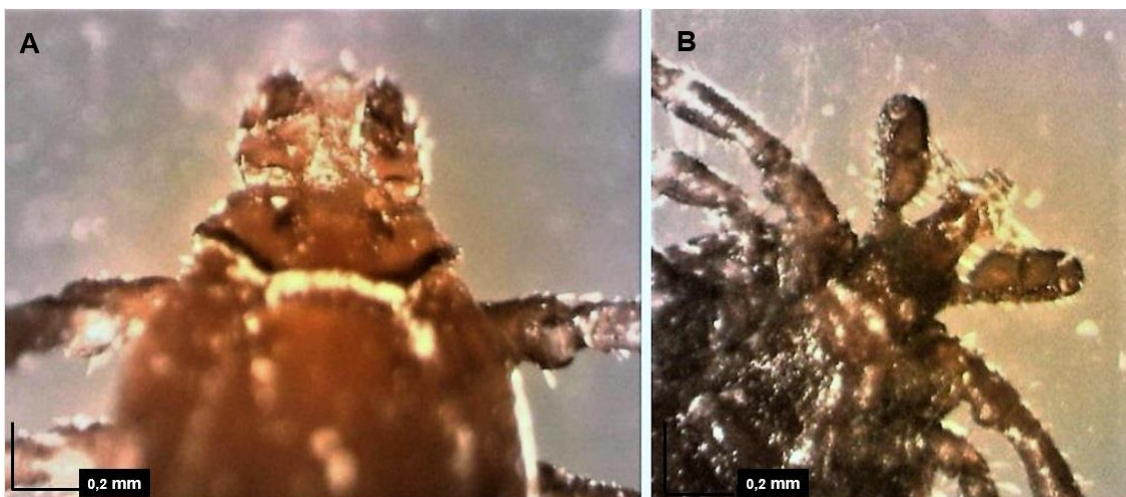
Slika 1. Nasisani mužjak *R. sanguineus* – ventralna (A) i dorzalna strana (B)



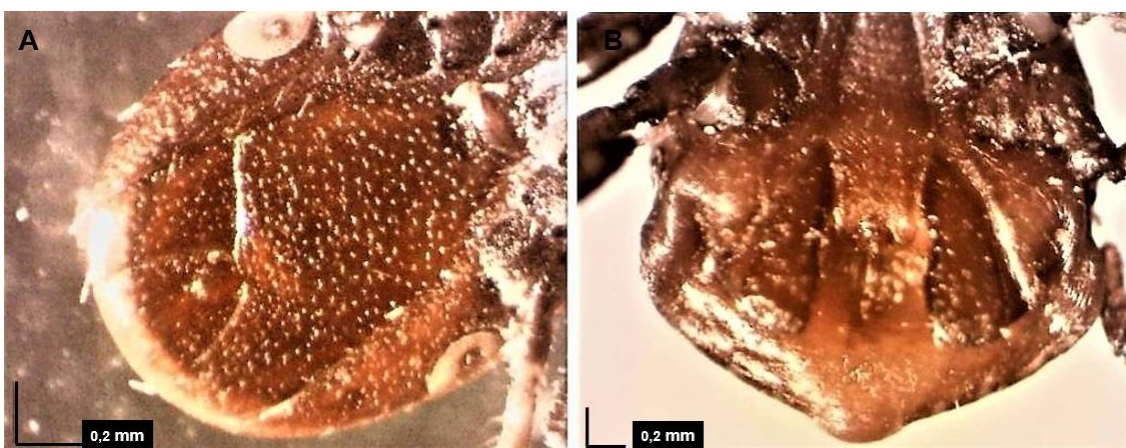
Slika 2. Nasisana ženka *R. sanguineus* – ventralna (A) i dorzalna strana (B)



Slika 3. Nasisana lutka *R. sanguineus* – dorzalna (A) i ventralna strana (B)



Slika 4. Kapitulum mužjaka *R. sanguineus* (A); kapitulum mužjaka *I. ricinus* (B)

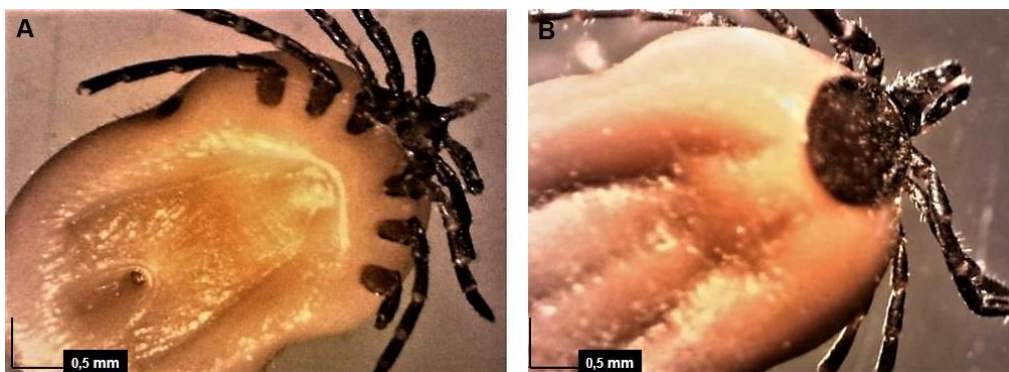


Slika 5. Ventralna strana i trbušni štitići mužjaka *I. ricinus* (A); ventralna strana, trbušni štitići i kaudalni nastavak mužjaka *R. sanguineus* (B)

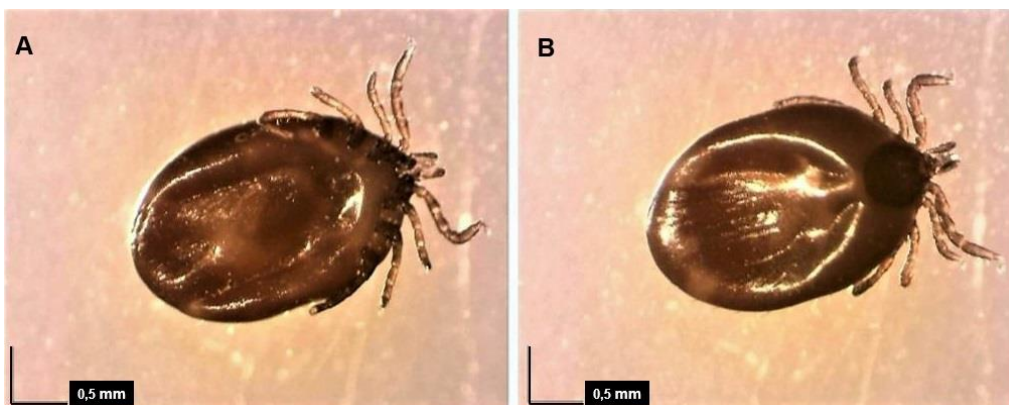
Ustanovljeno je 228 krpelja vrste *R. sanguineus* od toga 40 ženki, 51 mužjak, 130 lutki i 7 larvi. Svi krpelji vrste *R. sanguineus* bili su delimično ili potpuno nasisani.

U okviru vrste *I. ricinus* ustanovljeni su adulti (mužjaci i ženke) i preadultni stadijum lutke (slika 6, 7, 8). Uzorci su imali sledeće morfološke karakteristike: baza kapituluma petougaoanog oblika, usni aparat dug, palpe duge (slika 4B); ne poseduju oči; kokse prvog para ekstremiteta zašiljene,

nastavci dugi i pokrivaju koksnu drugog para ekstremiteta; genitalni otvor između četvrtog para ekstremiteta (slika 6A, 9A, 9B); analna brazda karakteristična za pripadnike grupe Prostriata, okružuje analni otvor sa prednje strane; skapularni žlebovi (dva) i sete na dorzalnom štitu; tanke sete na *alloscutum*-u; posteriorna margina dorzalnog štita ženki i preadultnih razvojnih stadijuma blago sinusoidnog oblika, prekriva jednu trećinu površine tela (slika 6B, 7B), kod mužjaka pokriva celu površinu tela (slika 8B); punktacije štita svih stadijuma; genitalni otvor mužjaka između koksi trećeg para ekstremiteta; na ventralnoj strani mužjaka dva para trbušnih štitića (adanalni, epimeralni) i tri neparna štitića (analni, genitoanalni, pregenitalni) (slika 8A, 5A).



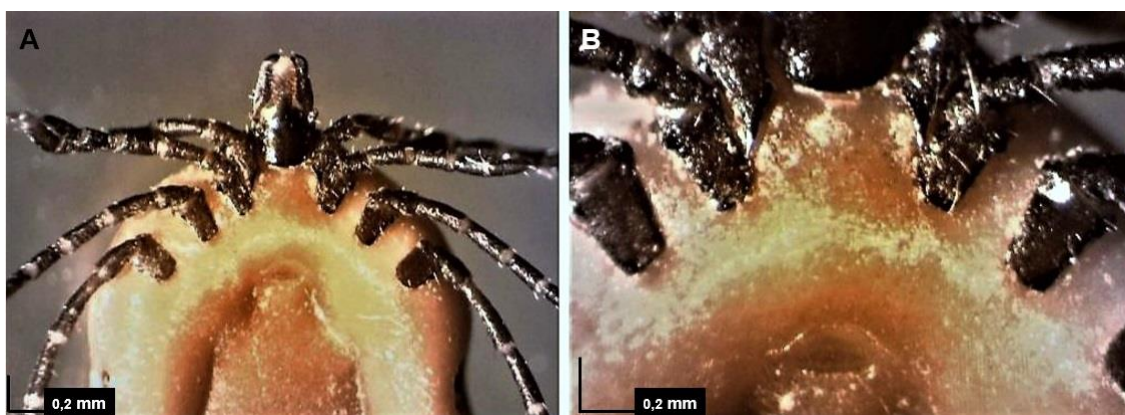
Slika 6. Nasisana ženka *I. ricinus* – ventralna (A) i dorzalna strana (B)



Slika 7. Nasisana lutka *I. ricinus* – ventralna (A) i dorzalna strana (B)



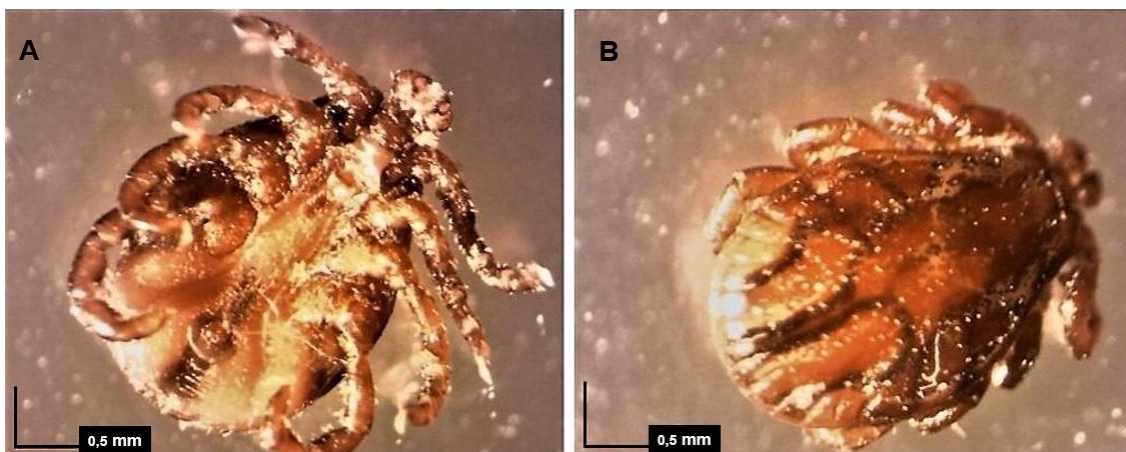
Slika 8. Nasisani mužjak *I. ricinus* – ventralna (A) i dorzalna strana (B)



Slika 9. Otvoren genitalni otvor ženke *I. ricinus* (A, B)

Ustanovljeno je 87 krpelja vrste *I. ricinus* i to 33 ženke, 44 mužjaka i 10 lutki. Svi krpelji vrste *I. ricinus* bili su delimično ili potpuno nasisani.

U okviru vrste *D. reticulatus* ustanovljen je samo jedan mužjak. Uzorak je imao sledeće morfološke karakteristike: baza kapituluma četvorougaoanog oblika, kratki rostrum i palpe, *area porosa* okruglog oblika; na zadnjoj strani baze kapituluma duge *cornua*-e; usek na koksama prvog para ekstremiteta, nastavci zašiljeni i dugi; lateralni žlebovi na dorzalnom štitu u formi punktacija, nisu duboki; dorzalni štit sa punktacijama i emajliranim pigmentom, na zadnjem kraju festoni; odsustvo trbušnih štitića (slika 10).



Slika 10. Nasisani mužjak *D. reticulatus* – ventralna (A) i dorzalna strana (B)

5.2. REZULTATI DISTRIBUCIJE KRPELJA POREKLOM SA ISPITIVANIH PASA

Krpelji su sakupljeni sa 51 ne vlasničkog psa (40 ženki i 11 mužjaka) od ukupno 105 ispitanih pasa. Zastupljenost pasa koji su imali krpelje u odnosu na pol prikazana je u tabeli 3.

Tabela 3. Zastupljenost pasa koji su imali krpelje u odnosu na pol ispitanih pasa

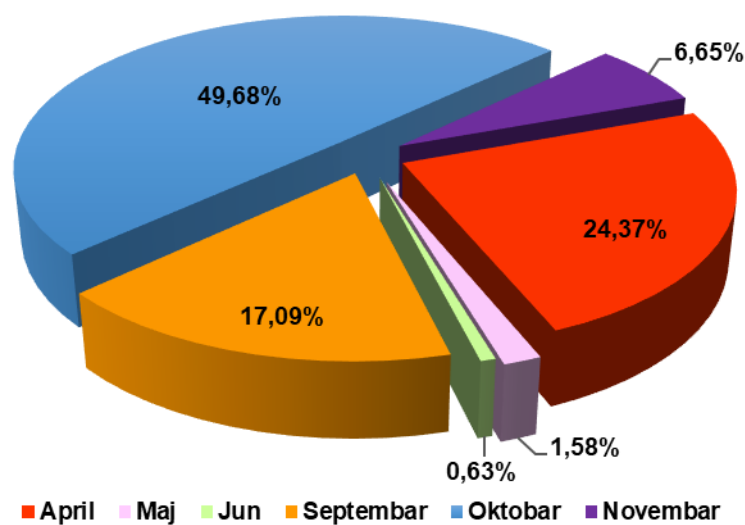
		Prisustvo krpelja na psima		Ukupan broj ispitanih pasa
		nema	ima	
Mušjaci	Broj	20	11	31
	% u okviru pola	64,5%	35,5%	100,0%
Ženke	Broj	34	40	74
	% u okviru pola	45,9%	54,1%	100,0%
Ukupno	Broj	54	51	105
	% u okviru pola	51,4%	48,6%	100,0%

Primenom *Pearson*-ovog χ^2 testa nezavisnosti ustanovljeno je da nema statističke značajnosti između pola pasa i prisustva krpelja na njima ($\chi^2=3,106$, $df=1$, $p=0,082$; $p>0,05$).

U istraživanju je sakupljeno ukupno 316 krpelja, a broj krpelja po životinji iznosio je od 1-42. Najviše krpelja je sakupljeno u oktobru i to čak 49,68% (157/316), a najmanje u junu, svega 0,63% (2/316). Zastupljenost sakupljenih krpelja prema mesecu uzorkovanja prikazana je u tabeli 4 i na grafikonu 1.

Tabela 4. Zastupljenost krpelja poreklom sa nevlasničkih pasa i prosečna infestiranost pasa prema mesecu uzorkovanja

Mesec uzorkovanja	Sakupljeni krpelji		Broj pasa sa kojih su uzorkovani krpelji	Prosečna infestacija
	Broj krpelja	%		
April	77	24,37	20	3,85
Maj	5	1,58	3	1,67
Jun	2	0,63	1	2,00
Septembar	54	17,09	6	9,00
Oktobar	157	49,68	15	10,47
Novembar	21	6,65	6	3,5
Ukupno	316	100,00	51	



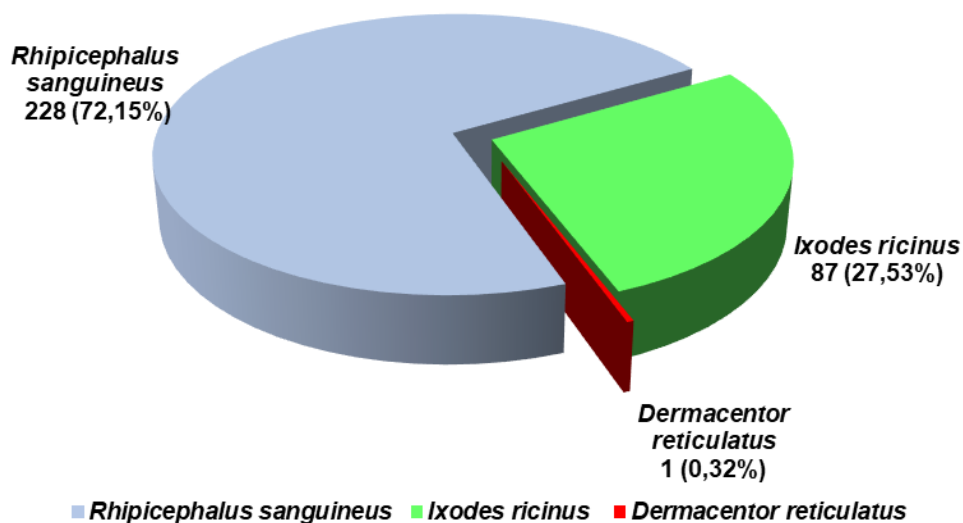
Grafikon 1. Zastupljenost krpelja poreklom sa nevlasničkih pasa prema mesecu uzorkovanja

Od ukupno 316 sakupljenih krpelja 72,15% (228/316) pripadalo je vrsti *R. sanguineus*, 27,53% (87/316) vrsti *I. ricinus*, a 0,32% (1/316) vrsti *D. reticulatus*, što je prikazano u tabeli 5 i na grafikonu 2.

Samo na dva psa su ustanovljene različite vrste krpelja. Na jednom psu su ustanovljeni krpelji vrsta *R. sanguineus* i *I. ricinus*, a na drugom psu *I. ricinus* i *D. reticulatus*.

Tabela 5. Zastupljenost ustanovljenih vrsta krpelja poreklom sa nevlasničkih pasa

Vrsta krpelja	Broj	%
<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	228	72,15
<i>Ixodes ricinus</i>	87	27,53
<i>Dermacentor reticulatus</i>	1	0,32
Ukupno	316	100,00

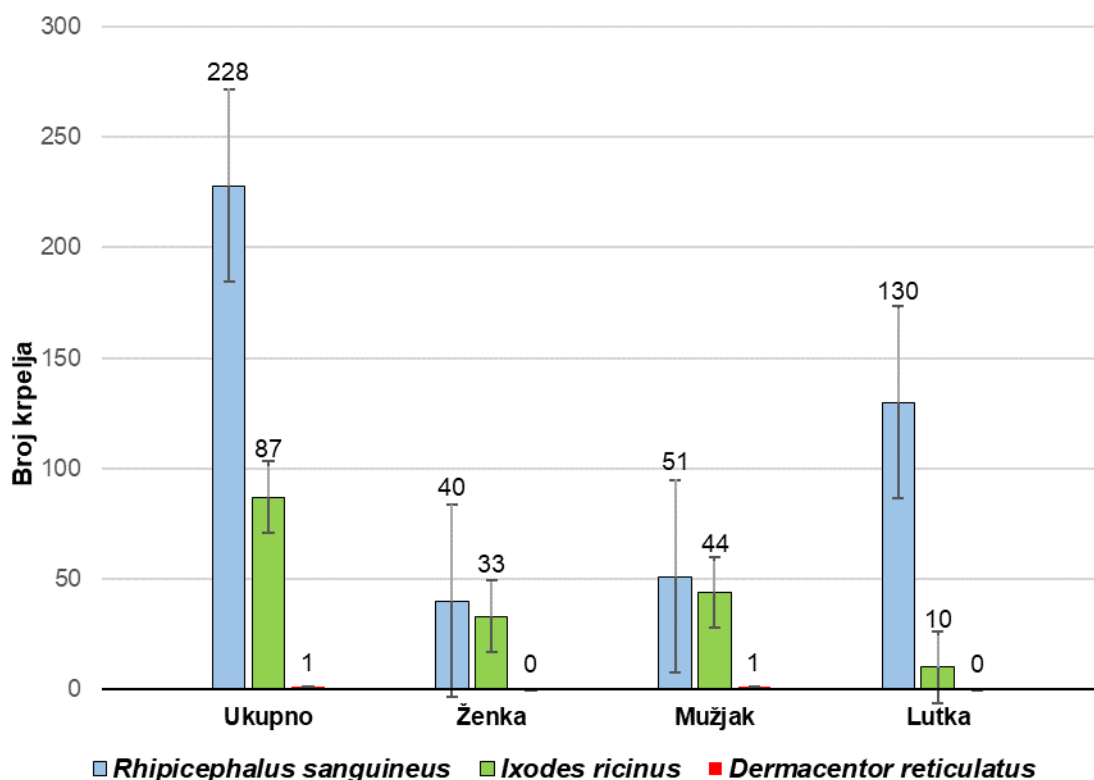


Grafikon 2. Zastupljenost ustanovljenih vrsta krpelja poreklom sa ne vlasničkih pasa

Zastupljenost razvojnih stadijuma u okviru vrsta sakupljenih krpelja prikazana je u tabeli 6 i na grafikonu 3.

Tabela 6. Zastupljenost razvojnih stadijuma u okviru vrsta sakupljenih krpelja

Vrsta krpelja		Razvojni stadijum krpelja				Ukupno
		Ženka	Mužjak	Lutka	Larva	
<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Broj	40	51	130	7	228
	% u okviru vrste	17,54	22,37	57,02	3,07	100,00
<i>Ixodes ricinus</i>	Broj	33	44	10	0	87
	% u okviru vrste	37,93	50,58	11,49	0	100,00
<i>Dermacentor reticulatus</i>	Broj	0	1	0	0	1
	% u okviru vrste	0	100,00	0	0	100,00



Grafikon 3. Zastupljenost razvojnih stadijuma u okviru vrsta sakupljenih krpelja

5.3. REZULTATI MOLEKULARNIH ISPITIVANJA PRISUSTVA DNK *C. BURNETII* U KRPELJIMA POREKLOM SA ISPITIVANIH PASA

Svi uzorci krpelja ispitani su na prisustvo IS1111 regiona *C. burnetii* primenom metode *Trans*-PCR. Prvobitno je izvršeno ispitivanje zbirnih uzoraka krpelja. Nakon dobijanja umnoženih sekvenci u zbirnim uzorcima krpelja, pristupilo se analizi svih pojedinačnih krpelja koji su se nalazili u okviru pozitivnih zbirnih uzoraka. Umnožene specifične sekvence vizuelizovane su na agaroznom gelu kao trake dužine ~687 bp što je prikazano na slici 11. Od ukupno 316 uzoraka krpelja, umnožena su 24 proizvoda poreklom iz krpelja vrste *R. sanguineus*.



Slika 11. Linija 1, 16 - DNA ladder *Mass ruler DNK 100 bp ladder* (*Thermo Scientific, SAD*) (100 bp); linija 2 - pozitivna kontrola; linija 15 - negativna kontrola; linije 3, 4, 5, 6, 8, 9, 12 - pozitivni uzorci krpelja (umnožene sekvence dužine ~687 bp); linije 7, 10, 11, 13, 14 - negativni uzorci krpelja.

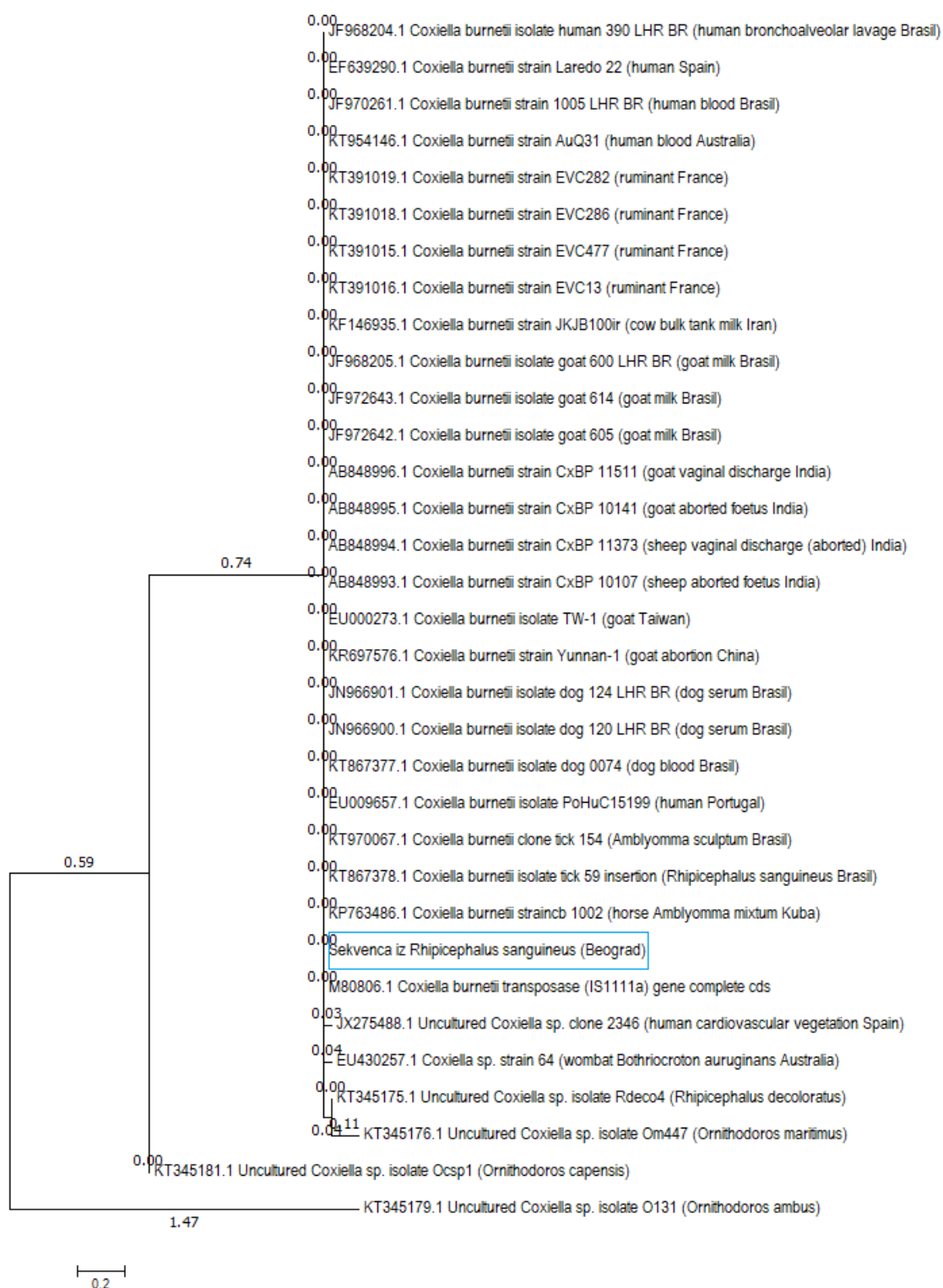
Umnožena DNK 24 uzorka poreklom iz krpelja je prečišćena i izvršeno je sekvenciranje dobijenih fragmenata u oba smera. Zbog prisustva *IS1111* regiona u endosimbiontima krpelja koji su slični *C. burnetii*, svi umnoženi proizvodi su sekvencirani da bi se ustanovilo da li je umnoženi fragment poreklom od endosimbionata ili od *C. burnetii*. Nakon obrade i analize sekvenci dužine 653 bp ustanovljeno je da su sve sekvence poreklom iz krpelja, dobijene u ovom istraživanju, međusobno identične (100% sličnosti). Zbog toga je odabrana jedna sekvenca, kao reprezentativna i upoređena sa odgovarajućim analognim sekvencama *IS1111* regiona *C. burnetii* deponovanim u Banci gena. Poređenje sekvenci pomoću osnovnog pretraživača za upoređivanje sekvenci - BLAST, vršeno je i sa objavljenim sekvencama *IS1111* regiona koje odgovaraju *CLE*, da bi se isključilo prisustvo endosimbionata krpelja u ispitanim uzorcima.

Redosled nukleotida reprezentativne sekvence dobijene iz krpelja prikazan je u tabeli 7.

Tabela 7. Redosled nukleotida reprezentativne sekvence IS1111 regiona
dobijene iz uzoraka krpelja vrste *R. sanguineus*

Redosled nukleotida IS1111 sekvence dobijene iz krpelja
TTAAGGTGGGCTGCGTGGTGATGGAAGCGTGTGGAGGAGCGAACCAT TGGTATCGGACGTTTATGGGGATGGGTATCCCAACGCAGTTGATCAG TCCGCAGCACGTCAAACCGTATGTCAAAGTAACAAGAATGATCGTA ACGATGCGCAGGCGATAGCTGAAGCGGCTTCCCGCGCCTCGATGCGG TTTGTGCAGGGTAAAACGGTGGAAACAACAAGACGTTCAAGCGCTGTT AAAGATACGCGATCGTTTAGTCAAAGCCGCACGGCGCTGATCAATG AGATTCGGGGGTTGTTGCAAGAATACGGACTCACGATGGCGCGTGGT GCCAAGCGATTTTATGAAGAGCTCCCGTTGATTTTAGCGAGCGAAGC GGTGGGATTAACACCGCGGATGAAACGGGTGTTGAATTGTTTGTATA CCGAATTGTTGAACCGGGACGAAGCGATTGGTGATTACGAGGAGGA ATTAAGCGGTGGCAAAGCCAATGAGGATTGTCAACGGGTACAG AGCATCCCGGGGGTGGGTATTAAACGGCGCTCTCGGTTTATGCGAGC GTGGGTGACATTCATCAATTCATCGTTCGCGGCAGTTGTCGGCGTTT ATTGGGTTGGTCCCTCGACAACATTCGAGTGGGAATAAGGAG

Poređenjem sekvenci, ustanovljeno je da sekvence poreklom iz krpelja dobijene u ovom istraživanju poseduju 99-100% sličnosti sa sekvencama IS1111 regiona *C. burnetii* kompletne referentne sekvence M80806, zatim sa sekvencama iz uzoraka krpelja, životinja i ljudi poreklom iz različitih zemalja. Na taj način je potvrđeno da je u ispitanim uzorcima krpelja prisutna DNK *C. burnetii* i isključeno prisustvo *CLE*. Rezultati filogenetske analize upoređenih sekvenci prikazani su na slici 12.



Slika 12. Filogenetsko stablo dobijeno poređenjem reprezentativne sekvence dobijene u ovom istraživanju sa sekvencama IS1111 regiona *C. burnetii* iz uzoraka krpelja, životinja i ljudi

DNK *C. burnetii* ustanovljena je samo u *R. sanguineus* vrsti krpelja, sa ukupnom prevalencijom od 10,53% (24/228). Najveća prevalencija je zabeležena među ženka krpelja, zatim u lutkama i mužjacima ove vrste.

S obzirom na to da su pozitivni uzorci ustanovljeni samo u okviru vrste *R. sanguineus*, prevalencija analizirana po razvojnim stadijumima ove vrste krpelja prikazana je u tabeli 8.

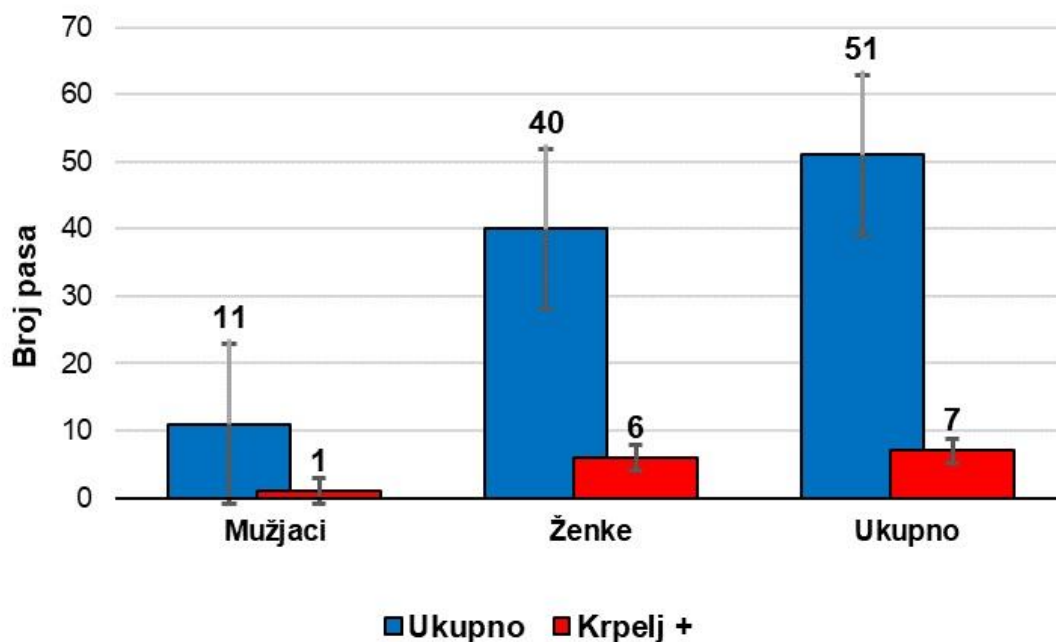
Tabela 8. Zastupljenost krpelja pozitivnih na prisustvo DNK *C. burnetii* u okviru razvojnih stadijuma vrste *R. sanguineus*

Vrste krpelja	Stadijum	Broj	Pozitivno	%
<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Ženka	40	12	30,00
	Mužjak	51	3	5,88
	Lutka	130	9	6,92
	Larva	7	0	0,00
Ukupno		228	24	

Krpelji pozitivni na prisustvo DNK *C. burnetii* poticali su sa jednog mužjaka i šest ženki ispitanih pasa. Zastupljenost pasa infestiranih krpeljima koji su bili pozitivni na prisustvo DNK *C. burnetii* prikazana je u tabeli 9 i na grafikonu 4.

Tabela 9. Zastupljenost pasa infestiranih krpeljima pozitivnim na prisustvo
DNK *C. burnetii*

Pol	Psi koji su na sebi imali		
	Psi koji su na sebi imali krpelje	krpelje pozitivne na prisustvo DNK <i>C. burnetii</i>	%
Ženke	40	6	15,00
Mužjaci	11	1	9,09
Ukupno	51	7	13,73



Grafikon 4. Prikaz broja pasa infestiranih krpeljima pozitivnim na prisustvo
DNK *C. burnetii*

Psi sa kojih su uklonjeni krpelji pozitivni na prisustvo DNK *C. burnetii* na sebi su imali od 2-36 krpelja. Nijedan pas na sebi nije imao sve krpelje pozitivne na prisustvo DNK *C. burnetii*. Pozitivni krpelji nisu ustanovljeni ni kod dva psa koja su na sebi imala različite vrste krpelja.

Zastupljenost krpelja pozitivnih na prisustvo DNK *C. burnetii* prema jedinki sa koje potiču, prikazana je u tabeli 10.

Tabela 10. Zastupljenost krpelja pozitivnih na prisustvo DNK *C. burnetii* prema psu sa kog potiču

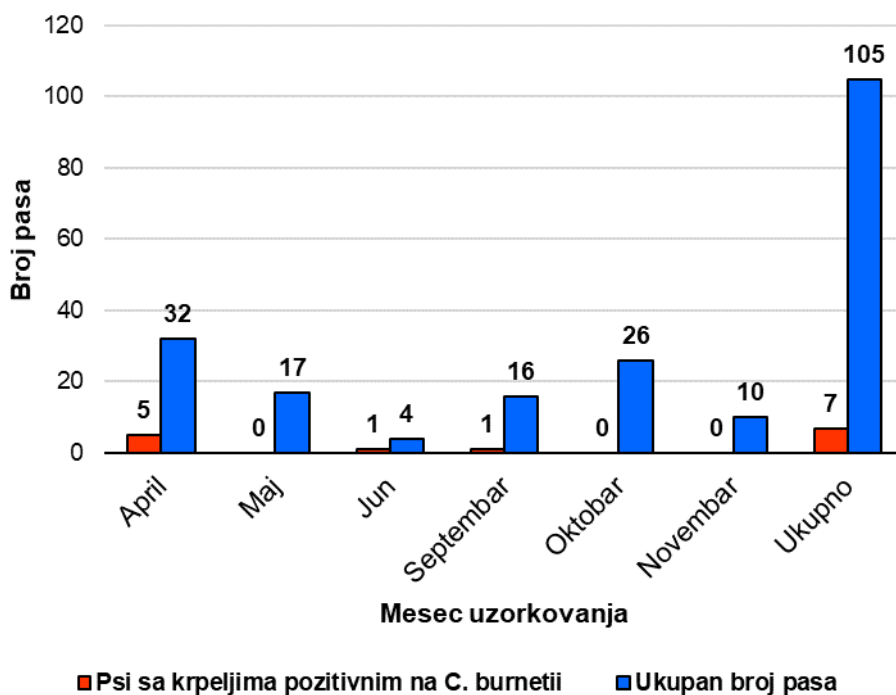
Životinja	Razvojni stadijumi krpelja (pozitivni/ukupan broj krpelja na psu)			
	Ženka	Mužjak	Lutka	Larva
Pas 1 - Ženka	5/5	3/5	0	0
Pas 2 - Mužjak	2/5	0/1	0	0
Pas 3 - Ženka	2/3	0/1	0	0
Pas 4 - Ženka	1/1	0/1	0	0
Pas 5 - Ženka	1/1	0/5	0	0
Pas 6 - Ženka	1/1	0/1	0	0
Pas 7 - Ženka	0	0	9/36	0
Pozitivni	12/16	3/14	9/36	0/0
Ukupno		24/66		

Od sedam pasa koji su na sebi imali krpelje pozitivne na prisustvo DNK *C. burnetii*, sa pet jedinki su krpelji uzorkovani u aprilu, a u junu i septembru su krpelji uzorkovani sa po jednog psa. Krpelji uzorkovani sa pasa u maju, oktobru i novembru nisu bili pozitivni na prisustvo DNK *C. burnetii*.

Prikaz broja pasa sa krpeljima pozitivnim na DNK *C. burnetii* prema mesecu uzorkovanja prikazan je u tabeli 11 i na grafikonu 5.

Tabela 11. Broj pasa sa krpeljima pozitivnim na prisustvo DNK *C. burnetii* po mesecima uzorkovanja

Mesec uzorkovanja	Ukupan broj pasa	Psi sa krpeljima pozitivnim na prisustvo DNK <i>C. burnetii</i>
April	32	5
Maj	17	0
Jun	4	1
Septembar	16	1
Oktobar	26	0
Novembar	10	0
Ukupno	105	7

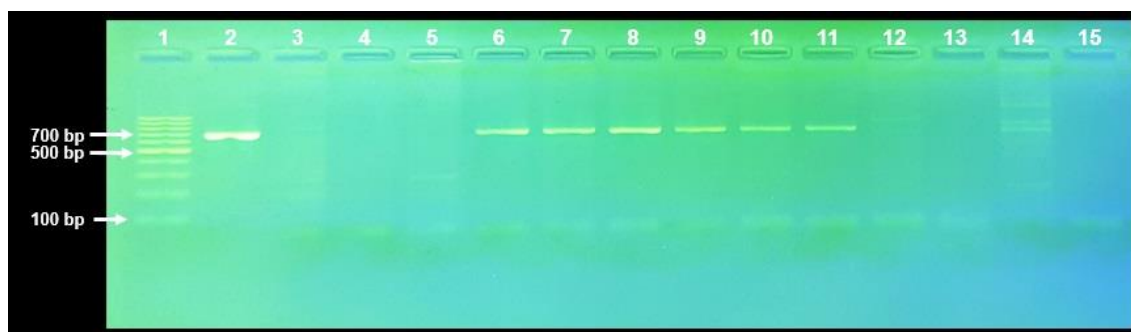


Grafikon 5. Prikaz broja pasa koji su na sebi imali krpelje pozitivne na prisustvo DNK *C. burnetii* po mesecima uzorkovanja

5.4. REZULTATI MOLEKULARNIH ISPITIVANJA PRISUSTVA DNK *C. BURNETII* U REPRODUKTIVNIM TKIVIMA ISPITIVANIH PASA

Reproduktivna tkiva pasa – materice i jajnici ženki, uklonjeni nakon hirurške intervencije sterilizacije, odnosno semenici uklonjeni nakon kastracije mužjaka, sakupljena su od ukupno 105 pasa - 74 ženke (70,48%) i 31 mužjaka (29,52%).

Svi uzorci tkiva ispitani su na prisustvo IS1111 regiona *C. burnetii* primenom metode *Trans*-PCR, a umnožene specifične sekvence vizuelizovane su na agaroznom gelu kao trake dužine ~687 bp što je prikazano na slici 13.



Slika 13. Linija 1 - DNA ladder *Mass ruler DNK 100 bp ladder* (*Thermo Scientific, SAD*) (100 bp); linija 2 - pozitivna kontrola; linija 15 - negativna kontrola; linije 6, 7, 8, 9, 10, 11 - pozitivni uzorci reproduktivnih tkiva pasa (umnožene sekvence dužine ~687 bp); linije 3, 4, 5, 12, 13, 14 - negativni uzorci reproduktivnih tkiva pasa.

Dokazivanje prisustva IS1111 regiona u uzorcima DNK poreklom od ljudi i životinja je specifično za *C. burnetii*, s obzirom na to da razmnožavanje *CLE* nije moguće u kičmenjacima. U ovom istraživanju umnožene su ukupno 22 sekvence poreklom iz reproduktivnih tkiva pasa, a jedna sekvenca je prečišćena i izvršeno je njeno sekvenciranje radi provere dobijenog proizvoda. Poređenjem sekvence iz reproduktivnih tkiva pasa i

krpelja dobijenih u ovom istraživanju, ustanovljeno je da su međusobno identične. Sekvenca je, takođe, upoređena sa odgovarajućim analognim sekvencama IS1111 regiona *C. burnetii* deponovanim u Banci gena poreklom od ljudi, životinja i krpelja i ustanovljena je sličnost od 99-100% sa datim sekvencama.

Redosled nukleotida reprezentativne sekvence dobijene iz uzoraka reproduktivnih tkiva pasa prikazan je u tabeli 12.

Tabela 12. Redosled nukleotida reprezentativne sekvence IS1111 regiona dobijene iz uzoraka reproduktivnih tkiva pasa

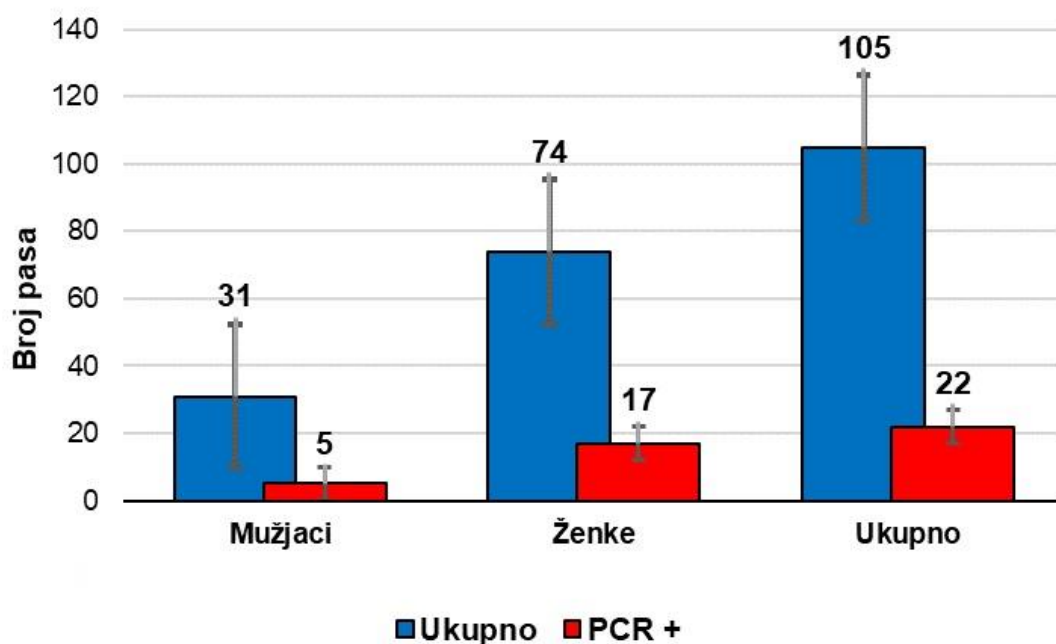
Redosled nukleotida sekvence IS1111 regiona dobijene iz reproduktivnih tkiva pasa
TTAAGTGGGCTGCGTGGTGATGGAAGCGTGTGGAGGAGCGAACCATT GGTATCGGACGTTTATGGGGATGGGTATCCCAAACGCAGTTGATCAG TCCGCAGCACGTCAAACCGTATGTCAAAAGTAACAAGAATGATCGTA ACGATGCGCAGGCGATAGCTGAAGCGGCTTCCCGCGCCTCGATGCGG TTTGTGCAGGGTAAAACGGTGGAAACAACAAGACGTTCAAGCGCTGTT AAAGATACGCGATCGTTTAGTCAAAGCCGCACGGCGCTGATCAATG AGATTCGGGGGTTGTTGCAAGAATACGGACTCACGATGGCGCGTGGT GCCAAGCGATTTTATGAAGAGCTCCCGTTGATTTTAGCGAGCGAAGC GGTGGGATTAACACCGCGGATGAAACGGGTGTTGAATTGTTTGTATA CCGAATTGTTGAACCGGGACGAAGCGATTGGTGATTACGAGGAGGA ATAAAAGCGGTGGCAAAGCCAATGAGGATTGTCAACGGGTACAG AGCATCCCGGGGGTGGGTATTAAACGGCGCTCTCGGTTTATGCGAGC GTGGGTGACATTCATCAATTTATCGTTCGCGCAGTTGTTCGGCGTTT ATTGGGTGGTCCCTCGACAACATTCGAGT

DNK *C. burentii* ustanovljena je kod 20,95% (22/105) pasa. Od ispitanog 31 muškaka, DNK *C. burnetii* je otkrivena u 16,13% (5/31) uzoraka semenika. Od 74 uzorka materica i jajnika DNK *C. burnetii* je ustanovljena u 22,97% (17/74) uzoraka.

Zastupljenost pasa pozitivnih na prisustvo DNK *C. burnetii* u odnosu na pol pasa prikazan je u tabeli 13 i na grafikonu 6.

Tabela 13. Zastupljenost pasa pozitivnih na prisustvo DNK *C. burnetii*

		PCR tkiva		Ukupno	
		negativno	pozitivno		
Pol	muški	Broj pasa	26	5	31
		% u okviru pola	83,9%	16,1%	100,0%
Pol	ženski	Broj pasa	57	17	74
		% u okviru pola	77,0%	23,0%	100,0%
Ukupno		Broj pasa	83	22	105
		% u okviru pola	79,0%	21,0%	100,0%



Grafikon 6. Zastupljenost pasa pozitivnih na prisustvo DNK *C. burnetii*

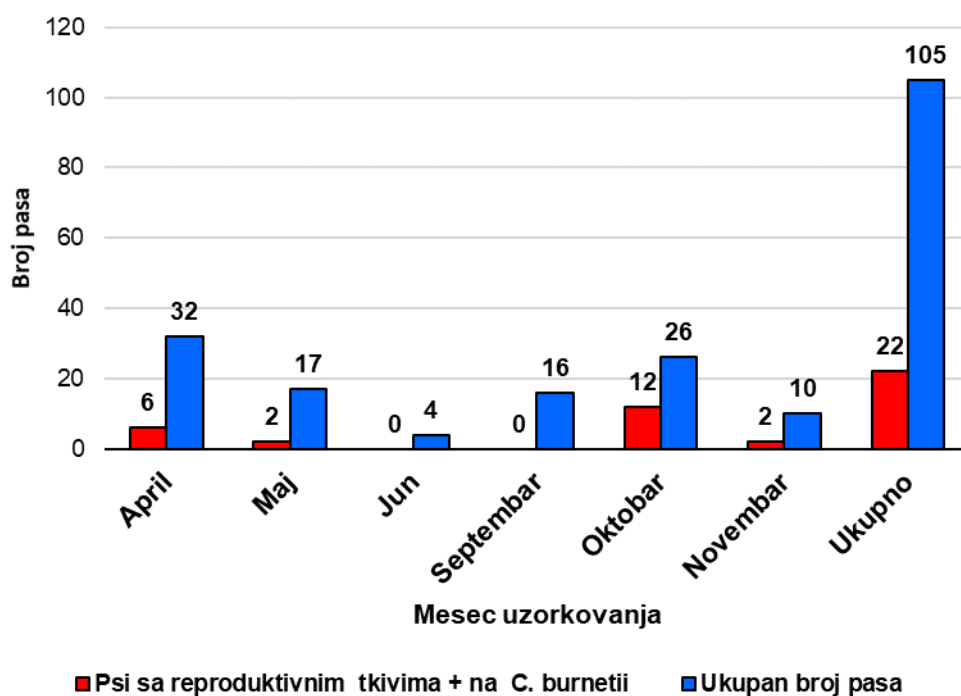
Primenom *Pearson*-ovog χ^2 testa nezavisnosti ustanovljeno je da nema statističke značajnosti između pola pasa i prisustva DNK *C. burnetii* u reproduktivnim tkivima pasa ($\chi^2=0,618$, $df=1$, $p=0,432$; $p>0,05$).

Od 22 psa, u čijim je reproduktivnim tkivima ustanovljeno prisustvo DNK *C. burnetii*, uzorci šest pasa su sakupljeni u aprilu, dva u maju, 12 u oktobru i dva u novembru. U junu i septembru nije bilo uzoraka reproduktivnih tkiva pasa pozitivnih na prisustvo DNK *C. burnetii*.

Broj pasa čija su reproduktivna tkiva bila pozitivna na prisustvo DNK *C. burnetii* prema mesecu uzorkovanja prikazan je u tabeli 14 i na grafikonu 7.

Tabela 14. Broj pasa u čijim je reproduktivnim tkivima ustanovljeno prisustvo DNK *C. burnetii* po mesecima uzorkovanja

Mesec uzorkovanja	Ukupan broj pasa	Psi čija su reproduktivna tkiva pozitivna na prisustvo <i>DNK C. burnetii</i>
April	32	6
Maj	17	2
Jun	4	0
Septembar	16	0
Oktoabar	26	12
Novembar	10	2
Ukupno	105	22



Grafikon 7. Prikaz broja pasa čija su reproduktivna tkiva bila pozitivna na prisustvo DNK *C. burnetii* po mesecima uzorkovanja

5.5. REZULTATI ISPITIVANJA SERUMA PASA NA PRISUSTVO ANTITELA PROTIV *C. BURNETII* PRIMENOM MODIFIKOVANOG KOMERCIJALNOG ELISA TESTA *PRIOCHECK™ RUMINANT Q FEVER AB PLATE KIT, LSIVET™*, FRANCUSKA

Optimizacija ELISA testa za primenu na serume pasa, izvršena je šah titracijom razređenja pozitivnog seruma i anti-antitela konjugovanih peroksidazom (*Anti-dog IgG whole molecule - Peroxidase antibody produces in rabbit, Sigma Aldrich, SAD*). Za optimizaciju testa, kao pozitivna kontrola u serološkom testiranju korišćen je serum psa pozitivnog na prisustvo antitela protiv *C. burnetii*. Šah titracija je izvršena testiranjem pozitivnog i negativnog seruma u razređenjima 1/100, 1/200 i 1/400, a konjugovana anti-antitela su testirana u razređenjima 1/10.000, 1/20.000 i 1/25.000. Kao optimalne vrednosti uzete su one kod kojih je odnos srednje vrednosti očitanih optičkih gustina (*optical density - OD*) pozitivne i negativne kontrole >2, pri čemu je OD pozitivne kontrole >0,400. Dobijene optimalne vrednosti za razređenje seruma su iznosile 1/200, a za razređenje konjugata 1/25.000. Svi serumi pasa su ispitani u duplikatu, a rezultati su očitavani prema sledećoj formuli:

$$S/P = [OD_{uzorka} - OD_{NC}] / [OD_{PC} - OD_{NC}]$$

$$\text{Titar} = S/P \times 100,$$

pri čemu je:

S/P - odnos uzorka i pozitivne kontrole

NC - negativna kontrola,

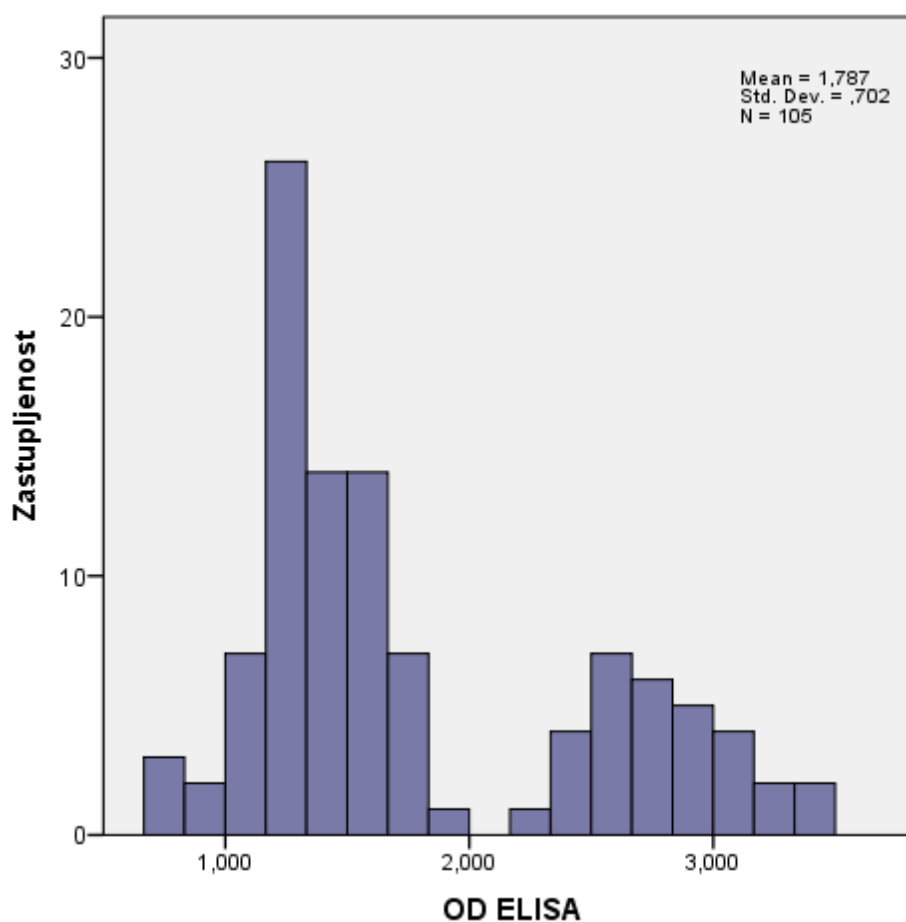
PC - pozitivna kontrola

Test je validan ukoliko je $OD_{PC} > 0,400$, a $OD_{PC}/OD_{NC} > 2$. Kao negativni uzorci smatrani su svi uzorci čija je izračunata vrednost $S/P \times 100 \leq 40$. Kod negativnih uzoraka vrednost S/P može da bude manja od nule ($S/P < 0$). Pozitivnim uzorcima smatrani su svi uzorci kod kojih je $S/P \times 100 > 40$. Srednja vrednost očitanih OD pozitivne kontrole iznosila je 2,856, a srednja vrednost očitanih OD negativne kontrole 1,388. Vrednosti OD ispitivanih seruma kretale su se u intervalu od 0,762 do 3,423.

Deskriptivni statistički parametri OD 105 ispitanih seruma prikazani su u tabeli 15 i na grafikonu 8.

Tabela 15. Prikaz deskriptivnih parametara rezultata OD ispitivanih seruma pasa u indirektnom ELISA testu

Deskriptivni parametri	Vrednost	Standarda greška
Srednja vrednost	1,78717	0,068461
95% interval pouzdanosti	Donja granica	1,65141
za srednju vrednost	Gornja granica	1,92293
5% korigovana srednja vrednost		1,75622
Mediana		1,50700
Varijansa		0,492
Standardna devijacija		0,701517
Minimalna vrednost		0,726
Maksimalna vrednost		3,423
Opseg		2,697
Interkvartalni opseg		1,223
Skjunis	0,825	0,236
Kurtozis	-0,693	0,467



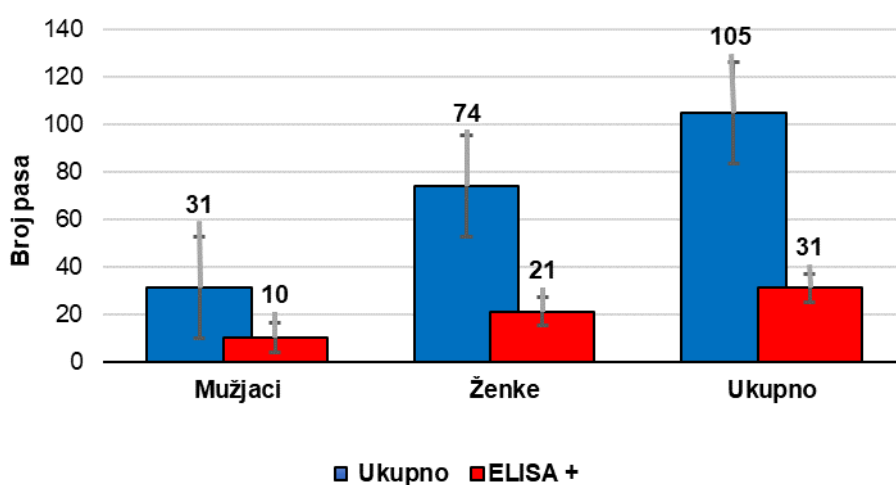
Grafikon 8. Grafički prikaz rezultata OD ispitivanih seruma pasa dobijenih ELISA testom

Od ukupno 105 ispitanih seruma, kod 29,52% (31/105) pasa je ustanovljeno prisustvo specifičnih antitela protiv *C. burnetii*. Od 31 mušjaka seropozitivno je bilo 32,26% (10/31), a od 74 ispitane ženke pozitivno je bilo 28,38% (21/74) ispitanih jedinki.

Rezultati seroloških ispitivanja seruma ne vlasničkih pasa prikazani su u tabeli 16 i na grafikonu 9.

Tabela 16. Rezultati seroloških ispitivanja seruma pasa na prisustvo antitela protiv *C. burnetii*

		ELISA		Ukupno	
		negativno	Pozitivno		
Pol	muški	Broj pasa	21	10	31
		% u okviru pola	67,7	32,3	100,0
	ženski	Broj pasa	53	21	74
		% u okviru pola	71,6	28,4	100,0
Ukupno		Broj pasa	74	31	105
		% u okviru pola	70,5	29,5	100,0



Grafikon 9. Zastupljenost seropozitivnih pasa

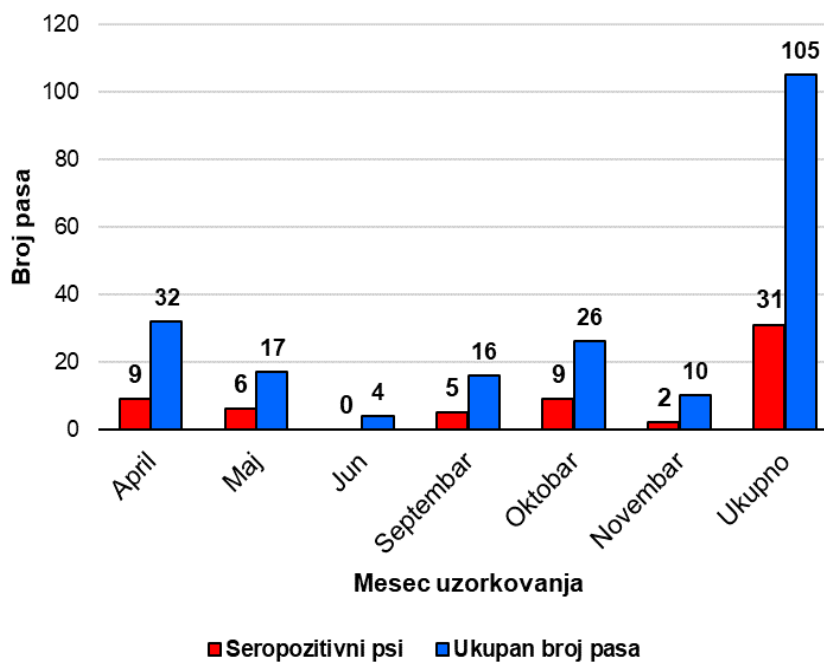
Primenom *Pearson*-ovog χ^2 testa nezavisnosti ustanovljeno je da nema statističke značajnosti između pola pasa i prisustva specifičnog serološkog odgovora protiv *C. burnetii* u serumima ispitanih pasa ($\chi^2=0,158$, $df=1$, $p=0,691$; $p>0,05$).

Od 31 seropozitivnog psa, po devet je uzorkovano u aprilu i oktobru, šest u maju, pet u septembru i dva u novembru, dok u junu nisu ustanovljeni seropozitivni psi.

Broj seropozitivnih pasa prema mesecu uzorkovanja prikazan je u tabeli 17 i na grafikonu 10.

Tabela 17. Broj seropozitivnih pasa po mesecima uzorkovanja

Mesec uzorkovanja	Ukupan broj pasa	Seropozitivni psi
April	32	9
Maj	17	6
Jun	4	0
Septembar	16	5
Oktobar	26	9
Novembar	10	2
Ukupno	105	31



Grafikon 10. Prikaz broja seropozitivnih pasa po mesecima uzorkovanja

5.6. UPOREDNI PRIKAZ REZULTATA DOBIJENIH MOLEKULARNIM I SEROLOŠKIM ISPITIVANJIMA

Od 105 ispitanih pasa pozitivno barem jednim testom bilo je 43,81% (46/105) jedinki. Kod sedam pasa (jedan mužjak i šest ženki) je ustanovljeno i prisustvo DNK *C. burnetii* u reproduktivnim tkivima i specifična antitela u serumu. Od ovih pasa jedan mužjak i jedna ženka su na sebi imali i krpelje u kojima je molekularnom metodom *Trans*-PCR ustanovljeno prisustvo DNK *C. burnetii*. Kod 15 seronegativnih pasa (četiri mužjaka i 11 ženki) molekularnom metodom *Trans*-PCR ustanovljeno je prisustvo DNK *C. burnetii* u reproduktivnim tkivima, a nije ustanovljeno kod 24 seropozitivna psa (devet mužjaka i 15 ženki).

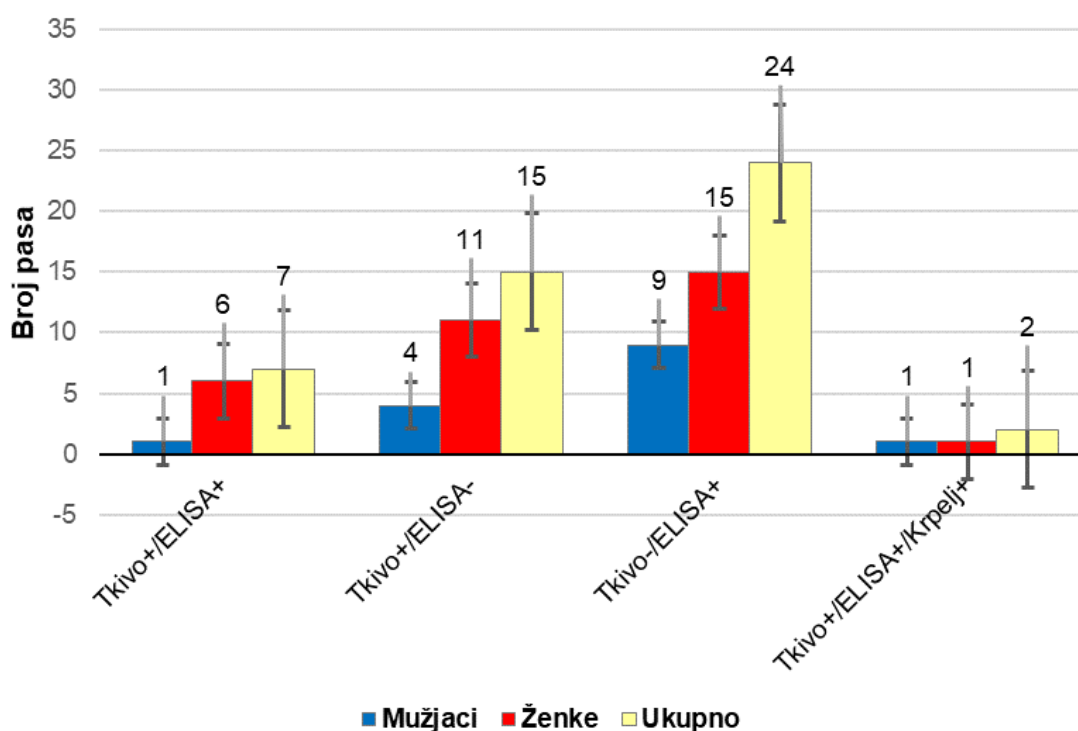
Uparedni prikaz seroloških i molekularnih ispitivanja prikazan je u tabeli 18 i na grafikonu 11.

Tabela 18. Uparedni prikaz rezultata seroloških i molekularnih ispitivanja (reproduktivnih tkiva pasa i krpelja) u odnosu na pol pasa

Pol	Tkivo+/ ELISA+	Tkivo+/ ELISA-	Tkivo-/ ELISA+	Tkivo+/ ELISA+/ Krpelj+
Mušjaci	1 ^a	4	9	1 ^a
Ženke	6 ^b	11	15	1 ^b
Ukupno	7	15	24	2

^a Jedan mužjak koji je bio pozitivan primenom obe metode (PCR i ELISA) na sebi je imao i krpelja u kom je ustanovljena DNK *C. burnetii*

^b Jedna ženka koja je bila pozitivna primenom obe metode (PCR i ELISA) na sebi je imala i krpelja u kom je ustanovljena DNK *C. burnetii*



Grafikon 11. Uporedni prikaz rezultata seroloških i molekularnih ispitivanja

Od sedam pasa koji su na sebi imali krpelje u kojima je ustanovljena DNK *C. burnetii*, dva psa su bila pozitivna primenom oba testa (PCR i ELISA), dok kod pet pasa nije ustanovljeno ni prisustvo DNK *C. burnetii* u tkivima, ni specifična antitela u serumu.

Usaglašenost između *Trans*-PCR i ELISA testova primenjenih kod pasa ispitana je primenom *Kappa* statističke analize (tabela 19). Ova metoda se koristi kada dijagnostički protokoli nisu određeni, kao što je slučaj sa ELISA testovima kod pasa, što je rađeno u ovom istraživanju. Metodom se može oceniti saglasnost između testova kao i dijagnostička osetljivost i specifičnost testova. Rezultati se izražavaju u opsegu od 0 do 1, gde je:

- $\kappa = 0$ - slaganje je na nivou verovatnoće
- $\kappa < 0,20$ - beznačajna usaglašenost
- κ od 0,21-0,40 - blaga usaglašenost
- κ od 0,41-0,60 - umerena usaglašenost
- κ od 0,61-0,80 - značajna usaglašenost
- κ od 0,81-0,99 - skoro idealna usaglašenost
- $\kappa = 1$ - idealna usaglašenost

Tabela 19. Prikaz rezultata *Trans*-PCR reproduktivnih tkiva pasa i ELISA

		PCR tkiva		Ukupno	
		negativno	pozitivno		
ELISA	negativno	Broj pasa	59	15	74
		% u okviru ELISA	79,7	20,3	100,0
		% u okviru PCR tkiva	71,1	68,2	70,5
		% ukupnog broja ispitanih	56,2	14,3	70,5
	pozitivno	Broj pasa	24	7	31
		% u okviru ELISA	77,4	22,6	100,0
		% u okviru PCR tkiva	28,9	31,8	29,5
		% ukupnog broja ispitanih	22,9	6,7	29,5
Ukupno	Broj pasa	83	22	105	
	% u okviru ELISA	79,0	21,0	100,0	
	% u okviru PCR tkiva	100,0	100,0	100,0	
	% ukupnog broja ispitanih	79,0	21,0	100,0	

Iz tabele se vidi da osetljivost primenjenog ELISA testa iznosi 31,8%, dok je specifičnost 71,1%.

Rezultati *Kappa* statističke analize između rezultata *Trans*-PCR reproduktivnih tkiva pasa i ELISA prikazani su u tabeli 20.

Tabela 20. *Kappa* saglasnost između *Trans*-PCR metode i ELISA metode

	Vrednost	Standardna greška	<i>p</i> vrednost
<i>Kappa</i> saglasnost	0,025	0,097	0,791
Broj ispitanih pasa	105		

Iz rezultata se vidi da *Kappa* vednost iznosi 0,025 što ukazuje na beznačajnu saglasnost između *Trans*-PCR i ELISA metode.

6. DISKUSIJA

Uloga pasa u epizootiologiji i epidemiologiji kju groznice dobija na značaju i sve je češći predmet istraživanja u različitim zemljama, naročito u urbanim sredinama. Uloga pasa kao izvora infekcije za ljude ustanovljena je u nekoliko slučajeva, kada su epidemiološkim ispitivanjima isključeni drugi mogući izvori infekcije i dokazano prisustvo infekcije kod ove vrste životinja. U većini ovih epidemija kao put infekcije navodi se kontakt ljudi sa gravidnim životinjama prilikom koćenja, kao i sa mladuncima i plodovim vodama (Rauch i sar., 1987; Laughlin i sar., 1991; Buhariwalla i sar., 1996; Komija i sar., 2003). Buhariwalla i sar. (1996) opisali su slučaj pojave atipične pneumonije kod tri člana jedne porodice, 8-12 dana nakon kontakta sa kujom čija su štenad uginula neposredno nakon koćenja. Serum kuje je bio pozitivan na prisustvo antitela protiv *C. burnetii*. Sedamdeset dana nakon koćenja, materica je uklonjena hirurškim putem, izolacija bakterija iz tkiva materice nije bila uspešna, a kao mogući razlog navodi se relativno dug period između pobačaja i uzorkovanja tkiva za izolaciju *C. burnetii*. Iako se pojava kju groznice najčešće vezuje za ruralne sredine i kontakt sa domaćim peživarima, Tozer i sar. (2011) zaključili su da je seroprevalencija *C. burnetii* ista kod ljudi u ruralnim i urbanim sredinama. Uz to, kasnija istraživanja Tozer i sar. (2014) potvrđuju ulogu kućnih ljubimaca u prenošenju infekcije na ljude. Visoka prevalencija *C. burnetii* ustanovljena je u urinu kućnih ljubimaca - pasa i mačaka, što ukazuje na to da ove vrste mogu imati ulogu u prenošenju *C. burnetii* na ljude, posebno u urbanim

sredinama. Rezultati ovog istraživanja ukazuju i na to da potencijalni rizik za ljude ne predstavlja kontakt samo sa inficiranim gravidnim životinjama, već i sa ostalim kategorijama životinja koje su klinički zdrave. U opisanom istraživanju ispitani su i krpelji sakupljeni sa različitih vrsta životinja, a rezultati su pokazali da je uzročnik kju groznice prisutan i u krpeljima poreklom sa domaćih i divljih životinja.

Autonomna pokrajina Vojvodina smatra se endemskim regionom za kju groznicu u Srbiji. Jedna od najvećih epidemija poslednjih godina opisana je u mestu Noćaj u Sremu (Medić i sar., 2012). Od ukupno 43 zabeležena klinička slučaja kod ljudi, 37 je potvrđeno i laboratorijski. Svi pacijenti su oboleli u akutnom toku sa simptomima atipične pneumonije. Od 43 pacijenta, 28 je negiralo kontakt sa domaćim životinjama. Iako je prijavljivanje pobačaja kod životinja obavezno u Republici Srbiji, a u tom slučaju i ispitivanje na prisustvo kju groznice, nekoliko meseci unazad od zabeležene epidemije lokalni držaoci životinja i veterinarske službe nisu registrovali pojavu pobačaja kod domaćih životinja. Uzimajući u obzir iznete podatke, opravdano je pretpostaviti da i u Srbiji izvori infekcije ne moraju biti samo inficirane domaće životinje, već je neophodno ispitati ulogu mačaka i pasa, kao i glodara, ptica i divljih životinja, a ne treba zanemariti ni ulogu vetra.

Prisustvo antitela protiv *C. burnetii* u serumima pasa kao i prisustvo DNK *C. burnetii* u reproduktivnim tkivima ne vlasničkih pasa i krpeljima poreklom sa ispitivanih jedinki ustanovljeni u ovoj doktorskoj disertaciji, ukazuju na to da je infekcija izazvana *C. burnetii* prisutna kod ne vlasničkih pasa na teritoriji grada Beograda i da psi mogu predstavljati rezervoare uzročnika kju groznice na terenu. Nalaz seropozitivnih pasa ukazuje na to da su ne vlasnički psi u kontaktu sa *C. burnetii*.

*

U ovoj doktorskoj disertaciji, kod nevlasničkih pasa ustanovljena je vrlo visoka seroprevalencija od čak 29,52% (31/105). Nije moguće definisati da li je prisustvo antitela u serumu pasa posledica akutne ili hronične (perzistentne) infekcije, odnosno prethodnog kontakta pasa sa *C. burnetii*. Takođe, nije moguće definisati kada su životinje postale inficirane. Rezultati seroprevalencije nevlasničkih pasa dobijeni u ovom istraživanju u saglasnosti su sa rezultatima istraživanja izvršenim u nekim zemljama.

Istraživanjem prisustva specifičnih antitela protiv *C. burnetii* kod pasa na Siciliji, metodom imunofluorescencije ustanovljena je seroprevalencija od čak 31,50% (23/76) (Torina i Caracappa, 2006). Slične rezultate dobili su i istraživači u Švajcarskoj, gde je ustanovljena seroprevalencija od 31,4% (122/388) kod ispitivanih pasa (Metzler i sar., 1983).

Rezultati istraživanja Kocianova i sar. (1992) u Slovačkoj pokazuju da slobodni, nevlasnički psi predstavljaju grupu sa najvećim rizikom od kontakta sa uzročnikom kju groznice. Istraživanjem su obuhvaćeni nevlasnički psi, domaći psi sa farmi i službeni psi. Kod nevlasničkih pasa ustanovljena je najveća seroprevalencija od 23,7%, kod službenih pasa sa dva lokaliteta ona je iznosila 10,5% i 10,6%, dok je kod pasa sa farmi ustanovljena seroprevalencija od 13,6%.

U ispitivanju u Portugaliji, takođe je ustanovljeno prisustvo antitela protiv *C. burnetii* kod pasa iz jedne odgajivačnice. Metodom imunofluorescencije ustanovljena je seroprevalencija od 4,8% kod ispitanih pasa (Bacellar i sar., 1995).

Visoka seroprevalencija kod pasa ustanovljena je i u Australiji, gde su vršena opsežna serološka ispitivanja prisustva kju groznice kod klinički zdravih pasa. Tom prilikom, u Kvinslendu je ustanovljena prevalencija od čak 21,8% (Cooper i sar., 2011). U istom istraživanju sprovedeno je

retrospektivno ispitivanje seruma pasa sakupljenih u veterinarskim ambulancama u periodu od 1984-1985. godine i tom prilikom ustanovljena je seroprevalencija od 16,0%. Ovako visoka prevalencija kod pasa ukazuje na njihov značaj u epizootiologiji kju groznice na ovom enzooskom području, kao i postojanje potencijalnog rizika od infekcije za vlasnike životinja. Takođe u Australiji, Shapiro i sar. (2016) ispitivali su seroprevalenciju kod pasa iz odgajivačnica, kućnih pasa, slobodnih pasa iz aboridžinskih zajednica i pasa iz prihvatilišta. Među psima iz odgajivačnica pozitivno je bilo 2,3% (7/309), među kućnim psima 3,0% (10/328), kod pasa iz aboridžinskih zajednica 6,5% (21/321) i kod pasa iz prihvatilišta 1,9% (5/265). Kod slobodnih pasa iz aboridžinskih zajednica ustanovljena je 2,8 puta veća seroprevalencija u odnosu na druge kategorije pasa. U ovom istraživanju ELISA metodom je testirano 86 seruma pasa, pri čemu je ustanovljena dobra usaglašenost sa IF. Rezultati istraživanja pokazuju da psi mogu da služe kao *sentinel* za otkrivanje prisustva bakterije *C. burnetii* u humanoj populaciji u čijem se okruženju nalaze, i da predstavljaju potencijalne rezervoare *C. burnetii* u Australiji. U radu nije naveden taj podatak, ali se pretpostavlja da menadžment pasa u prihvatilištima u Australiji podrazumeva sterilizaciju, odnosno kastraciju životinja koje se tamo smeštaju. To bi mogao biti jedan od razloga ovako niske prevalencije baš kod te kategorije pasa. Poznato je da *C. burnetii* naseljava genitalni trakt kod domaćih preživara, pa to može biti slučaj i kod pasa, a rezultati dobijeni u ovoj doktorskoj disertaciji idu u prilog toj pretpostavci.

U Iranu, gde je kju groznica takođe enzoosko oboljenje, Esmailnejad i Hasiri (2017) ELISA metodom ispitali su krv poreklom od 181 vlasničkog psa i otkrili 7,7% (14/181) seropozitivnih pasa.

Rezultati ove doktorske disertacije pokazuju da uzročnik kju groznice cirkuliše u populaciji nevlasničkih pasa na teritoriji grada Beograda. Prisustvo DNK *C. burnetii* ustanovljeno je u reproduktivnim

tkivima kako ženki, tako i mužjaka ispitivanih pasa, ali nije poznato da li ove životinje izlučuju uzročnika. Poznato je da je kod preživara *C. burnetii* prisutna u reproduktivnim organima i da može biti uzrok pobačaja i prevremenog rađanja mladunaca. Perzistentno inficirani preživari mogu da izlučuju bakterije u mleku, urinu, fecesu, plodovim vodama i pobačenim plodovima, a izlučivanje može trajati nekoliko meseci (Maurin i Raoult, 1999; Arricau-Bouvery i sar., 2003; Rodolakis i sar., 2007; Rodolakis, 2009; Rousset i sar., 2009). Prisustvo *C. burnetii* dokazano je u reproduktivnim tkivima mužjaka eksperimentalno inficiranih miševa (Kruszewska i Tylewska-Wierzbanowska, 1992, 1993), a opisana je i mogućnost interhumanog prenošenja uzročnika seksualnim putem (Milazzo i sar., 2001). Isto tako, eksperimentalno je dokazano da je uzročnik prisutan u spermi bikova čije se seme koristi za veštačko osemenjavanje (Kruszewska i Tylewska-Wierzbanowska, 1997). U istraživanjima u okviru ove doktorske disertacije uzročnik je dokazan u homogenizatima tkiva semenika, što je u saglasnosti sa pomenutim istraživanjima kod drugih vrsta životinja.

U dostupnoj literaturi, do sada nije bilo podataka o prisustvu *C. burnetii* u reproduktivnim tkivima mužjaka pasa. U ovom istraživanju ustanovljena je visoka prevalencija *C. burnetii* u reproduktivnim tkivima pasa od 20,95% (22/105), što nesumnjivo ukazuje na mogućnost prenošenja infekcije seksualnim putem i kod ove vrste životinja. Takođe, prilikom pojave pobačaja kod kuja, kao diferencijalno dijagnostički značajnu bolest, u obzir treba uzeti i kju groznicu.

*

Od 105 pasa obuhvaćenih istraživanjem u okviru ove doktorske disertacije, pozitivno barem jednim testom (PCR i ELISA) bilo je 43,81% (46/105) jedinki. Primenom *Kappa* satatističke metode usaglašenosti *Trans*-PCR i ELISA testova ustanovljena je beznačajna saglasnost između ova dva

testa, što je i očekivano, s obzirom na to da se radi o suštinski različitim metodama. Kod sedam pasa su ustanovljeni i prisustvo DNK *C. burnetii* u reproduktivnim tkivima i specifična antitela u serumu. Kod 15 seronegativnih pasa ustanovljeno je prisustvo DNK *C. burnetii* u reproduktivnim tkivima, a kod 24 seropozitivna psa nije ustanovljeno prisustvo DNK *C. burnetii* u tkivima. Ovakvi rezultati mogu se objasniti time da ne postoji povezanost između jedinki koje su nosioci uzročnika i potencijalni izlučioc i prisustva serološkog odgovora. Kod pasa koji su bili seronegativni, a dokazano je prisustvo DNK *C. burnetii* u reproduktivnim tkivima, moguće da je u pitanju rana infekcija i da nije prošlo dovoljno vremena da se sintetišu specifična antitela, a moguće i da kod nekih jedinki uopšte ne dolazi do serokonverzije, što je opisano kod preživara. Kod seropozitivnih pasa kod kojih nije dokazano prisustvo uzročnika u reproduktivnim tkivima, prisustvo specifičnih antitela može biti posledica prethodnog kontakta sa uzročnikom. Takođe, ispitivana su samo reproduktivna tkiva pasa, a moguće je da je uzročnik prisutan u nekom drugom tkivu, na primer na srčanim zaliscima, kao što je slučaj kod ljudi. Time se može objasniti i prisustvo seropozitivnih pasa kod kojih uzročnik nije dokazan u reproduktivnim tkivima. Kod preživara je dokazano da postoje životinje koje izlučuju *C. burnetii* pre sinteze antitela, kod nekih jedinki uopšte ne dolazi do specifične serokonverzije, a postoje i seronegativni izlučioc (Berri i sar., 2001; Arricau-Bouvery i sar., 2003; Rousset i sar., 2009). S obzirom na to da ne postoje ovakvi podaci za pse, može se pretpostaviti da i kod pasa postoji ovakav obrazac, pa bi se na taj način moglo objasniti odsustvo antitela kod jedinki kod kojih je ustanovljeno prisustvo DNK *C. burnetii* u tkivima i obrnuto. Beznačajna usaglašenost *Trans*-PCR i ELISA testa dobijena u ovom istraživanju poklapa se sa rezultatima dobijenim u ispitivanjima vršenim kod preživara. Dodatno, kod pasa koji su bili pozitivni primenom oba testa, moguće da je u pitanju hronična, odnosno perzistentna infekcija. Otkrivanje DNK *C. burnetii* u

reproduktivnim tkivima klinički zdravih mužjaka i ženki pasa može biti posledica bakterijemije, akutne, hronične ili perzistentne infekcije.

Mares-Guia i sar. (2014) ispitivali su izvore infekcije kju groznice u ruralnim delovima države Rio de Žaneiro. Molekularno i serološki ispitani su uzorci krvi poreklom od pasa i koza. Za molekularnu dijagnostiku korišćen je *Trans*-PCR metod, kojim se otkriva sekvenca dužine 687 bp specifična za ponavljajući region *IS1111 C. burnetii*. Od ukupno 13 ispitanih pasa dva su bila seropozitivna primenom metode indirektno imunofluorescencije. Međutim, kod dva seronegativna psa dokazano je prisustvo DNK *C. burnetii* u krvi, a slični rezultati su dobijeni i u ovoj doktorskoj disertaciji kod nevlasničkih pasa sa teritorije grada Beograda.

Kju groznica je enzoosko i endemsko oboljenje i u Iranu. *Rezaei* i sar. (2016) testirali su uzorke krvi 100 pasa u slobodnom režimu držanja u jugoistočnom Iranu. Spoljašnjim pregledom, kod svih ispitivanih pasa ustanovljeno je prisustvo krpelja. Uzorci su ispitani korišćenjem metode *nested Trans*-PCR. Ustanovljeno je prisustvo DNK uzročnika kod 11,0% (11/100) pasa. Ispitivane životinje su bile poreklom sa farmi i hranjene su sirovom hranom i to najčešće klaničnim otpacima, što autori smatraju faktorom rizika kojim objašnjavaju ustanovljenu visoku prevalenciju.

Hornok i sar. (2013) sproveli su istraživanje na jugu Mađarske kojim je kod pasa izvršena trijaža patogena koji se prenose preko krpelja, uključujući i *C. burnetii*. Ispitivanjem je obuhvaćeno 100 ovčarskih, 12 lovačkih i 14 klinički zdravih nevlasničkih pasa. Primenom PCR metode ustanovljen je samo jedan pozitivan nalaz DNK *C. burnetii* u krvi psa iz grupe ovčarskih pasa. Međutim, čak 20,3% pasa (25/123) je bilo seropozitivno primenom modifikovanog ELISA testa. Autori smatraju da je razlog visoke seroprevalencije način ishrane, odnosno način držanja pasa, koji su uglavnom u kontaktu sa životinjama na farmama i njihovim

proizvodima. Ovo je prvi slučaj ispitivanja ili dokazivanja prisustva uzročnika kju groznice kod pasa u ovom delu Evrope, a to je potvrđeno i rezultatima dobijenim u istraživanjima u okviru ove doktorske disertacije.

Bessas i sar. (2016) sproveli su istraživanje prevalencije patogena koji se prenose vektorima kod nevlasničkih pasa i mačaka u Alžiru. Za detekciju je korišćena *qPCR* metoda sa prajmerima specifičnim za *IS1111* ponavljajuću sekvencu *C. burnetii*. Ovo je prvo istraživanje sprovedeno u Alžiru u kome je molekularnom metodom ustanovljeno prisustvo *C. burnetii* na tom području. Prisustvo DNK *C. burnetii* dokazano je u uzorcima slezine uzete nakon obdukcije kod 0,85% pasa (1/117) i 0,93% mačaka (1/107). U istraživanju je sakupljeno i 520 krpelja sa pasa i 12 krpelja sa mačaka i svi su pripadali vrsti *R. sanguineus*. Međutim, u krpeljima nije ustanovljeno prisustvo DNK *C. burnetii*.

U navedenim istraživanjima rezultati molekularnih ispitivanja uzoraka poreklom od pasa nisu u saglasnosti sa rezultatima dobijenim u ovoj doktorskoj disertaciji. Autori u Mađarskoj i Alžiru koristili su *qPCR* metodu, ali je za umnožavanje korišćen *IS1111* region *C. burnetii* kao i u ovom istraživanju. Razlog niske prevalencije koju su ustanovili pomenuti autori može biti odabir tkiva za ispitivanje – slezina (*Bessas i sar.*, 2016), odnosno krv (*Hornok i sar.*, 2013), gde uzročnik možda nije prisutan ukoliko nije u pitanju akutna infekcija, a tome u prilog ide podatak o vrlo visokoj seroprevalenciji (20,3%) ustanovljenoj kod pasa u Mađarskoj. Međutim, rezultati istraživanja dobijeni u okviru ove doktorske disertacije u saglasnosti su sa rezultatima ispitivanja vršenim kod domaćih preživara, kod kojih je uzročnik prisutan u reproduktivnim tkivima (*Rousset i sar.*, 2009; *Alsaleh i sar.*, 2011). Takođe, u Koloradu, molekularnim metodama nije ustanovljeno prisustvo DNK *C. burnetii* u matericama i vaginalnim brisevima kod mačaka iz azila, ali je uzročnik dokazan kod čak 8,5% (4/45) ispitanih klinički zdravih vlasničkih mačaka (*Cairns i sar.*, 2007).

*

Najzastupljenija vrsta krpelja poreklom sa nevlasničkih pasa u istraživanju u okviru ove doktorske disertacije bio je braon pseći krpelj *R. sanguineus*, a zatim *I. ricinus*. Samo jedan krpelj je pripadao vrsti *D. reticulatus*. Prisustvo DNK *C. burnetii* ustanovljeno je u adultnim i preadultnim stadijumima krpelja vrste *R. sanguineus* i to najviše u ženkama, zatim u lutkama i mužjacima pomenute vrste. Rezultati ovog istraživanja pokazuju da su krpelji vrste *R. sanguineus* koji parazitiraju na nevlasničkim psima na teritoriji grada Beograda nosioci bakterije *C. burnetii*, sa ukupnom prevalencijom od 10,53% (24/228).

Tomanović i sar. (2013) prvi su u Republici Srbiji molekularnim metodama ustanovili prisustvo *C. burnetii* u iksodidnim krpeljima. Ispitana su 132 adultna stadijuma vrsta *Dermacentor marginatus*, *D. reticulatus*, *Hemaphysalis punctata*, *Haemaphysalis concinna* (*Hae. concinna*) i *I. ricinus*. Krpelji su sakupljeni sa vegetacije flag tehnikom, sa šest različitih lokacija u okolini grada Beograda i jedne opštine u Vojvodini. U svim vrstama je potvrđeno prisustvo DNK *C. burnetii*. Za razliku od istraživanja sprovedenog u ovoj doktorskoj disertaciji, gde su svi *I. ricinus* krpelji skinuti sa pasa bili negativni, u istraživanju *Tomanović i sar.* (2013) ustanovljeno je prisustvo DNK *C. burnetii* kod *I. ricinus* adulta (17/132) sakupljenih sa vegetacije. Moguće da je neusaglašenost rezultata ispitivanja *I. ricinus* vrste u ova dva istraživanja vezana za poreklo uzoraka. S obzirom na to da su u našem istraživanju u pitanju nevlasnički psi koji se slobodno kreću, ne može se ustanoviti sa kog lokaliteta potiču krpelji koji su se na njima hranili. Najnovije istraživanje vezano za otkrivanje prisustva različitih patogena koje prenose krpelji, izvedeno je na uzorcima slezine zlatnih šakala i krpelja skinutih sa istih životinja, poreklom sa deset lokaliteta u Republici Srbiji. Tom prilikom ispitano je 216 životinja, od kojih je 20 jedinki na sebi imalo 118 krpelja koji su pripadali vrstama: *I. ricinus*,

D. reticulatus i *Hae. concinna*. Prisustvo DNK *C. burnetii* nije ustanovljeno niti u uzorcima slezine, niti u krpeljima (Sukara i sar., 2018).

Rezultati istraživanja u nekim područjima endemskim za kju groznicu čak ukazuju na izrazito mali značaj *I. ricinus* vrste u održavanju ciklusa *C. burnetii* u prirodi, što je u skladu sa rezultatima dobijenim u ovoj doktorskoj disertaciji. Nakon epidemije u Holandiji vršeno je ispitivanje prisustva DNK *C. burnetii* u krpeljima sakupljenim sa vegetacije u endemskim oblastima. Od ukupno 1891 krpelja od kojih su svi pripadali vrsti *I. ricinus*, nijedan uzorak nije bio pozitivan na prisustvo DNK *C. burnetii*. Autori navode da je u endemskim oblastima Holandije rizik od dobijanja infekcije preko *I. ricinus* krpelja poreklom sa vegetacije zanemarljiv (Sprong i sar., 2012). Slični rezultati dobijeni su u Luksemburgu gde je, takođe, zabeleženo odsustvo patogena u 1500 *I. ricinus* krpelja sakupljenih sa vegetacije (Reye i sar., 2010).

Spitalská i Kocianová (2003) u ispitivanju prevalencije *C. burnetii* u 235 adulta sakupljenih sa vegetacije na tri lokaliteta u Slovačkoj i dva lokaliteta u Mađarskoj, ustanovile su ukupnu prevalenciju od 4,46%, od čega su pozitivna bila samo dva krpelja vrste *I. ricinus* (3,08%).

Barandika i sar. (2007, 2008) u endemskim oblastima severne Španije (Baskija) došli su do podataka da najznačajniju ulogu u održavanju ciklusa kju groznice na tom području imaju mali sisari (glodari), sakupljeni u okolini farmi na kojima su ustanovljene inficirane životinje. Što se tiče krpelja sakupljenih sa životinja (preko 1900 krpelja), najzastupljeniji je bio *I. ricinus*, koji i jeste najrasprostranjenija vrsta u ovoj regiji. Međutim, i ovi autori su potvrdili da *I. ricinus* nema značaja u epidemiologiji kju groznice u datoj oblasti, jer nije dokazano prisustvo DNK *C. burnetii* u krpeljima poreklom sa životinja.

Pluta i sar. (2010) u endemskim oblastima Nemačke, takođe nisu ustanovili prisustvo DNK *C. burnetii* u 666 ispitanih *Dermacentor* spp. adulta sakupljenih sa vegetacije.

Sa druge strane, ustanovljena visoka prevalencija DNK *C. burnetii* u krpeljima vrste *R. sanguineus* poreklom sa ispitivanih pasa sa teritorije grada Beograda, u skladu je sa rezultatima istraživanja u različitim zemljama, gde je definisan značaj upravo ove vrste krpelja u epizootiologiji kju groznice.

U istraživanju *Khalili* i sar. (2018) u Iranu, sa 100 pasa sakupljeno je 975 krpelja, koji su ispitani metodom *Trans-PCR* na prisustvo DNK *C. burnetii*. Svi uzorci su pripadali vrsti *R. sanguineus* i od ukupno osam formiranih zbirnih uzoraka, jedan je bio pozitivan na prisustvo DNK *C. burnetii* (12,5%). Takođe u Iranu, od 160 krpelja poreklom sa koza i ovaca otkrivene su vrste *Hyalomma anatolicum anatolicum* (*Hy. anatolicum anatolicum*) i *R. sanguineus*. Prisustvo DNK *C. burnetii* je zabeleženo u tri zbirna uzorka *Hy. anatolicum anatolicum* i jednom zbirnom uzorku sačinjenom od tri krpelja *R. sanguineus* (*Fard* i *Khalili*, 2011).

U Maleziji su ispitana 53 krpelja sakupljena sa 23 vlasnička psa i tom prilikom je DNK *C. burnetii* ustanovljena u čak 59,0% (26/44) uzoraka (*Watanabe* i sar., 2015).

Noda i sar. (2016) su ispitivali prisustvo DNK *C. burnetii* u krpeljima poreklom sa pasa, konja i ljudi na Kubi. Korišćena je konvencionalna PCR metoda kojom se otkriva specifični fragment od 435 bp za identifikaciju *IS1111* ponavljajućeg regiona. Najviše krpelja je pripadalo vrsti *Amblyomma mixtum*, zatim *R. sanguineus* i *Dermacentor nitens*. Prva vrsta krpelja je nađena kod svih ispitivanih grupa, dok su poslednje dve vrste nađene samo kod pasa i konja. Rezultati dobijeni u ovom istraživanju pokazali su prisustvo DNK *C. burnetii* u svim ispitanim vrstama krpelja, što je prvi

zvanično registrovan slučaj prisustva DNK *C. burnetii* u krpeljima poreklom sa Kube.

Na Kanarskim ostrvima, koja su endemsko i enzootsko područje za kju groznicu, sa zabeleženom visokom prevalencijom i kod ljudi i kod domaćih životinja, Bolaños-Rivero i sar. (2017) ispitivali su ulogu divljih životinja kao rezervoara *C. burnetii*, ali i peridomicilni ciklus uzročnika. Uzorci su obuhvatali tkiva slezine i/ili jetre poreklom od glodara i divljih zečeva uzetih iz okoline farmi preživara; zatim krpelje poreklom sa vegetacije ($n=1169$), preživara ($n=335$), domaćih pasa ($n=169$) i divljih životinja i to: ježeva ($n=24$), zečeva ($n=13$) i ptica ($n=28$). Prisustvo DNK *C. burnetii* potvrđeno je u 6,1% ispitanih krpelja i to 11,3% u krpeljima poreklom sa domaćih životinja, 6,9% sa pasa i 6,0% sa divljih životinja. Svi krpelji poreklom sa vegetacije su bili negativni. Tom prilikom uzročnik je ustanovljen u tkivima malih glodara i lagomorfa. Interesantan je podatak da, iako je u pitanju endemsko područje, svi krpelji sakupljeni sa vegetacije su bili negativni, dok je prevalencija u krpeljima skinutim sa životinja bila čak 6,1%, što opet ide u prilog tezi da krpelji imaju ulogu u prenošenju uzročnika sa rezervoara na imunološki naivne domaćine. Ova grupa istraživača zapazila je da se vrste krpelja koje su prisutne na Kanarskim ostrvima razlikuju od onih u drugim delovima Španije, pa možda otuda i potiču ustanovljene razlike u prevalenciji. Najzastupljenija vrsta na domaćim životinjama je bio *R. sanguineus*, a jedan pozitivan uzorak je bio poreklom sa domaćeg psa. Autori ukazuju na to da se u ovoj oblasti infekcija odvija u peridomicilnom ciklusu, u koji su uključeni domaće životinje, sitni divlji sisari i krpelji.

U centralnoj Španiji ustanovljena je DNK *C. burnetii* kako u krpeljima sakupljenim sa vegetacije (7,7%) tako i u krpeljima sakupljenim sa domaćih i divljih životinja (3,4%). Svi krpelji vrste *R. sanguineus* su bili poreklom sa životinja sa prevalencijom od 1,4% (2/146), od čega je čak 106 uzoraka

poticalo sa ljubimaca. Svi *R. sanguineus* krpelji poreklom sa pasa bili su negativni, a autori to objašnjavaju podatkom da su psi bili poreklom iz urbanih sredina u kojima kju groznica nije prisutna (Toledo i sar., 2009).

Uloga domaćih i divljih mesojeda u eizootiologiji kju groznice ispitana je u oblasti Barselone od strane Millán i sar. (2016). Tom prilikom dokazana je prvi put infekcija kod slobodnih mesojeda, ali nije ustanovljen uzročnik u krpeljima poreklom sa ispitivanih životinja.

Pozitivni uzorci *R. sanguineus* ustanovljeni su među krpeljima skinutim sa ovaca (7/141) na Kipru, gde je kju groznica enzoosko oboljenje (Spyridaki i sar., 2002). Psaroulaki i sar. (2006) su, takođe, na Kipru ustanovili izrazitu korelaciju između seropozitivnih malih preživara i pozitivnih krpelja, što ide u prilog tvrdnji da krpelji na ovom području imaju značajnu ulogu u epizootiologiji kju groznice. U pomenutom istraživanju ukupna prevalencija u krpeljima je iznosila 7,8%, od čega je sedam pozitivnih *R. sanguineus* krpelja bilo poreklom sa ovaca (7/80). Autori smatraju da se u enzooskim oblastima na Kipru infekcija *C. burnetii* među domaćim životinjama održava pomoću krpelja. Novija istraživanja prisustva *C. burnetii* kod divljih životinja i krpelja na Kipru potvrdila su prisustvo infekcije na celom ostrvu, bez značajne zonalnosti. Tom prilikom ustanovljeno je deset vrsta krpelja od ukupno 1315 krpelja skinutih sa divljih životinja. Od 195 zbirnih uzoraka, pozitivno je bilo 56 (28,7%), pri čemu je od 15 zbirnih uzoraka *R. sanguineus* bilo pozitivno čak devet (60%). Svi krpelji su bili poreklom sa životinja, zbog čega autori opet ističu značaj krpelja u epizootiologiji kju groznice na ostrvu (Psaroulaki i sar., 2014).

Na Sardiniji je među 1485 adulta krpelja poreklom sa domaćih i divljih sisara ustanovljeno sedam vrsta krpelja. Većina *R. sanguineus* krpelja poticala je sa pasa (92,3%). Od 209 zbirnih uzoraka *R. sanguineus*, četiri pozitivna su bila poreklom sa pasa, a jedan sa koze (Satta i sar., 2011). U

novijem istraživanju sprovedenom na Sardiniji (Chisu i sar., 2018) iksodidni krpelji su sakupljeni sa domaćih i divljih životinja, ljudi i vegetacije. DNK *C. burnetii* otkrivena je u 1,0% (21/1619) krpelja vrste *R. sanguineus* (14/710), *Rhipicephalus bursa* (3/400), *Rhipicephalus annulatus* (2/11) i *Hyalomma marginatum* (2/45). Od 14 pozitivnih krpelja, šest ženki bilo je poreklom sa pasa (od ukupno 16), četiri mužjaka i dve ženke (43 i 64) sa koze i dva mužjaka (od 41) sa kune. Autori napominju da je ovo prvi put da je DNK *C. burnetii* ustanovljena u *R. sanguineus* krpeljima na Sardiniji i ukazuju na moguću ulogu ove vrste krpelja kao vektora za kju groznicu na tom području. Rezultati dobijeni u ovoj doktorskoj disertaciji u saglasnosti su sa rezultatima autora sa Sardinije.

Iako je u Japanu prethodno opisan slučaj infekcije ljudi preko zaraženih pasa u jednoj veterinarskoj ambulanti (Komija i sar., 2003), Andoh i sar. (2013) nisu ustanovili prisustvo DNK *C. burnetii* u krpeljima poreklom sa pasa ljubimaca u urbanim sredinama u Japanu.

U Keniji je, od 102 krpelja skinuta sa 36 pasa, DNK *C. burnetii* ustanovljena u 20,0% (2/10) zbirnih uzoraka *R. sanguineus* krpelja. U ovom istraživanju najveća prevalencija *C. burnetii* zabeležena je kod žutog psećeg krpelja *Haemaphysalis leachi* (50,0% zbirnih uzoraka), koji je adaptiran na pse u tropskim oblastima (analogno braon psećem krpelju u umerenom klimatskom pojasu), što ponovo dovodi u vezu krpelje i pse u ciklusu širenja i održavanja kju groznice u prirodi (Knobel i sar., 2013).

Prenošenje *C. burnetii* ubodom krpelja prethodno je dokazano kod pasa (Mantovani i Benazzi, 1953). U ovoj doktorskoj disertaciji od sedam pasa koji su na sebi imali krpelje u kojima je ustanovljeno prisustvo DNK *C. burnetii*, dva su bila pozitivna primenom oba testa (PCR i ELISA), a kod pet pasa nije ustanovljeno ni prisustvo DNK *C. burnetii* u tkivima, ni specifična antitela u serumu. Kod ova dva psa nisu svi skinuti krpelji bili

pozitivni na prisustvo DNK *C. burnetii*, tako da se može smatrati da su krpelji uneli uzročnika hranjenjem na inficiranim psima. U prilog tome ide i podatak da krpelji u svim stadijumima mogu da unesu *C. burnetii* kada se hrane na inficiranoj životinji, međutim, eksperimentalno neće svi krpelji koji se hrane na inficiranoj životinji da postanu nosioci uzročnika (Smith, 1940; Smith i Derrick, 1940; Balashov i Daiter, 1973). Odsustvo DNK *C. burnetii* u reproduktivnim tkivima pasa, kao i specifičnog serološkog odgovora, kod pet pasa koji su na sebi imali pozitivne krpelje, može se objasniti time da nije prošlo dovoljno vremena da se sintetišu specifična antitela. Nije moguće ustanoviti koliko dugo su se krpelji hranili na ispitivanim psima. Kod tih pasa uzročnik je ustanovljen i u adultima i u preadultnim stadijumima vrste *R. sanguineus*, koji jesu bili nasisani, ali ako se uzme u obzir da krpelji na životinjama sisaju 7-10 dana, to nije period dovoljan za sintezu merljivog titra imunoglobulina G klase, koji se otkrivaju ELISA testom korišćenim u ovom istraživanju. Odsustvo DNK uzročnika u reproduktivnim tkivima može se objasniti ili time da su se krpelji nedovoljno dugo hranili na životinjama, pa nije došlo do merljive bakterijemije ili nije došlo do prenošenja uzročnika, što je takođe moguće u prirodnim uslovima. Prema Duron i sar. (2015b), kompetencija vektora podrazumeva sposobnost unošenja uzročnika prilikom uzimanja krvnog obroka sa inficirane životinje, transstadijalno prenošenje i sposobnost prenošenja infektivnog uzročnika na neinficiranu životinju. Prirodna sposobnost krpelja da prenese nekog uzročnika u prirodnim uslovima zavisi, pored kompetencije vektora, i od spoljašnjih faktora kao što su gustina populacije krpelja, prijemčivost domaćina, stopa uboda, odnosno uzimanja krvnog obroka i ekološki faktori.

Pored toga što je eksperimentalno dokazano prenošenje *C. burnetii* preko *R. sanguineus* krpelja na pse (Mantovani i Benazzi, 1953), visoka prevalencija *C. burnetii* ustanovljena u ovoj vrsti krpelja u ovoj doktorskoj

disertaciji, značajna je i iz razloga što je u pitanju endofilna vrsta krpelja. Braon pseći krpelj je adaptiran na uslove niske vlažnosti i može dugo da preživi u objektima (domovi, odgajivačnice, prihvatilišta) i ukoliko mu je domaćin (pas) dostupan može da završi ceo razvojni ciklus za svega 2-3 meseca (Dantas-Torres, 2008). Opisani su slučajevi gde su razvojni stadijumi *R. sanguineus* primećeni kako puze po zidovima i nameštaju u domovima gde je bila prisutna visoka infestacija ovom vrstom krpelja (Demma i sar., 2005; Dantas-Torres i sar., 2006). Za održavanje velikog broja krpelja vrste *R. sanguineus* neophodno je prisustvo psa kao domaćina, ali sve češće se opisuju slučajevi parazitizma ove vrste krpelja i na ljudima (Goddard, 1989; Estrada-Peña i Jongejan, 1999; Demma i sar., 2005; Dantas-Torres i sar., 2006), što pruža mogućnost za prenošenje *C. burnetii* na ljude preko ove vrste krpelja. Infekcije ljudi u vezi sa ubodom krpelja su retke, ali su opisani slučajevi koji ukazuju na mogućnost prenošenja *C. burnetii* kod ljudi i ovim putem (Beaman i Hung, 1989; Rolain i sar., 2005a; Nett i sar., 2012). Ženke *R. sanguineus* mogu da polože i do 7.000 jaja, koja se najčešće nalaze u pukotinama na mestima gde domaćin (pas) boravi, kako bi larvama krvni obrok bio dostupan neposredno nakon što se izlegu (Koch, 1982; Dantas-Torres, 2008). Ako se uzme u obzir izuzetno kratak razvojni ciklus i visoka plodnost ženki, kao i mogućnost opstanka i odvijanje razvojnog ciklusa u objektima, ukoliko se inficirani *R. sanguineus* krpelji preko pasa unesu u domaćinstvo, postoji rizik od nastanka infekcije, kako za pse u kohabitaciji, tako i za ljude.

U okviru ove doktorske disertacije zabeleženo je prisustvo DNK *C. burnetii* u odraslim stadijumima (ženkama i mužjacima) i u lutkama krpelja vrste *R. sanguineus*. Pošto se *C. burnetii* prenosi i transstadijalno i transovarijalno, moguća je disperzija uzročnika na potomstvo čime se povećava rizik za infekciju. Ovome u prilog ide i podatak da se svega ~5% krpelja nalazi na životinjama, a ~95% u okolini životinje (Dantas-Torres,

2008). To znači da visoka infestacija na prijemljivoj populaciji pasa podrazumeva da je visoka prevalencija krpelja i u okolini. U ovom istraživanju na jednom psu su ustanovljena tri mužjaka *R. sanguineus*, koja su bila pozitivna na prisustvo DNK *C. burnetii*. To može biti značajno za pse u kohabitaciji, kod kojih je opisan prelazak mužjaka *R. sanguineus* sa jednog psa na drugog (Little i sar., 2007). Parenje se kod ove vrste krpelja odvija na domaćinu, a mužjak nakon parenja može ponovo da se hrani na drugom domaćinu. Prilikom prvog hranjenja mogu da se aktiviraju eventualno prisutni patogeni u krpelju i kada se krpelj hrani na narednom domaćinu, prenošenje patogena se odvija za znatno kraće vreme (Little i sar., 2007; Dantas-Torres, 2008). Kao što je već rečeno, ukoliko je visoka infestacija *R. sanguineus* u domu, ako nema drugih prijemljivih pasa, postoji mogućnost da se ovi krpelji hrane na ljudima (Goddard, 1989; Estrada-Peña i Jongejan, 1999; Demma i sar., 2005; Dantas-Torres i sar., 2006). Opisana osobina vrste *R. sanguineus* može biti naročito značajna u prihvatilištima za pse ili u odgajivačnicama, gde je prisutan veliki broj životinja na malom prostoru. Pored uloge krpelja kao bioloških vektora za *C. burnetii*, pri analizi rizika svakako treba uzeti u obzir i podatak da krpelji mogu izlučivati velike količine uzročnika u fecesu, čime se stvara dodatni rizik od nastanka infekcije usled kontaminacije dlake i kože životinje, kao i okoline u kojoj životinje borave (Philip, 1948b). Iz razoga što krpelji mogu da imaju veliki broj bakterija u hemolimfi i fecesu (do 10^{10} /g fecesa) prilikom uklanjanja krpelja sa životinje ne treba ih zgnječiti golim rukama jer na taj način može doći do infekcije.

*

Populacija ne vlasničkih pasa ima nesumnjiv značaj za ispitivanje jer je potpuno nezaštićena ektoantiparaziticima, ne prima nikakvu hemoprofilaksu, a kreće se slobodno, pa se povećava verovatnoća da će doći u kontakt sa uzročnikom kju groznice koji je široko prisutan u

spoljašnjoj sredini, ali i sa krpeljima potencijalnim nosiocima *C. burnetii*. Preko nevlasničkih pasa *C. burnetii* se može preneti na različite udaljenosti i nove lokalitete.

Rezultati istraživanja ove doktorske disertacije pokazuju da su krpelji koji parazitiraju na nevlasničkim psima poreklom sa teritorije grada Beograda nosioci *C. burnetii*. Rezultati, takođe, pružaju pregled podataka o rasprostranjenosti vrsta krpelja koji parazitiraju na nevlasničkim psima na teritoriji grada Beograda, kao i o prisustvu DNK *C. burnetii* u krpeljima poreklom sa ovih životinja. Zbog visoke prevalencije *C. burnetii* u ispitivanim krpeljima vrste *R. sanguineus* poreklom sa pasa, neophodna je primena sanitarnih i profilaktičkih mera, naročito suzbijanje populacije krpelja na terenu.

Prisustvo uzročnika kju groznice u slobodnim psima koji su klinički zdravi, ukazuje na to da psi mogu služiti kao asimptomatski izlučioc i izvori infekcije kako za ljude, tako i za druge životinje. Slobodan način života, kontakt sa drugim životinjama i odsustvo preventive ili terapije antiektoparaziticima, su u korelaciji sa prisustvom *C. burnetii* kod pasa, što je povezano sa većom izloženošću nevlasničkih, slobodnih pasa uzročniku kju groznice u spoljašnjoj sredini, kao i krpeljima, nosiocima *C. burnetii*. Imajući u vidu da je *C. burnetii* vrlo otporna i široko rasprostranjena u prirodi, psi su, u odnosu na druge vrste životinja, u većem riziku od nastanka infekcije aerogenim putem - unošenjem agensa njuškanjem, sa tla, a to se posebno odnosi na nevlasničke pse koji se slobodno kreću.

Dokaz prisustva *C. burnetii* u populaciji slobodnih pasa na teritoriji grada Beograda, kao i u krpeljima koji na njima parazitiraju od značaja je kako za javno zdravlje, tako i za veterinarsku struku. Odgovarajuće strategije suzbijanja populacije krpelja i dobra higijena mogu da smanje kontaminaciju spoljašnje sredine (feces krpelja, košenje trave i dr.) što može

biti od značaja, na primer, u odgajivačnicama ili prihvatilištima gde je prisutan veliki broj životinja na malom prostoru.

Kju groznica je potcenjeno oboljenje koje i danas ostaje sa dosta nejasnoća. Nedijagnostikovani slučajevi, kao i neprijavljivanje oboljenja dovode do toga da je broj registrovanih slučajeva manji od stvarnog. Što se tiče uloge krpelja u ciklusu kju groznice kod domaćih i divljih životinja, različite prevalencije uzročnika u krpeljima u različitim zemljama mogu biti u vezi sa različitom metodologijom koja je korišćena za otkrivanje patogena u uzorcima. Rezultati dobijeni u ovoj doktorskoj disertaciji stavljaju ne vlasničke pse u grupu životinja koje imaju potencijalni epidemiološki značaj za pojavu i širenje kju groznice u Srbiji. Visoka prevalencija DNK *C. burnetii* u braon psećem krpelju, koji je primarno parazit pasa, ukazuje na to da je značaj pasa u epidemiologiji i epizootiologiji kju groznice veći od očekivanog. Visoka seroprevalencija i prisustvo uzročnika u reproduktivnim tkivima pasa ukazuju na to da psi mogu služiti kao *sentinel* za kju groznicu u Srbiji, što je od značaja prilikom pojave epidemija, naročito kada se isključe drugi izvori infekcije (uobičajeno kontakt sa domaćim životinjama). Zbog podatka da je prevalencija visoka u vrsti *R. sanguineus*, neophodno je vlasnicima pasa ukazati na dodatni značaj zaštite ljubimaca od ektoparazita. Takođe, veterinari bi trebalo da uzmu u obzir kju groznicu u diferencijalnoj dijagnostici, posebno u slučajevima pojave pobačaja kod kuja i rane smrti mladunčadi, kada se isključe drugi mogući uzroci pobačaja.

I na kraju, ali nikako manje važno, s obzirom na to da je ispitivanjima sprovedenim u okviru ove doktorske disertacije ustanovljena serokonverzija i kontakt sa *C. burnetii* kod ne vlasničkih pasa, neophodno je nastaviti sa menadžmentom ove populacije pasa u cilju očuvanja njihovog zdravlja i dobrobiti.

7. ZAKLJUČCI

Na osnovu rezultata dobijenih sprovedenim molekularnim ispitivanjem prisustva vrste *Coxiella burnetii* u reproduktivnim tkivima ne vlasničkih pasa i krpeljima koji na njima parazitiraju, kao i prisustva specifičnog serološkog odgovora, mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. Na ispitanim ne vlasničkim psima sa teritorije grada Beograda nađene su tri vrste krpelja: *Rhipicephalus sanguineus*, *Ixodes ricinus* i *Dermacentor reticulatus*. Najzastupljenija vrsta bila je *R. sanguineus*.
2. DNK *C. burnetii* otkrivena je samo u uzorcima *R. sanguineus* (u adultima i lutkama) i to kod 10,53% uzoraka, poreklom sa sedam pasa.
3. U uzorcima reproduktivnih tkiva pasa primenom *Trans*-PCR metode ustanovljena je DNK *C. burnetii* kod 20,95% uzoraka, odnosno kod 22 jedinke. Nisu ustanovljene statistički značajne razlike u prevalenciji između ispitanih mužjaka i ženki.
4. Primenom modifikovanog komercijalnog ELISA testa, ustanovljeno je prisustvo specifičnih antitela protiv *C. burnetii* u uzorcima seruma poreklom od 29,52% pasa, odnosno kod 31 jedinke. Nisu ustanovljene statistički značajne razlike u prevalenciji između ispitanih mužjaka i ženki.

5. Od svih ispitanih pasa 43,81%, odnosno 46 jedinki, je bilo pozitivno na prisustvo *C. burnetii* primenom barem jedne metode (ELISA ili *Trans-PCR*). Kod dva psa koja su bila pozitivna primenom obe metode ustanovljeno je i prisustvo krpelja pozitivnih na prisustvo DNK *C. burnetii*, dok je pet pasa sa krpeljima pozitivnim na prisustvo DNK *C. burnetii* bilo negativno primenom obe metode.
6. Primenom obe metode bilo je pozitivno sedam pasa, prisustvo uzročnika uz odsustvo imunološkog odgovora zabeleženo je kod 15 pasa, dok uzročnik nije ustanovljen u tkivima kod 24 seropozitivna psa.
7. Metoda *Trans-PCR* kojom se otkriva ponavljajući IS1111 region *C. burnetii* pogodna je za otkrivanje prisustva DNK uzročnika u tkivima pasa i krpeljima, a sekvence IS1111 regiona dobijene u ovom istraživanju poseduju 99-100% sličnosti sa drugim sekvencama poreklom iz ljudi, životinja i krpelja, deponovanim u Banci gena. Nisu ustanovljeni endosimbionti krpelja slični *C. burnetii*.
8. Utvrđivanje prisustva DNK *C. burnetii* u vrsti *R. sanguineus*, koja je prvenstveno parazit pasa, kao i nalaz pozitivnih krpelja na psima koji su bili pozitivni primenom *Trsns-PCR* i ELISA metode, ukazuje na to da ne vlasnički psi mogu imati ulogu u ciklusu održavanja uzročnika kju groznice na teritoriji grada Beograda.
9. Utvrđivanje prisustva *C. burnetii* kod klinički zdravih pasa primenom *Trans-PCR* i ELISA metode, kao i dokaz prisustva uzročnika kod seronegativnih pasa, odnosno prisustvo serološkog odgovora kod pasa kod kojih nije dokazan uzročnik u tkivima, sugerise na to da psi mogu biti asimptomatski nosioci *C. burnetii*.

10. Visoka seroprevalencija i prisustvo uzročnika u tkivima pasa ukazuju na to da ova vrsta životinja može da bude *sentinel* za kju groznicu u Srbiji, što je značajno u slučajevima pojave epidemija i epizootija, kada se isključe drugi izvori infekcije.

8. LITERATURA

- Alsaleh A, Pellerin JL, Rodolakis A, Larrat M, Cochonneau D, Bruyas JF, Fieni F. Detection of *Coxiella burnetii*, the agent of Q fever, in oviducts and uterine flushing media and in genital tract tissues of the non pregnant goat. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 2011; 34:355–360.
- Amitai Z, Bromberg M, Bernstein M, Raveh D, Keysary A, David D, Pitlik S, Swerdlow D, Massung R, Rzotkiewicz S, Halutz O, Shohat T. A large Q fever outbreak in an urban school in central Israel. *Clinical Infectious Diseases* 2010; 50:1433–1438.
- Andoh M, Andoh R, Teramoto K, Komiyama T, Kaneshima T, Takano A, Hayashidani H, Ando S. Survey of *Coxiella burnetii* in ticks collected from dogs in Japan. *The Journal of Veterinary Medical Science* 2013; 75:1115–1117.
- Angelakis E, Raoult D. Q fever. *Veterinary Microbiology* 2010; 140:297–309.
- Angelakis E, Mediannikov O, Jos S-L, Berenger J-M, Parola P, Raoult D. *Candidatus Coxiella massiliensis* infection. *Emerging Infectious Diseases* 2016; 22:285–288.
- Arricau-Bouvery N, Rodolakis A. Is Q fever an emerging or re-emerging zoonosis? *Veterinary Research* 2005; 36:327–349.
- Arricau-Bouvery N, Souriau A, Lechopier P, Rodolakis A. Experimental *Coxiella burnetii* infection in pregnant goats: excretion routes. *Veterinary Research* 2003; 34:423–433.
- Arricau-Bouvery N, Souriau A, Bodier C, Dufour P, Rousset E, Rodolakis A. Effect of vaccination with phase I and phase II *Coxiella burnetii* vaccines in pregnant goats. *Vaccine* 2005; 23:4392–4402.
- Arricau-Bouvery N, Hauck Y, Bejaoui A, Frangoulidis D, Bodier CC, Souriau A, Meyer H, Neubauer H, Rodolakis A, Vergnaud G. Molecular characterization of *Coxiella burnetii*

- isolates by infrequent restriction site-PCR and MLVA typing. *BMC Microbiology* 2006; 6:38.
- Asadi J, Khalili M, Kafi M, Ansari-Lari M, Hosseini SM. Risk factors of Q fever in sheep and goat flocks with history of abortion. *Comparative Clinical Pathology* 2014; 23:625–630.
- Astobiza I, Barral M, Ruiz-Fons F, Barandika JF, Gerrickagoitia X, Hurtado A, García-Pérez AL. Molecular investigation of the occurrence of *Coxiella burnetii* in wildlife and ticks in an endemic area. *Veterinary Microbiology* 2011; 147:190–194.
- Babudieri B. Q fever: a zoonosis. *Advances in Veterinary Science* 1959; 5:81–154.
- Bacellar F, Dawson JE, Silveira CA, Filipe AR. Antibodies against Rickettsiaceae in dogs of Setúbal, Portugal. *Central European Journal of Public Health* 1995; 3:100–102.
- Balashov YS, Daiter AB. Blood-sucking arthropods and rickettsiae. *Krovososushchie Chlenistonogie i Rikketsii* 1973; 251.
- Barandika JF, Hurtado A, García-Esteban C, Gil H, Escudero R, Barral M, Jado I, Juste RA, Anda P, García-Pérez AL. Tick-borne zoonotic bacteria in wild and domestic small mammals in northern Spain. *Applied and Environmental Microbiology* 2007; 73:6166–6171.
- Barandika JF, Hurtado A, García-Sanmartín J, Juste RA, Anda P, García-Pérez AL. Prevalence of tick-borne zoonotic bacteria in questing adult ticks from northern Spain. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 2008; 8:829–836.
- Beaman MH, Hung J. Pericarditis associated with tick-borne Q fever. *Australian and New Zealand Journal of Medicine* 1989; 19:254–256.
- Beare PA, Unsworth N, Andoh M, Voth DE, Omsland A, Gilk SD, Williams KP, Sobral BW, Kupko JJ 3rd, Porcella SF, Samuel JE, Heinzen RA. Comparative genomics reveal extensive transposon-mediated genomic plasticity and diversity among potential effector proteins within the genus *Coxiella*. *Infection and Immunity* 2009; 77:642–656.
- Beck MD, Bell JA, Shaw EW, Huebner RJ. Q fever studies in southern California: II. An epidemiological study of 300 cases. *Public Health Reports (1896-1970)* 1949; 64:41.
- van Belkum A. Tracing isolates of bacterial species by multilocus variable number of tandem repeat analysis (MLVA). *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 2007; 49:22–27.
- Bennett MD, Woolford L, Banazis MJ, O'Hara AJ, Warren KS, Nicholls PK, Sims C, Fenwick

- SG. *Coxiella burnetii* in western barred bandicoots (*Perameles bougainville*) from Bernier and Dorre Islands in western Australia. *EcoHealth* 2011; 8:519–524.
- Benson WW, Brock DW, Mather J. Serologic analysis of a penitentiary group using raw milk from a Q fever infected herd. *Public Health Reports* 1963; 78:707–710.
- Berri M, Laroucau K, Rodolakis A. The detection of *Coxiella burnetii* from ovine genital swabs, milk and fecal samples by the use of a single touchdown polymerase chain reaction. *Veterinary Microbiology* 2000; 72:285–293.
- Berri M, Souriau A, Crosby M, Crochet D, Lechopier P, Rodolakis A. Relationships between the shedding of *Coxiella burnetii*, clinical signs and serological responses of 34 sheep. *The Veterinary Record* 2001; 148:502–505.
- Bessas A, Leulmi H, Bitam I, Zaidi S, Ait-Oudhia K, Raoult D, Parola P. Molecular evidence of vector-borne pathogens in dogs and cats and their ectoparasites in Algiers, Algeria. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 2016; 45:23–28.
- Boden K, Brasche S, Straube E, Bischof W. Specific risk factors for contracting Q fever: Lessons from the outbreak Jena. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 2014; 217:110–115.
- Bolaños-Rivero M, Carranza-Rodríguez C, Rodríguez NF, Gutiérrez C, Pérez-Arellano J-L. Detection of *Coxiella burnetii* DNA in peridomestic and wild animals and ticks in an endemic region (Canary Islands, Spain). *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 2017; 17:630–634.
- Buhariwalla F, Cann B, Marrie TJ. A dog-related outbreak of Q fever. *Clinical Infectious Diseases* 1996; 23:753–755.
- Burnet FM, Freeman M. Experimental studies on the virus of “Q” fever. *Medical Journal of Australia* 1937; 2:229-305.
- Cairns K, Brewer M, Lappin MR. Prevalence of *Coxiella burnetii* DNA in vaginal and uterine samples from healthy cats of north-central Colorado. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 2007; 9:196–201.
- Caminopetros J. Q fever (Balkan grippe). *Abstracts International Congress on Tropical Medicine and Malaria (4th congress, Washington, DC)* 1948; 56:33.
- Cantas H, Muwonge A, Sareyyupoglu B, Yardimci H, Skjerve E. Q fever abortions in ruminants and associated on-farm risk factors in northern Cyprus. *BMC Veterinary*

Research 2011; 7:13.

Chisu V, Foxi C, Mannu R, Satta G, Masala G. A five-year survey of tick species and identification of tick-borne bacteria in Sardinia, Italy. *Ticks and Tick-Borne Diseases* 2018; 9:678–81.

Cooper A, Hedlefs R, Ketheesan N, Govan B. Serological evidence of *Coxiella burnetii* infection in dogs in a regional centre. *Australian Veterinary Journal* 2011; 89:385–387.

Cooper A, Barnes T, Potter A, Ketheesan N, Govan B. Determination of *Coxiella burnetii* seroprevalence in macropods in Australia. *Veterinary Microbiology* 2012; 155:317–323.

Cooper A, Stephens J, Ketheesan N, Govan B. Detection of *Coxiella burnetii* DNA in wildlife and ticks in northern Queensland, Australia. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 2013; 13:12–16.

D'amato F, Million M, Edouard S, Delerce J, Robert C, Marrie T, Raoult D. Draft genome sequence of *Coxiella burnetii* Dog Utad, a strain isolated from a dog-related outbreak of Q fever. *New Microbes and New Infections* 2014a; 2:136–137.

D'Amato F, Rouli L, Edouard S, Tyczka J, Million M, Robert C, Nguyen TT, Raoult D. The genome of *Coxiella burnetii* Z3055, a clone linked to the Netherlands Q fever outbreaks, provides evidence for the role of drift in the emergence of epidemic clones. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 2014b; 37:281–288.

D'Amato F, Eldin C, Georgiades K, Edouard S, Delerce J, Labas N, Raoult D. Loss of TSS1 in hypervirulent *Coxiella burnetii* 175, the causative agent of Q fever in French Guiana. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 2015; 41:35–41.

D'Amato F, Eldin C, Raoult D. The contribution of genomics to the study of Q fever. *Future Microbiology* 2016; 11:253–272.

Dantas-Torres F, Figueredo LA, Brandão-Filho SP. *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae), the brown dog tick, parasitizing humans in Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 2006; 39:64–67.

Dantas-Torres F. The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): from taxonomy to control. *Veterinary Parasitology* 2008; 152:173–185.

Davis GE, Cox HR, Parker RR, Dyer RE. A filter-passing infectious agent isolated from ticks. *Public Health Reports (1896-1970)* 1938; 53:2259.

Davoust B, Marié J-L, Pommier de Santi V, Berenger J-M, Edouard S, Raoult D. Three-toed

- sloth as putative reservoir of *Coxiella burnetii*, Cayenne, French Guiana. *Emerging Infectious Diseases* 2014; 20:1760–1761.
- Delsing CE, Kullberg BJ, Bleeker-Rovers CP. Q fever in the Netherlands from 2007 to 2010. *The Netherlands Journal of Medicine* 2010; 68:382–387.
- Demma LJ, Traeger MS, Nicholson WL, Paddock CD, Blau DM, Eremeeva ME, Dasch GA, Levin ML, Singleton J Jr, Zaki SR, Cheek JE, Swerdlow DL, McQuiston JH. Rocky Mountain spotted fever from an unexpected tick vector in Arizona. *New England Journal of Medicine* 2005; 353:587–594.
- Derrick EH. “Q” Fever, a new fever entity: clinical features, diagnosis and laboratory investigation. *The Medical Journal of Australia* 1937; 2:281–299.
- Duron O. The IS1111 insertion sequence used for detection of *Coxiella burnetii* is widespread in *Coxiella*-like endosymbionts of ticks. *FEMS Microbiology Letters* 2015; 362:fnv132.
- Duron O, Noël V, McCoy KD, Bonazzi M, Sidi-Boumedine K, Morel O, Vavre F, Zenner L, Jourdain E, Durand P, Arnathau C, Renaud F, Trape JF, Biguezoton AS, Cremaschi J, Dietrich M, Léger E, Appelgren A, Dupraz M, Gómez-Díaz E, Diatta G, Dayo GK, Adakal H, Zoungrana S, Vial L, Chevillon C. The recent evolution of a maternally-inherited endosymbiont of ticks led to the emergence of the Q fever pathogen, *Coxiella burnetii*. *PLOS Pathogens* 2015a; 11:e1004892.
- Duron O, Sidi-Boumedine K, Rousset E, Moutailler S, Jourdain E. The importance of ticks in Q fever transmission: What has (and has not) been demonstrated? *Trends in Parasitology* 2015b; 31:536–552.
- Eldin C, Angelakis E, Renvoisé A, Raoult D. *Coxiella burnetii* DNA, but not viable bacteria, in dairy products in France. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2013; 88:765–769.
- Eldin C, Mahamat A, Djossou F, Raoult D. Rainfall and sloth births in may, Q Fever in july, Cayenne, French Guiana. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2015; 92:979–981.
- Eldin C, Mélenotte C, Mediannikov O, Ghigo E, Million M, Edouard S, Mege JL, Maurin M, Raoult D. From Q Fever to *Coxiella burnetii* infection: a paradigm change. *Clinical Microbiology Reviews* 2017; 30:115–190.
- van Engelen E, Schotten N, Schimmer B, Hautvast JLA, van Schaik G, van Duijnhoven

- YTHP. Prevalence and risk factors for *Coxiella burnetii* (Q fever) in Dutch dairy cattle herds based on bulk tank milk testing. *Preventive Veterinary Medicine* 2014; 117:103–109.
- Enright JB, Sadler WW, Thomas RC. Pasteurization of milk containing the organism of Q fever. *American Journal of Public Health* 1957; 47:695–700.
- Esmailnejad A, Hasiri MA. Serological evidence of *Coxiella burnetii* infection among companion dogs in Fars province, south Iran. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine* 2017; 20:377–384.
- Estrada-Peña A, Jongejan F. Ticks feeding on humans: a review of records on human-biting Ixodoidea with special reference to pathogen transmission. *Experimental and Applied Acarology* 1999; 23:685–715.
- Estrada-Peña A, Bouattour A, Camicas J, Walker AR. Ticks of domestic animals in the Mediterranean region. A guide to identification of species. 2004, University of Zaragoza, Spain.
- Fard SN, Khalili M. PCR-Detection of *Coxiella burnetii* in ticks collected from sheep and goats in southeast Iran. *Iranian Journal of Arthropod-Borne Diseases* 2011; 5:1–6.
- Fournier PE, Marrie TJ, Raoult D. Diagnosis of Q fever. *Journal of Clinical Microbiology* 1998; 36:1823–1834.
- Glazunova O, Roux V, Freylikman O, Sekeyova Z, Fournous G, Tyczka J, Tokarevich N, Kovacava E, Marrie TJ, Raoult D. *Coxiella burnetii* genotyping. *Emerging Infectious Diseases* 2005; 11:1211–1217.
- Goddard J. Focus of human parasitism by the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). *Journal of Medical Entomology* 1989; 26:628–629.
- González-Barrio D, Hagen F, Tilburg JJHC, Ruiz-Fons F. *Coxiella burnetii* genotypes in Iberian Wildlife. *Microbial Ecology* 2016; 72:890–897.
- Gottlieb Y, Lalar I, Klasson L. Distinctive genome reduction rates revealed by genomic analyses of two *Coxiella*-like endosymbionts in ticks. *Genome Biology and Evolution* 2015; 7:1779–1796.
- Guatteo R, Seegers H, Joly A, Beaudeau F. Prevention of *Coxiella burnetii* shedding in infected dairy herds using a phase I *C. burnetii* inactivated vaccine. *Vaccine* 2008; 26:4320–4328.

- Hall TA. *BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT*. *Nucleic Acids Symposium Series* 1999; 41:95–98.
- Hammerl JA, Mertens K, Sprague LD, Hackert VH, Buijs J, Hoebe CJ, Henning K, Neubauer H, Al Dahouk S. *First draft genome sequence of a human Coxiella burnetii isolate, originating from the largest Q fever outbreak ever reported, the Netherlands, 2007 to 2010*. *Genome Announcements* 2015; 3:e00445-15.
- Hansen MS, Rodolakis A, Cochonneau D, Agger JF, Christoffersen A-B, Jensen TK, Agerholm JS. *Coxiella burnetii associated placental lesions and infection level in parturient cows*. *The Veterinary Journal* 2011; 190:e135–9.
- Harris P, Eales KM, Squires R, Govan B, Norton R. *Acute Q fever in northern Queensland: variation in incidence related to rainfall and geographical location*. *Epidemiology and Infection* 2013; 141:1034–1038.
- Hawker JI, Ayres JG, Blair I, Evans MR, Smith DL, Smith EG, Burge PS, Carpenter MJ, Caul EO, Coupland B, Desselberger U, Farrell ID, Saunders PJ, Wood MJ. *A large outbreak of Q fever in the West Midlands: windborne spread into a metropolitan area?* *Communicable Disease and Public Health* 1998; 1:180–187.
- Hilbink F, Penrose M, Kovacova E, Kazar J. *Q fever is absent from New Zealand*. *International Journal of Epidemiology* 1993; 22:945–949.
- Hogerwerf L, van den Brom R, Roest HJJ, Bouma A, Vellema P, Pieterse M, Dercksen D, Nielen M. *Reduction of Coxiella burnetii prevalence by vaccination of goats and sheep, the Netherlands*. *Emerging Infectious Diseases* 2011; 17:379–386.
- Hoover TA, Vodkin MH, Williams JC. *A Coxiella burnetii repeated DNA element resembling a bacterial insertion sequence*. *Journal of Bacteriology* 1992; 174:5540–5548.
- Hornibrook JW, Nelson KR, Dyer RE, Topping NH, Bengtson IA. *An institutional outbreak of pneumonitis*. *Public Health Reports (1896-1970)* 1940; 55:1936.
- Hornok S, Dénes B, Meli ML, Tánczos B, Fekete L, Gyuranecz M, de la Fuente J, de Mera IG, Farkas R, Hofmann-Lehmann R. *Non-pet dogs as sentinels and potential synanthropic reservoirs of tick-borne and zoonotic bacteria*. *Veterinary Microbiology* 2013; 167:700–703.
- Hornstra HM, Priestley RA, Georgia SM, Kachur S, Birdsell DN, Hilsabeck R, Gates LT, Samuel Je, Heinzen RA, Kersh GJ, Keim P, Massung RF, Perason T. *Rapid typing of*

- Coxiella burnetii*. PLoS ONE 2011; 6:e26201.
- Howe D, Shannon JG, Winfree S, Dorward DW, Heinzen RA. *Coxiella burnetii* phase I and II variants replicate with similar kinetics in degradative phagolysosome-like compartments of human macrophages. *Infection and Immunity* 2010; 78:3465–3474.
- Huebner RJ, Jellison WL, Beck MD, Wilcox FP. Q fever studies in southern California: III. Effects of pasteurization on survival of *C. burnetii* in naturally infected milk. *Public Health Reports (1896-1970)* 1949; 64:499-511.
- Huijsmans CJJ, Schellekens JJA, Wever PC, Toman R, Savelkoul PHM, Janse I, Hermans MHA. Single-nucleotide-polymorphism genotyping of *Coxiella burnetii* during a Q fever outbreak in the Netherlands. *Applied and Environmental Microbiology* 2011; 77:2051–2057.
- Isken LD, Kraaij-Dirkzwager M, Vermeer-de Bondt PE, Rümke HC, Wijkmans C, Opstelten W, Timen A. Implementation of a Q fever vaccination program for high-risk patients in the Netherlands. *Vaccine* 2013; 31:2617–2622.
- Kersh GJ, Lambourn DM, Raverty SA, Fitzpatrick KA, Self JS, Akmajian AM, Jeffries SJ, Huggins J, Drew CP, Zaki SR, Massung RF. *Coxiella burnetii* infection of marine mammals in the Pacific Northwest, 1997-2010. *Journal of Wildlife Diseases* 2012; 48:201–206.
- Kersh GJ, Priestley R, Massung RF. Stability of *Coxiella burnetii* in stored human blood. *Transfusion* 2013; 53:1493–1496.
- Khalili M, Rezaei M, Akhtardanesh B, Abiri Z, Shahheidaripour S. Detection of *Coxiella burnetii* (Gammaproteobacteria: Coxiellaceae) in ticks collected from infested dogs in Kerman, southeast of Iran. *Persian Journal of Acarology* 2018; 7:93-100.
- Klee SR, Tyczka J, Ellerbrok H, Franz T, Linke S, Baljer G, Appel B. Highly sensitive real-time PCR for specific detection and quantification of *Coxiella burnetii*. *BMC Microbiology* 2006; 6:2.
- Knobel DL, Maina AN, Cutler SJ, Ogola E, Feikin DR, Junghae M, Halliday JE, Richards AL, Breiman RF, Cleaveland S, Njenga MK. *Coxiella burnetii* in humans, domestic ruminants, and ticks in rural Western Kenya. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2013; 88:513–518.
- Koch HG. Oviposition of the Brown Dog Tick (Acari: Ixodidae) in the Laboratory. *Annals of*

- the Entomological Society of America* 1982; 75:583–586.
- Kocianova E, Lisak V, Kopcok M. *Coxiella burnetii* and *Chlamydia psittaci* infection in dogs. *Veterinarni Medicina* 1992; 37:177–183.
- Komiya T, Sadamasu K, Toriniwa H, Kato K, Arashima Y, Fukushi H, Hirai K, Arakawa Y. *Epidemiological survey on the route of Coxiella burnetii* infection in an animal hospital. *Journal of Infection and Chemotherapy* 2003; 9:151–155.
- Krumbiegel ER, Wisniewski HJ. *Q fever in the Milwaukee area. II. Consumption of infected raw milk by human volunteers. Archives of Environmental Health* 1970; 21:63–65.
- Kruszewska D, Tylewska-Wierzbanowska S. *Dependence between penetration route and course of infection with Coxiella burnetii* in mice. *Medycyna Doswiadczalna i Mikrobiologia* 1992; 44:145–152.
- Kruszewska D, Tylewska-Wierzbanowska SK. *Coxiella burnetii* penetration into the reproductive system of male mice, promoting sexual transmission of infection. *Infection and Immunity* 1993; 61:4188–4195.
- Kruszewska D, Tylewska-Wierzbanowska S. *Isolation of Coxiella burnetii* from bull semen. *Research in Veterinary Science* 1997; 62:299–300.
- Kumar S, Stecher G, Tamura K. *MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. Molecular Biology and Evolution* 2016; 33:1870–1874.
- Lang GH. *Coxiellosis (Q fever) in animals. In: Q fever, Vol. I: The Disease, Marrie TJ, editor. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA; 1990, 23–48.*
- Langley JM, Marrie TJ, Covert A, Waag DM, Williams JC. *Poker players' pneumonia. An urban outbreak of Q fever following exposure to a parturient cat. New England Journal of Medicine* 1988; 319:354–356.
- Laughlin T, Waag D, Williams J, Marrie T. *Q fever: from deer to dog to man. Lancet (London, England)* 1991; 337:676–677.
- Little SE, Hostetler J, Kocan KM. *Movement of Rhipicephalus sanguineus adults between co-housed dogs during active feeding. Veterinary Parasitology* 2007; 150:139–145.
- Mantovani A, Benazzi P. *The isolation of Coxiella burnetii* from *Rhipicephalus sanguineus* on naturally infected dogs. *Journal of American Veterinary Medical Association* 1953; 122:117–118.
- Mares-Guia MA, Rozental T, Guterres A, Gomes R, Almeida DN, Moreira NS, Barreira JD,

- Favacho AR, Santana AL, Lemos ER. Molecular identification of the agent of Q fever - *Coxiella burnetii* - in domestic animals in State of Rio de Janeiro, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 2014; 47:231–234.
- Marrie TJ, Durant H, Williams JC, Mintz E, Waag DM. Exposure to parturient cats: a risk factor for acquisition of Q fever in Maritime Canada. *The Journal of Infectious Diseases* 1988a; 158:101–108.
- Marrie TJ, MacDonald A, Durant H, Yates L, McCormick L. An outbreak of Q fever probably due to contact with a parturient cat. *Chest* 1988b; 93:98–103.
- Marrie TJ, Langille D, Papukna V, Yates L. Truckin' pneumonia - an outbreak of Q fever in a truck repair plant probably due to aerosols from clothing contaminated by contact with newborn kittens. *Epidemiology and Infection* 1989; 102:119–127.
- Marrie TJ. *Epidemiology of Q fever*. In: *Q fever, Vol. I: The Disease*, Marrie TJ, editor. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA; 1990, 49–70.
- Maurin M, Raoult D. Q fever. *Clinical Microbiology Reviews* 1999; 12:518–553.
- McCaul TC. The development cycle of *Coxiella burnetii*. In: *Q Fever: The Biology of Coxiella burnetii*, Williams JC, Thompson HA, editors. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA; 1991, 223–258.
- McCutcheon JP, Moran NA. Extreme genome reduction in symbiotic bacteria. *Nature Reviews Microbiology* 2012; 10:13–26.
- Medić S, Kaluski DN, Seguljev Z, Obrenović J, Rudan P, Lazarević M, Kočić JJ, Sajenković D, Pusić I, Bugarski D, Vidanović D, Šekler M. Q fever outbreak in the village of Noćaj, Srem county, Vojvodina province, Serbia, January to February 2012. *Euro Surveill* 2012; 17. pii: 20143.
- Mege JL, Maurin M, Capo C, Raoult D. *Coxiella burnetii*: the “query” fever bacterium. A model of immune subversion by a strictly intracellular microorganism. *FEMS Microbiology Reviews* 1997; 19:209–217.
- Metzler AE, Nicolet J, Bertschinger H-U. Die Verbreitung von *Coxiella burnetii*: eine seroepidemiologische Untersuchung bei Haustieren und Tierärzten. *Schweizer Archiv Für Tierheilkunde* 1983; 125:507–517.
- Milazzo A, Hall R, Storm PA, Harris RJ, Winslow W, Marmion BP. Sexually transmitted Q fever. *Clinical Infectious Diseases* 2001; 33:399–402.

- Millán J, Proboste T, Fernández de Mera IG, Chirife AD, de la Fuente J, Altet L. Molecular detection of vector-borne pathogens in wild and domestic carnivores and their ticks at the human-wildlife interface. *Ticks and Tick-Borne Diseases* 2016; 7:284–290.
- Million M, Walter G, Thuny F, Habib G, Raoult D. Evolution from acute Q fever to endocarditis is associated with underlying valvulopathy and age and can be prevented by prolonged antibiotic treatment. *Clinical Infectious Diseases* 2013; 57:836–844.
- Million M, Thuny F, Bardin N, Angelakis E, Edouard S, Bessis S, Guimard T, Weitten T, Martin-Barbaz F, Texereau M, Ayouz K, Protopopescu C, Carrieri P, Habib G, Raoult D. Antiphospholipid antibody syndrome with valvular vegetations in acute Q fever. *Clinical Infectious Diseases* 2016; 62:537–544.
- Million M, Raoult D. No such thing as chronic Q fever. *Emerging Infectious Diseases* 2017; 23:856–857.
- Moses AS, Millar JA, Bonazzi M, Beare PA, Raghavan R. Horizontally acquired biosynthesis genes boost *Coxiella burnetii*'s physiology. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 2017; 7:174.
- Nagaoka H, Sugieda M, Akiyama M, Nishina T, Akahane S, Fujiwara K. Isolation of *Coxiella burnetii* from the vagina of feline clients at veterinary clinics. *The Journal of Veterinary Medical Science* 1998; 60:251–252.
- Nedić L, Jokić S, Parlić M, Grgić B. Epidemiološke karakteristike Q groznice u Srbiji. *Praxis Medica* 2003; 31:53–55.
- Nett RJ, Book E, Anderson AD. Q Fever with unusual exposure history: a classic presentation of a commonly misdiagnosed disease. *Case Reports in Infectious Diseases* 2012; 2012:916142.
- Niemczuk K, Szymańska-Czerwińska M, Śmietanka K, Bocian Ł. Comparison of diagnostic potential of serological, molecular and cell culture methods for detection of Q fever in ruminants. *Veterinary Microbiology* 2014; 171:147–152.
- Noda AA, Rodríguez I, Miranda J, Contreras V, Mattar S. First molecular evidence of *Coxiella burnetii* infecting ticks in Cuba. *Ticks and Tick-Borne Diseases* 2016; 7:68–70.
- O'Neill TJ, Sargeant JM, Poljak Z. A systematic review and meta-analysis of phase I inactivated vaccines to reduce shedding of *Coxiella burnetii* from sheep and goats from routes of public health importance. *Zoonoses and Public Health* 2014; 61:519–533.

OIE. *Q Fever* 2018; *Terrestria*: 1–18.

Omsland A, Cockrell DC, Howe D, Fischer ER, Virtaneva K, Sturdevant DE, Porcella SF, Heinzen RA. Host cell-free growth of the Q fever bacterium *Coxiella burnetii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2009; 106:4430–4434.

Omsland A, Beare PA, Hill J, Cockrell DC, Howe D, Hansen B, Samuel JE, Heinzen RA. Isolation from animal tissue and genetic transformation of *Coxiella burnetii* are facilitated by an improved axenic growth medium. *Applied and Environmental Microbiology* 2011; 77:3720–3725.

Panning M, Kilwinski J, Greiner-Fischer S, Peters M, Kramme S, Frangoulidis D, Meyer H, Henning K, Drosten C. High throughput detection of *Coxiella burnetii* by real-time PCR with internal control system and automated DNA preparation. *BMC Microbiology* 2008; 8:77.

Parker NR, Barralet JH, Bell AM. Q fever. *Lancet (London, England)* 2006; 367:679–688.

Pearson T, Cocking JH, Hornstra HM, Keim P. False detection of *Coxiella burnetii* -what is the risk? *FEMS Microbiology Letters* 2016; 363:fnw088.

Philip CB. Comments on the name of the Q fever organism. *Public Health Reports* 1948a; 63:58–59.

Philip CB. Observations on Experimental Q Fever. *The Journal of Parasitology* 1948b; 34:457-464.

Pinsky RL, Fishbein DB, Greene CR, Gensheimer KF. An outbreak of cat-associated Q fever in the United States. *The Journal of Infectious Diseases* 1991; 164:202–204.

Pluta S, Hartelt K, Oehme R, Mackenstedt U, Kimmig P. Prevalence of *Coxiella burnetii* and *Rickettsia* spp. in ticks and rodents in southern Germany. *Ticks and Tick-Borne Diseases* 2010; 1:145–147.

Potasman I, Rzotkiewicz S, Pick N, Keysary A. Outbreak of Q fever following a safari trip. *Clinical Infectious Diseases* 2000; 30:214–215.

Psaroulaki A, Hadjichristodoulou C, Loukaidis F, Soteriades E, Konstantinidis A, Papastergiou P, Ioannidou MC, Tselentis Y. Epidemiological study of Q fever in humans, ruminant animals, and ticks in Cyprus using a geographical information system. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 2006; 25:576–586.

- Psaroulaki A, Chochlakis D, Angelakis E, Ioannou I, Tselentis Y. *Coxiella burnetii* in wildlife and ticks in an endemic area. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 2014; 108:625–631.
- Raoult D. Treatment of Q fever. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1993; 37:1733–1736.
- Rauch AM, Tanner M, Pacer RE, Barrett MJ, Brokopp CD, Schonberger LB. Sheep-Associated Outbreak of Q Fever, Idaho. *Archives of Internal Medicine* 1987; 147:341–344.
- Reye AL, Hübschen JM, Sausy A, Muller CP. Prevalence and seasonality of tick-borne pathogens in questing *Ixodes ricinus* ticks from Luxembourg. *Applied and Environmental Microbiology* 2010; 76:2923–2931.
- Rezaei M, Khalili M, Akhtardanesh B, Shahheidaripour S. Q fever in dogs: an emerging infectious disease in Iran. *Journal of Medical Bacteriology* 2016; 5:1–6.
- Robbins FC, Rustigian R. Q fever in the mediterranean area: Report of its occurrence in allied troops: IV. A laboratory outbreak. *American Journal of Epidemiology* 1946; 44:64–71.
- Rodolakis A, Berri M, Héchard C, Caudron C, Souriau A, Bodier CC, Blanchard B, Camuset P, Devillechaise P, Natorp JC, Vadet JP, Arricau-Bouvery N. Comparison of *Coxiella burnetii* shedding in milk of dairy bovine, caprine, and ovine herds. *Journal of Dairy Science* 2007; 90:5352–5360.
- Rodolakis A. Q fever in dairy animals. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2009; 1166:90–93.
- Rolain J, Gouriet F, Brouqui P, Larrey D, Janbon F, Vene S, Jarnestrom V, Raoult D. Concomitant or consecutive infection with *Coxiella burnetii* and tickborne diseases. *Clinical Infectious Diseases* 2005a; 40:82–88.
- Rolain J, Boulos A, Mallet M, Raoult D. Correlation between ratio of serum doxycycline concentration to MIC and rapid decline of antibody levels during treatment of Q fever endocarditis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2005b; 49:2673–2676.
- Rolain J, Lambert F, Raoult D. Activity of telithromycin against thirteen new isolates of *C. burnetii* including three resistant to doxycycline. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2005c; 1063:252–256.
- de Rooij MMT, Borlée F, Smit LAM, de Bruin A, Janse I, Heederik DJJ, Wouters IM. Detection of *Coxiella burnetii* in ambient air after a large Q fever outbreak. *PLoS One*

2016; 11:e0151281.

- Rousset E, Durand B, Berri M, Dufour P, Prigent M, Russo P, Delcroix T, Touratier A, Rodolakis A. Comparative diagnostic potential of three serological tests for abortive Q fever in goat herds. *Veterinary Microbiology* 2007; 124:286–297.
- Rousset E, Berri M, Durand B, Dufour P, Prigent M, Delcroix T, Touratier A, Rodolakis A. *Coxiella burnetii* shedding routes and antibody response after outbreaks of Q fever-induced abortion in dairy goat herds. *Applied and Environmental Microbiology* 2009; 75:428–433.
- Sánchez J, Souriau A, Buendía AJ, Arricau-Bouvery N, Martínez CM, Salinas J, Rodolakis A, Navarro JA. Experimental *Coxiella burnetii* infection in pregnant goats: a histopathological and immunohistochemical study. *Journal of Comparative Pathology* 2006; 135:108–115.
- Sandoz KM, Sturdevant DE, Hansen B, Heinzen RA. Developmental transitions of *Coxiella burnetii* grown in axenic media. *Journal of Microbiological Methods* 2014; 96:104–110.
- Sandoz KM, Beare PA, Cockrell DC, Heinzen RA. Complementation of arginine auxotrophy for genetic transformation of *Coxiella burnetii* by use of a defined axenic medium. *Applied and Environmental Microbiology* 2016; 82:3042–3051.
- Sanford SE, Josephson GK, MacDonald A. *Coxiella burnetii* (Q fever) abortion storms in goat herds after attendance at an annual fair. *The Canadian Veterinary Journal (La Revue Veterinaire Canadienne)* 1994; 35:376–378.
- Satta G, Chisu V, Cabras P, Fois F, Masala G. Pathogens and symbionts in ticks: A survey on tick species distribution and presence of tick-transmitted micro-organisms in Sardinia, Italy. *Journal of Medical Microbiology* 2011; 60:63–68.
- Sawyer LA, Fishbein DB, McDade JE. Q fever: current concepts. *Reviews of Infectious Diseases* 1987; 9:935–946.
- van Schaik EJ, Chen C, Mertens K, Weber MM, Samuel JE. Molecular pathogenesis of the obligate intracellular bacterium *Coxiella burnetii*. *Nature Reviews Microbiology* 2013; 11:561–573.
- Schimmer B, de Lange MMA, Hautvast JLA, Vellema P, van Duynhoven YTHP. *Coxiella burnetii* seroprevalence and risk factors on commercial sheep farms in the Netherlands. *Veterinary Record* 2014a; 175:17.

- Schimmer B, Schotten N, van Engelen E, Hautvast JLA, Schneeberger PM, van Duijnhoven YTHP. *Coxiella burnetii* seroprevalence and risk for humans on dairy cattle farms, the Netherlands, 2010–2011. *Emerging Infectious Diseases* 2014b; 20:417–425.
- La Scola B, Raoult D. Survival of *Coxiella burnetii* within free-living amoeba *Acanthamoeba castellanii*. *Clinical Microbiology and Infection* 2001; 7:75–79.
- Scott GH, Williams JC. Susceptibility of *Coxiella burnetii* to chemical disinfectants. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1990; 590:291–296.
- Sellens E, Norris JM, Dhand NK, Heller J, Hayes L, Gidding HF, Willaby H, Wood N, Bosward KL. Willingness of veterinarians in Australia to recommend Q fever vaccination in veterinary personnel: implications for workplace health and safety compliance. *PLoS One* 2018; 13:e0198421.
- Seshadri R, Paulsen IT, Eisen JA, Read TD, Nelson KE, Nelson WC, Ward NL, Tettelin H, Davidsen TM, Beanan MJ, Deboy RT, Daugherty SC, Brinkac LM, Madupu R, Dodson RJ, Khouri HM, Lee KH, Carty HA, Scanlan D, Heinzen RA, Thompson HA, Samuel JE, Fraser CM, Heidelberg JF. Complete genome sequence of the Q-fever pathogen *Coxiella burnetii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2003; 100:5455–5460.
- Shannon JG, Howe D, Heinzen RA. Virulent *Coxiella burnetii* does not activate human dendritic cells: role of lipopolysaccharide as a shielding molecule. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005; 102:8722–8727.
- Shapiro AJ, Norris JM, Heller J, Brown G, Malik R, Bosward KL. Seroprevalence of *Coxiella burnetii* in Australian dogs. *Zoonoses and Public Health* 2016; 63:458–466.
- Simten Y, Turan Y, Hakan S, Servet B. Diagnosis of Q fever and Brucellosis in aborted ovine fetuses by microbiological, pathological and immunohistochemical methods. *Acta Veterinaria-Beograd* 2018; 68:168–177.
- Slabá K, Skultéty L, Toman R. Efficiency of various serological techniques for diagnosing *Coxiella burnetii* infection. *Acta Virologica* 2005; 49:123–127.
- Slot E, Hogema BM, Molier M, Zaaijer HL. Screening of blood donors for chronic *Coxiella burnetii* infection after large Q fever outbreaks. *Transfusion* 2014; 54:2867–2870.
- Smith DJW. Studies in the epidemiology of Q fever. 3. The transmission of Q fever by the tick *Haemaphysalis humerosa*. *Australian Journal of Experimental Biology and Medical*

- Science* 1940; 18:103-118.
- Smith DJW, Derrick EH. *Studies in the epidemiology of Q fever. I. The isolation of six strains of Rickettsia burnetii from the tick Haemaphysalis humerosa. Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science* 1940; 18:1-8.
- Smith TA, Driscoll T, Gillespie JJ, Raghavan R. *A Coxiella-like endosymbiont is a potential vitamin source for the Lone Star tick. Genome Biology and Evolution* 2015; 7:831-838.
- Socolovschi C, Reynaud P, Kernif T, Raoult D, Parola P. *Rickettsiae of spotted fever group, Borrelia valaisiana, and Coxiella burnetii in ticks on passerine birds and mammals from the Camargue in the south of France. Ticks and Tick-Borne Diseases* 2012; 3:355-360.
- Španović M, Mikov I, Glavaški Kraljević M, Prokeš B, Peričević Medić S, Turkalj I. *Epidemiological characteristics of occupational anthroponoses in the Autonomous province of Vojvodina. Medicinski Pregled* 2017; 70:425-432.
- Spitalská E, Kocianová E. *Detection of Coxiella burnetii in ticks collected in Slovakia and Hungary. European Journal of Epidemiology* 2003; 18:263-266.
- Sprong H, Tjisse-Klasen E, Langelaar M, De Bruin A, Fonville M, Gassner F, Takken W, van Wieren S, Nijhof A, Jongejan F, Maassen CB, Scholte EJ, Hovius JW, Emil Hovius K, Spitalská E, van Duynhoven YT. *Prevalence of Coxiella burnetii in ticks after a large outbreak of Q fever. Zoonoses and Public Health* 2012; 59:69-75.
- Spyridaki I, Psaroulaki A, Loukaides F, Antoniou M, Hadjichristodolou C, Tselentis Y. *Isolation of Coxiella burnetii by a centrifugation shell-vial assay from ticks collected in Cyprus: detection by nested polymerase chain reaction (PCR) and by PCR-restriction fragment length polymorphism analyses. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2002; 66:86-90.
- Stein A, Raoult D. *Detection of Coxiella burnetii by DNA amplification using polymerase chain reaction. Journal of Clinical Microbiology* 1992; 30:2462-2466.
- Sukara R, Chochlakis D, Ćirović D, Penezić A, Mihaljica D, Ćakić S, Valčić M, Tselentis Y, Psaroulaki A, Tomanović S. *Golden jackals (Canis aureus) as hosts for ticks and tick-borne pathogens in Serbia. Ticks and Tick-Borne Diseases* 2018; 9:1090-1097.
- Soraka S, Toman R, Skultety L, Slaba K, Homan WL. *Establishment of a genotyping scheme for Coxiella burnetii. FEMS Microbiology Letters* 2006; 254:268-274.
- Tan C, Owens L. *Infectivity, transmission and 16S rRNA sequencing of a rickettsia, Coxiella*

- cheraxi* sp. nov., from the freshwater crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Diseases of Aquatic Organisms* 2000; 41:115–122.
- Thompson HA, Hoover TA, Vodkin MH, Shaw EI. Do chromosomal deletions in the lipopolysaccharide biosynthetic regions explain all cases of phase variation in *Coxiella burnetii* strains? An update. *Annals of the New York Academy Sciences*, 2003; 990:664–670.
- Tissot-Dupont H, Torres S, Nezri M, Raoult D. Hyperendemic focus of Q fever related to sheep and wind. *American Journal of Epidemiology* 1999; 150:67–74.
- Tissot-Dupont H, Amadei M-A, Nezri M, Raoult D. Wind in November, Q fever in December. *Emerging Infectious Diseases* 2004; 10:1264–1269.
- Tissot-Dupont H, Raoult D. Q Fever. *Infectious Disease Clinics of North America* 2008; 22:505–514.
- Toledo A, Jado I, Olmeda AS, Casado-Nistal MA, Gil H, Escudero R, Anda P. Detection of *Coxiella burnetii* in ticks collected from central Spain. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 2009; 9:465–468.
- Tomanović S, Chochlakis D, Radulović Ž, Milutinović M, Ćakić S, Mihaljica D, Tselentis Y, Psaroulaki A. Analysis of pathogen co-occurrence in host-seeking adult hard ticks from Serbia. *Experimental and Applied Acarology* 2013; 59:367–376.
- Torina A, Caracappa S. Dog tick-borne diseases in Sicily. *Parassitologia* 2006; 48:145–147.
- Tozer SJ, Lambert SB, Sloots TP, Nissen MD. Q fever seroprevalence in metropolitan samples is similar to rural/remote samples in Queensland, Australia. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology* 2011; 30:1287–1293.
- Tozer SJ, Lambert SB, Strong CL, Field HE, Sloots TP, Nissen MD. Potential animal and environmental sources of Q fever infection for humans in Queensland. *Zoonoses and Public Health* 2014; 61:105–112.
- Vidić B, Boboš S, Savić S, Prica N. Nalaz *Coxiella burnetii* u mleku i njen značaj za nastanak infekcija kod ljudi. *Savremena Poljoprivreda* 2008; 57:208–214.
- Voth DE, Heinzen RA. Lounging in a lysosome: the intracellular lifestyle of *Coxiella burnetii*. *Cellular Microbiology* 2007; 9:829–840.
- Wade AJ, Cheng AC, Athan E, Molloy JL, Harris OC, Stenos J, Hughes AJ. Q Fever outbreak

at a cosmetics supply factory. *Clinical Infectious Diseases* 2006; 42:e50–2.

Watanabe M, Nakao R, Amin-Babjee SM, Maizatul AM, Youn JH, Qiu Y, Sugimoto C, Watanabe M. Molecular screening for *Rickettsia*, *Anaplasmatataceae* and *Coxiella burnetii* in *Rhipicephalus sanguineus* ticks from Malaysia. *Tropical Biomedicine* 2015; 32:390–398.

Weisburg WG, Dobson ME, Samuel JE, Dasch GA, Mallavia LP, Baca O, Mandelco L, Sechrest JE, Weiss E, Woese CR. Phylogenetic diversity of the *Rickettsiae*. *Journal of Bacteriology* 1989; 171:4202–4206.

Zhang GQ, Nguyen S V, To H, Ogawa M, Hotta A, Yamaguchi T, Kim HJ, Fukushi H, Hirai K. Clinical evaluation of a new PCR assay for detection of *Coxiella burnetii* in human serum samples. *Journal of Clinical Microbiology* 1998; 36:77–80.

Biografija

Danica Bogunović rođena je 08.05.1985. godine u Beogradu. Srednju školu „Osam beogradska gimnazija“ u Beogradu završila je 2003. godine. Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu upisala je školske 2003/2004. godine, a diplomirala 2010. godine, sa prosečnom ocenom 8,56. Doktorske akademske studije na Fakultetu veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu upisala je školske 2011/2012. godine i položila sve ispite predviđene planom i programom doktorskih akademskih studija, sa prosečnom ocenom 9,67. Stručnu praksu obavila je na Katedri za hirurgiju, ortopediju i oftalmologiju Fakulteta veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu i položila stručni ispit. Od 2012. godine zaposlena je kao istraživač pripravnik na projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja pod nazivom „Razvoj i standardizacija molekularnih i imunskih metoda u dijagnostici bakterijskih zoonoza“ (ev. br. TR 31088), čiji je rukovodilac prof. dr Sonja Radojčić. U zvanju asistenta na Katedri za parazitologiju Fakulteta veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu zaposlena je od 2014. godine i aktivno učestvuje u izvođenju praktičnog dela nastave. U okviru programa razmene studenata doktorskih akademskih studija CEEPUS, 2016. godine boravila je u Zavodu za parazitologiju i invazijske bolesti s klinikom, Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Hrvatska.

Kao autor ili koautor do sada je objavila 13 radova od čega su četiri rada objavljena u časopisima međunarodnog značaja (jedan M22 i tri M23), dva rada u vodećem časopisu nacionalnog značaja (M52), jedno saopštenje na skupu međunarodnog značaja (M34), kao i šest saopštenja štampanih u celini ili u izvodu na skupovima nacionalnog značaja (jedan M63 i dva M64).

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписана: Даница Р. Богуновић

број уписа 17/11

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом:

„Молекуларна и серолошка истраживања присуства бактерије *Coxiella burnetii* у ткивима паса и крпељима (Acari: Ixodidae) сакупљеним са испитиваних животиња“

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

Потпис докторанда

У Београду, 28.09.2018.



Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора: Даница Р. Богуновић

Број уписа: 17/11

Студијски програм: Докторске академске студије

Наслов рада: „Молекуларна и серолошка истраживања присуства бактерије *Coxiella burnetii* у ткивима паса и крпељима (Acari: Ixodidae) сакупљеним са испитиваних животиња“

Ментор: Др Зоран Кулишић, редовни професор

Др Соња Радојичић, редовни професор

Потписани: Даница Р. Богуновић

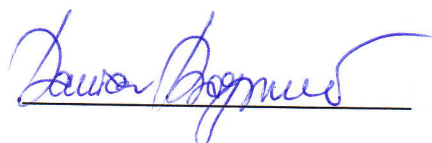
изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предала за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

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

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

Потпис докторанда

У Београду, 28.09.2018.



Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

„Молекуларна и серолошка истраживања присуства бактерије *Coxiella burnetii* у ткивима паса и крпељима (Acari:Ixodidae) сакупљеним са испитиваних животиња“,

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предала сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

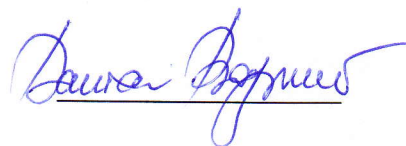
Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучила.

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

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

Потпис докторанда

У Београду, 28.09.2018.



1. Ауторство - Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.