

Bruceloza u pasa

Škiljan, Nika

Master's thesis / Diplomski rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Veterinary Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Veterinarski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:178:872110>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-29**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Veterinary Medicine -
Repository of PHD, master's thesis](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
VETERINARSKI FAKULTET

SVEUČILIŠNI INTEGRIRANI PRIJEDIPLOMSKI I DIPLOMSKI
STUDIJ *VETERINARSKA MEDICINA*

DIPLOMSKI RAD

Nika Škiljan

Bruceloza u pasa

Zagreb, 2024.

Ime i prezime studenta: Nika Škiljan

Naziv odjela, zavoda ili klinike:

Odjel za veterinarsko javno zdravstvo i sigurnost hrane, Zavod za mikrobiologiju i zarazne bolesti s klinikom

Odjel klinika Veterinarskoga fakulteta, Klinika za porodništvo i reprodukciju

Predstojnik: prof. dr. sc. Vilim Starešina, redoviti profesor

prof. dr. sc. Tugomir Karadjole, redoviti profesor u trajnom izboru

Mentori: izv. prof. dr. sc. Josipa Habuš, izvanredna profesorica

prof. dr. sc. Silvijo Vince, redoviti profesor

Članovi Povjerenstva za obranu diplomskog rada:

1. Doc. dr. sc. Matko Perharić, docent
2. Izv. prof. dr. sc. Suzana Hađina, izvanredna profesorica
3. Izv. prof. dr. sc. Josipa Habuš, izvanredna profesorica
4. Prof. dr. sc. Silvijo Vince (zamjena), redoviti profesor

Rad sadržava 46 stranica, 10 slika, 2 tablice i 37 literaturnih navoda

ZAHVALA

Zahvaljujem mentorima, izv. prof. dr. sc. Josipi Habuš i prof. dr. sc. Silviju Vince na stručnom vodstvu, korisnim savjetima, strpljenju, te uloženom trudu i vremenu tijekom izrade ovog diplomskog rada.

Veliko hvala svim djelatnicima Klinike za zarazne bolesti na pruženom povjerenju i na svemu naučenom tijekom (gotovo) 3 predivne godine provedene na Klinici.

Posebna hvala svim mojim prijateljima i dragim kolegama volonterima koji su mi uljepšali razdoblje provedeno na faksu i s kojima sam stvorila divne uspomene za cijeli život.

Na kraju, posebna hvala mojoj obitelji za podršku i razumijevanje tijekom svih godina studiranja.

POPIS KRATICA

B. canis – *Brucella canis*

B. melitensis - *Brucella melitensis*

B. abortus – *Brucella abortus*

B. suis – *Brucella suis*

B. ovis – *Brucella ovis*

H₂S – Sumporovodik

JTK – jedinica tvorbe kolonija (engl. *Colony forming units* - CFU)

EU – Europska Unija

WHO (engl. *World Health Organization*) – Svjetska zdravstvena organizacija

WOAH (engl. *World Organisation for Animal Health*) – Svjetska organizacija za zdravlje životinja

PCR (engl. *Polymerase chain reaction*) – Lančana reakcija polimerazom

RT-PCR (engl. *Real time PCR*) – Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu

TNF (engl. *Tumor necrosis factor*) – Faktor tumorske nekroze

RES – Rana embrionalna smrtnost

T4SS IV (engl. *Type IV secretion system*) – Sekrecijski sustav tipa 4

RTG – Rendgen

UZV – Ultrazvuk

CT (engl. *Computerized tomography*) – Kompjuterizirana tomografija

MRI (engl. *Magnetic resonance imaging*) – Magnetska rezonanca

RSAT (engl. *Rapid slide agglutination test*) – Brzi aglutinacijski test na predmetnici

ME-RSAT (engl. *Mercaptoethanol RSAT*) – Merkaptoetanol RSAT ili modificirani RSAT

TAT (engl. *Tube agglutination test*) – Spora aglutinacija u epruveti

GDP (engl. *Agar gel immunodiffusion - AGID*) – Gel difuzijska precipitacija

IFA (engl. *Immunofluorescence assay*) – Test imunofluorescencije

ELISA (engl. *Enzyme-linked immunosorbent assay*) – Imunoenzimski test

MAT – Mikroaglutinacijski test

DNA – Deoksiribonukleinska kiselina

RVK – Reakcija vezanja komplemenata (engl. *Complement fixation*)

MALDI - TOF MS (engl. *Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry*) - Matricom potpomognuta laserska desorpcija/ionizacija spregnuta sa spektrometrijom masa temeljenom na vremenu leta iona

PO (*per os*) – Unošenje lijeka peroralno; preko usta

IM – Unošenje lijeka intramuskularno, u mišić

SC – Unošenje lijeka supkutano, pod kožu

CRP - C reaktivni protein

HIV (engl. *Human immunodeficiency virus*) – Virus humane imunodeficijencije

POPIS PRILOGA

Popis slika:

Slika 1. Geografski prikaz objavljenih seroloških istraživanja bruceloze u pasa. Svaka točka predstavlja objavljenu studiju, a boja točke predstavlja utvrđenu seroprevalenciju.

Slika 2. Patogeneza i ciljni organi vrste *B. canis*.

Slika 3. Imunohistokemijskom metodom prikazana *B. canis* unutar citoplazme trofoblasta.

Slika 4. Prikaz placente i opsežnih nekrotičnih područja (označeno zvjezdicom -*) koja karakteriziraju nekrotični placentitis.

Slika 5. Povećani rep nuzsjemenika eksperimentalno inficiranog psa 60 dana nakon inokulacije uzročnika (lijevo), te nuzsjemenik i testis neinficiranog psa (desno).

Slika 6. Povećani desni testis i crvenilo mošnje u psa s brucelozom uzrokovanom vrstom *B. canis*.

Slika 7. Rendgenogram prsnog dijela kralježnice s diskospondilitisom uzrokovanim vrstom *B. canis* u međukralježničnom prostoru T7-T8 i vidljivom ventralnom spondilozom i kolapsom međukralježničkog prostora.

Slika 8. Rendgenski prikaz karakterističnih litičkih (tzv. *Hole punch*) lezija u psa sa diskospondilitisom uzrokovanim *B. canis*.

Slika 9. Karakteristične litičke (tzv. *Hole punch*) lezije prikazane magnetskom rezonancom.

Slika 10. (A) Uveitis i (B) zacijeljene korioretinalne lezije (označene strelicama) u psa s brucelozom.

Popis tablica:

Tablica 1. Vrste unutar roda *Brucella* koje mogu uzrokovati infekciju u pasa i njihovi domaćini.

Tablica 2. Antimikrobni pripravci čije su kombinacije pokazale najbolje rezultate u liječenju bruceloze pasa uzrokovane vrstom *B. canis*.

SADRŽAJ:

1. UVOD	1
2. PREGLED REZULTATA DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA	2
2.1. Povijest	2
2.2. Geografska proširenost	3
2.3. Etiologija	4
2.4. Epizootiologija	6
2.5. Patogeneza	10
2.6. Klinička slika i patološke promjene	13
2.7. Dijagnostika	25
2.7.1. Serološke pretrage	25
2.7.2. Bakterijska izolacija i identifikacija	29
2.7.3. Molekularne pretrage	30
2.8. Liječenje i prevencija	31
2.9. Javno zdravstvo	36
3. ZAKLJUČCI	38
4. LITERATURA	39
5. SAŽETAK	44
6. SUMMARY	45
7. ŽIVOTOPIS	46

1. UVOD

Bruceloza je zarazna bolest ljudi i životinja uzrokovana bakterijama iz roda *Brucella*. Primarnim uzročnikom bruceloze u pasa smatra se *Brucella canis* (*B. canis*), čiji je prirodni rezervoar upravo pas. Ipak, u pasa koji su bili u kontaktu s drugim vrstama domaćih životinja utvrđene su infekcije i drugim vrstama iz ovog roda kao što su *Brucella melitensis* (*B. melitensis*), *Brucella abortus* (*B. abortus*) i *Brucella suis* (*B. suis*).

Nakon infekcije, najveće koncentracije brucela nalazimo u posteljici, pobačenim plodovima, vaginalnom iscjetku kuja, te ejakulatu i mokraći muških životinja. Druge tjelesne izlučevine sadrže manju količinu bakterija pa su stoga i manje važne u širenju ove bolesti. Kliničko očitovanje bolesti je raznoliko. U oba spola vrlo su česti subklinički oblici bolesti. Ukoliko dođe do kliničkog očitovanja, ono se u mužjaka se najčešće povezuje s kliničkim znakovima epididimitisa, orhitisa i prostatitisa, često praćenih neplodnošću. Kod gravidnih kuja bolest će se očitovati pobačajem praćenim vaginalnim iscjetkom. Iako kuja može pobaciti i nekoliko puta uzastopce, bruceloza neće utjecati na estrusni ciklus niti će izazvati trajnu neplodnost. U oba spola relativno se često može javiti diskospondilitis, uveitis i endoftalmitis, a rjeđe i poliartritis, osteomijelitis, glomerulonefritis i meningoencefalitis. Bolest se objektivno dijagnosticira uporabom bakterioloških, seroloških i molekularnih metoda. Zbog kroničnog tijeka bolesti, brzog širenja među psima unutar uzgoja/skupine, vrlo lošeg odgovora na liječenje antibioticima te opasnosti koje zaražene životinje predstavljaju za veterinare i vlasnike često se umjesto liječenja predlaže eutanazija.

U znanstvenoj, ali i široj javnosti bruceloza u pasa sve je češća i važnija tema. Naime od 2020. godine bilježi se izraziti porast učestalosti ove bolesti u zapadnoj Europi koja se povezuje s porastom uvoza zaraženih pasa s područja istočne Europe. Tijekom 2021. zabilježeni su i prvi slučajevi infekcije ljudi *B. canis* u Nizozemskoj, a 2023. u Velikoj Britaniji.

Cilj ovog rada je podići svijest veterinaru praktičara o brucelozi u pasa, olakšati procjenu mogućih rizika te općenito omogućiti bolje poznavanje ove bolesti. U tu svrhu objediniti će se najnovije spoznaje iz područja etiologije, epizootiologije, patogeneze, kliničke slike, dijagnostike, liječenja i preventive bruceloze u pasa.

2. PREGLED REZULTATA DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA

2.1. Povijest

Smatra se da je bolest u tipu bruceloze prvi opisao Hipokrat u svojim spisima zvanim „*Epidemics*“, te da je od nje obolio apostol Pavao tijekom svog posjeta otoku Malti. Prvi službeni opisi bolesti i uzročnika zapravo potječu iz vremena Krimskog rata. Britanski vojni kirurg Jefferey Allen Marston 1861. opisuje bolest od koje umire velik broj britanskih vojnika na Malti i naziva ju mediteranskom gastričnom povratnom groznicom. I škotski liječnik Sir David Bruce je služeći u *Royal Army Medical Corps* istraživao slučajeve neobične bolesti koja je zahvatila mnogo britanskih vojnika na Malti, te na kraju i opisao bakteriju koju je izdvojio iz slezene umrlog vojnika. Uzročnika se prvo naziva *Micrococcus melitensis*, a kasnije *Brucella melitensis*, a bolest dobiva ime melitokokoza ili Malteška groznica, po mjestu na kojem je otkrivena. Godine 1905. Themistocles Zammit dokazao je da je nepasterizirano mlijeko zaražene životinje izvor zaraze čak i ako sama životinja ne pokazuje znakove bolesti (WYATT, 2013.).

Prvi slučaj zaraze u pasa zabilježen je i objavljen 1913. godine, no tada nije bila riječ o infekciji bakterijom *Brucella canis*, već vrstom *Brucella suis* (HOLLETT, 2006.). Pobačaji i reproduktivni poremećaji zabilježeni su u uzgajivačnicama pasa 1963. godine diljem Sjedinjenih Američkih Država (SAD) (HOLLETT, 2006.), a vrstu *B. canis* prvi je puta izolirao Leland Carmichael tek 1966. godine iz pobačenih plodova u uzgajivačnici biglova, također u SAD-u (DE MASSIS i sur., 2022.; SYKES, 2023.). U početku se smatralo da je *Brucella canis* jedan od biotipova vrste *Brucella suis*, a i danas je, zbog njihovih genotipskih i fenotipskih sličnosti, izazovno razlikovati ju od biotipa 3 vrste *B. suis* (COSFORD, 2018.). Prvi slučajevi infekcije ljudi bakterijom *B. canis* zabilježeni su 1968. godine, u ljudi koji su bili u kontaktu s inficiranim psima (SANTOS i sur., 2021.).

2.2. Geografska proširenost

Brucella canis proširena je diljem svijeta. Endemična je u dijelovima Sjeverne, Centralne i Južne Amerike (VAN DIJK i sur., 2021.), Kini, Japanu (HENSEL i sur., 2018.), Koreji i dijelovima Afrike (PARK i sur., 2023.), a sporadično se javlja i u Europi i drugim dijelovima svijeta, s izuzetkom Australije i Novog Zelanda. U Australiji se vrlo rijetko prijavljuju slučajevi bruceloze u pasa, ali uzrokovane drugim vrstama brucela (BUHMANN i sur., 2019.). Serološka istraživanja provedena u sedamdesetim i osamdesetim godinama prošlog stoljeća ukazuju na vrlo varijabilnu seroprevalenciju od 1 do 28%. Novija istraživanja, provedena tijekom zadnja dva desetljeća u Africi, Aziji i Južnoj Americi bilježe nešto viši raspon seroprevalencije od 6 do 35% (Slika 1) (HENSEL i sur., 2018.).



Slika 1. Geografski prikaz objavljenih seroloških istraživanja bruceloze u pasa. Svaka točka predstavlja objavljenu studiju, a boja točke predstavlja utvrđenu seroprevalenciju (Izvor: HENSEL i sur., 2018.).

Bilježi se i porast pojavnosti bruceloze u pasa u Sjeverozapadnim Europskim državama kao što su Švedska, Ujedinjeno Kraljevstvo (UK), Nizozemska, ali i Austrija i Mađarska (BUHMANN i sur., 2019.). U Nizozemskoj je *Brucella canis* prvi put izdvojena tek u studenom

2016. godine iz psa uvezenog iz Rumunjske, a iste godine još je u nekoliko slučajeva potvrđena zaraza u pasa uvezenih i iz Bugarske, te iz Hrvatske (VAN DIJK i sur., 2021.). U Ujedinjenom Kraljevstvu bilježi se porast u broju slučajeva od ljeta 2020. godine također u pasa uvezenih uglavnom iz Rumunjske i Bugarske, Irske i Španjolske, ali i Hrvatske, Srbije i Bosne i Hercegovine kao i iz mnogo drugih zemalja Jugoistočne Europe (APHA, 2024.).

2.3. Etiologija

Brucella canis je bakterija koja pripada porodici *Brucellaceae*, redu *Hyphomicrobiales*, razredu *Alphaproteobacteria* i koljenu *Pseudomonadota*. U porodicu *Brucellaceae* spada nekoliko rodova: *Brucella*, *Ochrobactrum*, rod *Daeguia*, *Falsochrobactrum*, rod *Paenorhrobactrum*, te rod *Pseudorchrobactrum* (SCHOCH i sur., 2020.). Unutar roda *Brucella* razlikujemo 12 vrsta od kojih četiri može uzrokovati infekciju u pasa (COSFORD, 2018.). Većina bakterija iz roda *Brucella*, osim nekih biovara vrste *B. suis*, pokazuje sklonost infekciji određenog domaćina, no i dalje su sposobne inficirati i druge vrste životinja, odnosno ljude (Tablica 1).

Tablica 1. Vrste unutar roda *Brucella* koje mogu uzrokovati infekciju u pasa i njihovi domaćini (Izvor: NAGLIĆ i sur., 2005.; COSFORD 2018.; SYKES, 2023.).

Uzročnik	Prirodni domaćin	Prijemljive vrste
<i>Brucella canis</i>	psi i divlji kanidi	čovjek
<i>Brucella abortus</i>	govedo	čovjek, pas, ovca, koza, konj, deva, svinja, bizon, jak, jelen
<i>Brucella suis</i>	svinja	biovari 1 i 3 su patogeni za ljude; pas, zec, sob, sjevernoamerički sob
<i>Brucella melitensis</i>	ovca, koza	čovjek, pas, govedo, deva, alpaka, ljama

Brucella canis ima ograničen raspon domaćina koje inficira: psi i divlji kanidi se smatraju prirodnim domaćinima, dok je za druge domaće životinje, glodavce i ljude slabije patogena (SYKES, 2023.; CVETNIĆ, 2015.). Ipak ne smije se zanemariti činjenica da *Brucella canis* ima zoonotski potencijal i predstavlja nezanemarlivu opasnost za ljudsko zdravlje (SYKES, 2023.). Goveda, ovce i svinje otporni su na infekciju vrstom *B. canis* (CVETNIĆ, 2015.). Iako se smatra da su i mačke vrlo slabo prijemljive na infekciju, protutijela na *B. canis* su ipak pronađena u krvi domaćih i divljih mačaka, te nekih divljih mesoždera u zatočeništvu i u prirodi (SANTOS i sur. 2021.).

Kao i ostale vrste iz roda, *B. canis* je mali, aerobni, gram negativni kokobacil. Fakultativno je intracelularna, ne sporulira, nepokretna je i ne kapsulira (COSFORD, 2018.). Sve vrste iz roda *Brucella* duljine su od 0,6 do 1,5 μm i širine od 0,5 do 0,7 μm (DE MASSIS i sur., 2022.). *B. canis* raste u aerobnim uvjetima na 37°C dva do tri dana (NAGLIĆ i sur., 2005.), no GRAHAM i sur. (2022.) spominju dva slučaja u kojima je porast bakterija zabilježen tek petog dana inkubacije. Podloge koje se koriste za izdvajanje *B. canis* su standardne hranjive podloge koje se koriste i za izdvajanje drugih vrsta brucela: dekstrozni agar, triptoza-sojin agar (SANTOS i sur., 2021.), Thayer-Martinov (CVETNIĆ, 2015.) ili Farellov agar (COSFORD, 2018.). Za bolji rast podloga se može obogatiti dodatkom 5% ovčje krvi, dok prisutstvo CO₂ usporava rast kolonija (CVETNIĆ, 2015.). Na odgovarajućim podlogama raste obilno, kolonije su sivkastobijele do smečkaste boje, a nakon produljene inkubacije postaju sluzave i teško odvojive od podloge (NAGLIĆ i sur., 2005.). *B. canis* proizvodi ureazu, ne proizvodi H₂S, reducira nitrate i slabo je pozitivna na oksidazu (CVETNIĆ, 2015.).

Bakterije iz roda *Brucella* fenotipski se razlikuju po prisutstvu ili odsutstvu površinskog antigena stanične stijenke ili O-polisaharida. To je antigen koji se nalazi u sklopu lipopolisaharida stanične stijenke i utječe na njihovu virulenciju. Vrste koje ga posjeduju imaju morfološki glatke kolonije i smatraju se virulentnijima od onih vrsta brucela koje antigen ne posjeduju i čije su kolonije morfološki hrapave, tj. mrvičaste (LANDIS i ROGOVSKYY, 2022.). Sam lipopolisaharid stanične stijenke sastoji se od tzv. lipida A, polisaharidne jezgre, te već spomenutog O-polisaharida koji je prisutan samo u glatkim vrsta brucela (STRANAHAN i ARENAS-GAMBOA, 2021.). U glatke vrste *Brucella* spadaju *B. abortus*, *B. melitensis* i *B. suis* koje uz veću virulenciju imaju i veći zoonotski potencijal, dok hrapave kolonije i odsutan O-polisaharid, a ujedno i manji zoonotski potencijal imaju *B. canis* i *B. ovis*. Još uvijek nije poznata točna uloga O-polisaharida u patogenezi, ali važan je kao faktor virulencije jer pomaže brucelama u intracelularnom preživljavanju ometajući fagocitozu inhibicijom fuzije fagosoma i lizosoma (LANDIS i ROGOVSKYY, 2022.). Glatke vrste brucela u lipopolisaharidu svoje

stanične stijenke imaju dvije antigenske determinante: A i M koje svaka vrsta, te njeni sojevi i biovari sadrže ih u različitim omjerima, dok ih vrste *B. canis* i *B. ovis* ne posjeduju (NAGLIĆ i sur., 2005.). Kolonije vrsta *B. canis* i *B. ovis* uvijek rastu u R fenotipu tj. morfološki su suhe i mrvičaste, dok kolonije vrsta *B. abortus*, *B. melitensis* i *B. suis* rastu u S fenotipu: morfološki su glatke, sjajne i prozirne, ali precjepivanjem prelaze u R fenotip i gube virulenciju (NAGLIĆ i sur., 2005.). Rast kolonija vrste *B. canis* u S ili glatkom obliku nikada nije zabilježen (DE MASSIS i sur., 2022.), ali imaju svoje jedinstveno svojstvo: uvijek su sluzave (CVETNIĆ, 2015.). Osim standardnog, otkriven je i M-soj ili manje mukoidan soj vrste *B. canis* koji se koristi kao antigen u serološkim testovima (COSFORD, 2018.). Smatra se avirulentnim za pse no 2004. godine zabilježen je slučaj zaraze laboratorijskog djelatnika upravo tim sojem (WALLACH i sur., 2004.).

B. canis ne preživljava dugo izvan domaćina i lako se inaktivira standardnim dezinficijensima kao što su kvartarni amonijevi spojevi, 1% natrijev hipoklorit, 70% etanol, otopine alkohola/joda, vodikov peroksid (SYKES, 2023.), glutaraldehid i formaldehid. Ipak, prisutstvo organske tvari i niskih temperatura mogu značajno oslabiti djelovanje dezinficijensa stoga je preporučeno za površine koristiti 2.5% natrijev hipoklorit i ostaviti ga da djeluje barem jedan sat. Za dekontaminaciju tjelesnih površina koriste se 70% etanol i otopine joda. Medicinsku se opremu preporuča dekontaminirati u autoklavu na 121°C kroz najmanje 15 minuta ili suhom sterilizacijom na 160 do 170°C barem 1 sat. Prokuhavanje u periodu od deset minuta također uništava uzročnika (SANTOS i sur., 2021.).

2.4. Epizootiologija

Rezervoari bakterije *B. canis* su domaći psi, naročito psi lugalice i divlji psi ali druge vrste iz porodice *Canidae* (HOLLETT, 2006.). Unatoč činjenici da su psi prirodni domaćini vrste *B. canis*, važno je napomenuti da se psi mogu zaraziti i drugim vrstama iz roda *Brucella*: *B. melitensis*, *B. suis*, *B. abortus*, čak i atenuiranim sojevima vrste *B. abortus* iz cjepiva, ali takve su infekcije rjeđe i javljaju se sporadično (SYKES, 2023.). Rizik za zarazu pasa glatkim vrstama brucela predstavlja kontakt sa zaraženim farmskim životinjama, kao i sa zaraženim divljim životinjama, posebice divljim svinjama. Psi se mogu zaraziti i ingestijom sirovog mesa i nepasteriziranih mliječnih proizvoda od zaraženih životinja (HELMS i sur., 2021.).

Primarni izvor infekcije vrstom *B. canis* su reproduktivni sekreti bolesnih životinja i životinja kliconoša. Brucele se vaginalnim iscjetkom izlučuju čak i do šest tjedana nakon pobačaja, ali i tijekom estrusa, proestrusa i za vrijeme parenja i to u koncentraciji i do 10^{10} mikroorganizama/ml (CVETNIĆ, 2015.). Kao izvor zaraze naročito je bitan i pobačeni

materijal: plod, placenta te plodne vode koje također sadrže izrazito velik broj mikroorganizama: 10^6 /ml (COSFORD, 2018.), čak i 10^{10} /ml (SYKES, 2023.). Kod mužjaka, koncentracija bakterija najviša je u ejakulatu prvih 6 do 8 tjedana nakon infekcije, a nakon toga se isprekidano izlučuje u manjim koncentracijama kroz 60 tjedana (SYKES, 2023.), pa i do dvije godine (COSFORD, 2018.; SYKES, 2023.). Mužjaci mogu ostati izvor zaraze čak i nakon kastracije jer se *B. canis* zadržava u prostati i limfatičnim tkivima (DE MASSIS i sur., 2022.).

Urinom se uzročnik počinje izlučivati 4-8 tjedana nakon početka bakterijemije i nastavlja se izlučivati najmanje tri mjeseca u koncentracijama od 10^3 do 10^6 bakterija/ml (SYKES, 2023.). Urin muških životinja je puno značajniji izvor zaraze od urina ženki, najvjerojatnije zbog lokalizacije uzročnika u prostati, nuzsjemeniku, te ejakulatu koji kontaminira uretru. *B. canis* izlučuje se i fecesom, slinom, te nosnim i očnim iscjetkom, ali u relativno niskom koncentracijama (DE MASSIS i sur., 2022.).

Jedan od najčešćih načina prijenosa infekcije je prijenos spolnim putem. Bitan su način prijenosa i ingestija ili direktni kontakt s kontaminiranim materijalom (HENSEL, 2018.), te kohabitacija: zaraza najčešće izbija u uvjetima kada mnogo pasa boravi na istom mjestu kao npr. u uzgajivačnicama i skloništima. Prijenos je, osim tijekom reproduktivnih, čest i tijekom socijalnih aktivnosti u pasa (DE MASSIS i sur., 2022.). Od ostalih načina prijenosa infekcije spominje se vertikalni prijenos na potomke koji može ići transplacentarno ili putem mlijeka. Ipak, iako mlijeko inficiranih kuja sadrži vrlo velik broj uzročnika smatra se da nije važan izvor zaraze za štenad budući se ona inficira još intrauterino (CVETNIĆ, 2015.). Neonatalna smrtnost vrlo je visoka, no ukoliko intrauterino inficirana štenad uspije preživjeti ostaje perzistentno inficirana i predstavlja doživotni izvor zaraze (SANTOS i sur., 2021.). Osim ovih uobičajenih načina prijenosa opisuju se još i prijenosi preko ozlijeđene kože odnosno direktnom inokulacijom kroz kožu, transfuzijom krvi, te preko kontaminiranih igala, vaginoskopima i opremom za umjetno osjemenjivanje (COSFORD, 2018.; SYKES, 2023.). *B. canis* je izdvojena iz krpelja i buha, no njihova uloga u prijenosu bolesti još nije potvrđena (SANTOS i sur., 2021.). Ipak ovo otkriće treba vrlo oprezno razmatrati obzirom da se u vrijeme rane bakterijemije u krvi može nalaziti i do 10^3 uzročnika u mililitru krvi (DE MASSIS i sur., 2022.).

Ulazna vrata brucela su genitalna, konjunktivalna, te oronazalna sluznica. Bakterije mogu prodrijeti i kroz ozlijeđenu kožu. Infektivna doza ovisi o ulaznim vratima u organizam; minimalna infektivna doza za oralnu sluznicu je 2×10^6 JTK (jedinica tvorbe kolonija; engl. *Colony forming units*), za konjunktivalnu sluznicu 10^4 do 10^5 JTK, a za genitalnu sluznicu još nije utvrđena, no smatra se da je nešto niža od prethodno navedenih (DE MASSIS i sur., 2022.).

Pasminska predispozicija kod bruceloze pasa nije dokazana. Zaraziti se može svaki spolno zreli pas, neovisno o spolu (HOLLETT, 2006.), zbog čega je od velike važnosti provjera pasa na infekciju prije rasploda ili uvođenja u uzgoj. Zaraženi mogu biti i kastrirani psi, te psi koji se nikada nisu parili tj. koristili za rasplod (SYKES, 2023.). *Brucella canis* ima zoonotski potencijal te predstavlja opasnost za ljude, osobito one koji su u češćem kontaktu s psima kao što su veterinari, uzgajivači te naročito djelatnici laboratorija koji često barataju inficiranim materijalom - krvlju, urinom, ejakulatom (SANTOS i sur., 2021.). Osobito su rizične imunokompromitirane osobe (BUHMANN i sur., 2019.), djeca (HENSEL i sur., 2018.), starije (DJOKIC i sur., 2023.) i trudne osobe (HOLLETT, 2006.). Ipak, važno je naglasiti da *B. canis* ima najmanji zoonotski potencijal od svih klasičnih vrsta brucela. Slučajevi zaraze sa vrstom *B. ovis* nisu zabilježeni u ljudi, *B. abortus* i *B. suis* imaju osrednji zoonotski potencijal, dok se najpatogenijom smatra *B. melitensis* koja ima i najnižu infektivnu dozu; samo 1-10 JTK dovoljno je za infekciju čovjeka (SANTOS i sur., 2021.). COSFORD (2018.) navodi da su preživači i svinje vrlo otporni na eksperimentalnu infekciju sa *B. canis*. U eksperimentalno inficiranih mačaka, tek vrlo mali broj jedinki razvija prolaznu bakterijemiju (3 od 14 mačaka), nakon čega se u tih životinja može dokazati i relativno nizak titar protutijela (DE MASSIS i sur., 2022.) Od ostalih vrsta životinja pokazalo se da su glodavci, kunići i majmuni podložni eksperimentalnim infekcijama, s tim da kunići češće razvijaju teže kliničke oblike poput orhitisa ili peritonealnih apscesa nakon aplikacije visokih doza uzročnika intraperitonealno (DE MAIS i sur., 2022.).

Procjenjuje se da je u Europskoj Uniji (EU) trenutno oko 61 milijun pasa, a *B. canis* potvrđena je u gotovo svakoj europskoj državi. Do 2000-tih godina u Europi su glavni uzročnici bruceloze u pasa bile glatke vrste brucela: *B. abortus*, *B. suis* i *B. melitensis*, dok se *B. canis* dijagnosticirala samo u slučajevima uvezenih pasa (DJOKIC i sur., 2023.). Danas se u Europi infekcija pasa i ljudi vrstom *B. canis* najčešće prijavljuje u zemljama Istočne Europe u kojima se nalazi velik broj ilegalnih uzgajivačnica i velika populacija pasa lotalica među kojima se bolest nekontrolirano širi (DJOKIC i sur., 2023.). U tim zemljama *B. canis* najčešći je uzročnik bruceloze u pasa (APHA, 2023.). Posljednjih godina legalan, ali i ilegalan uvoz pasa u zemlje Sjeverozapadne Europe iz zemalja Jugoistočne Europe postao je trend. Istovremeno dolazi i do porasta incidencije infekcije *B. canis*. Od 2017. godine prijavljuje se porast u broju pojedinačnih slučajeva i epizootija u mnogo europskih država: Švicarskoj, Nizozemskoj, Ukrajini, Ujedinjenom Kraljevstvu, te Turskoj, ali i u drugim državama (DJOKIĆ i sur., 2023.).

Prava prevalencija bolesti nije poznata ni u Istočnoj niti u ostatku Europe budući da trenutno ne postoji obaveza testiranja pasa na brucelozu uzrokovanu sa *B. canis* prije

međunarodnog transporta, niti zapravo postoji ikakva obaveza testiranja na brucelozu. Obavezno testiranje krvi na vrstu *B. canis* provodi kao uvjet za ulazak u zemlje poput Australije, Novog Zelanda i Južne Afrike (DJOKIC i sur., 2023.), a testiranje za ulazak u Ujedinjeno Kraljevstvo se preporuča, no nije propisano zakonom (APHA, 2023.). Isto tako, Svjetska zdravstvena organizacija (engl. *World Health Organization - WHO*) (BUHMANN i sur., 2019.), EU i Svjetska organizacija za zaštitu životinja (engl. *World Organisation for Animal Health - WOAH*) ovu bolest ne uvode na listu zaraznih bolesti koje se po zakonu trebaju prijaviti nadležnim tijelima (DJOKIC i sur., 2023.) i ne spominje se u Zakonu o zdravlju životinja Europske Unije (APHA, 2023.). Prijava potvrđenih slučajeva je obavezna u Ujedinjenom Kraljevstvu od 2021. godine (DJOKIC i sur., 2023.).

BUHMANN i sur. (2019.) pretražili su bazu podataka veterinarskog dijagnostičkog laboratorija u Njemačkoj koji je u periodu od 2011. do 2016. godine zaprimao uzorke za testiranje na brucelozu iz 20 europskih država. *Brucella* spp. je testom lančane reakcije polimerazom (engl. *Polymerase chain reaction - PCR*), ili preciznije testom lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (RT-PCR, engl. *Real time PCR*), dokazana u 3,7% (61/1657) uzoraka pasa, porijeklom uglavnom iz Španjolske i Poljske, rjeđe iz Italije i Francuske. Specifična protutijela na *B. canis* utvrđena su u 5,4% (150/2764) uzoraka porijeklom iz 13 država: Švedske, Belgije, Austrije, Švicarske, Italije, Francuske, Njemačke, Finske, Danske, Mađarske, Norveške, Poljske i Nizozemske. Čak 6,9 % seruma pasa iz Finske bilo je pozitivno, što nije u korelaciji s istraživanjem provedenim u Finskoj u kojem u niti jednog od 388 pasa iz 94 skloništa nisu dokazana protutijela na *B. canis*. BUHMANN i sur. (2019.) naglašavaju da u njihovom istraživanju serološki testovi nisu provedeni dvokratno tj. postoji mogućnost da nisu isključeni lažno pozitivni rezultati. Isto tako, provedeni PCR testovi nisu vrsno specifični, tako da su uzorci pozitivni samo na rod *Brucella* tj. nije isključena zaraza drugim vrstama iz roda *Brucella* u uzorcima porijeklom iz država koje nisu slobodne od bruceloze. Autori su pretražili i bazu podataka veterinarske bolnice u Njemačkoj i među podacima našli još četiri psa pozitivna na *B. canis*, a svih četiri porijeklom iz zemalja Jugoistočne Europe (Moldavije, Rumunjske i Sjeverne Makedonije).

U Nizozemskoj je prvi slučaj bruceloze u pasa potvrđen u studenom 2016. godine, u psa uvezenog iz Rumunjske, a u periodu od prvog potvrđenog slučaja do prosinca 2018. Bruceloza je potvrđena u još 18 pasa. Svi zaraženi psi uvezeni su iz zemalja Jugoistočne Europe: 7 iz Rumunjske, 10 iz Bugarske i 1 iz Hrvatske (VAN DIJK i sur., 2021.). U Nizozemsku je iz Bugarske, Rumunjske i Hrvatske u periodu od 2011. do 2015. godine legalno, a pretpostavlja se i ilegalno, uvezen velik broj pasa. Budući da testiranje pasa na zarazu vrstom *B. canis* nije

obavezno i nije uvjet za ulazak u Nizozemsku (KOLWIJCK i sur., 2022.), a svi zaraženi psi pokazali su znakove oboljenja netom nakon ulaska u zemlju, zaključuje se da su svi slučajevi bruceloze zapravo uvezeni slučajevi koji predstavljaju prijetnju domaćoj populaciji pasa, a isto tako i ljudima (VAN DIJK i sur., 2021.). Kako bi se spriječilo širenje bolesti psi bi se trebali višekratno testirati prije međunarodnih putovanja i ulaska u zemlju (VAN DIJK i sur., 2021.). Smatra se da slobodno kretanje ljudi i pasa unutar EU predstavlja velik problem za učinkovitu kontrolu zaraznih bolesti pasa (VAN DIJK i sur., 2021.).

U Ujedinjenom Kraljevstvu prijavljuje se porast u broju slučajeva bruceloze u pasa od ljeta 2020. godine. Iste godine zabilježen je porast uvoza pasa iz Rumunjske od 51% u odnosu na 2019. godinu (DJOKIC i sur., 2023.), a osim iz Rumunjske zabilježen je i porast uvoza iz Mađarske, Poljske, Bosne i Hercegovine, Cipra, Irske, Španjolske, te Rusije i Grčke (PHE, 2021.). Tijekom 2021. godine potvrđeno je 40 slučajeva infekcije *B. canis*, većinom u pasa uvezenih iz Rumunjske (DJOKIC i sur., 2023.). U periodu od listopada do prosinca 2023. godine zabilježeno je 51 serološki pozitivnih slučajeva i svih 51 povezano je s uvozom pasa u Ujedinjeno Kraljevstvo iz država poput Rumunjske, Bugarske, Hrvatske, Bosne i Hercegovine, Bjelorusije, Kine, Cipra, Grčke, Mađarske, Španjolske, Sjeverne Makedonije, Rusije i Srbije (APHA, 2024.). Potvrđeni slučajevi bruceloze u pasa uzrokovanih *B. canis* posljednjih godina su u porastu i u Francuskoj, te u Italiji gdje je 2020. zabilježena epizootija u velikoj uzgajivačnici. U Švedskoj je prvi slučaj zabilježen 2011. godine nakon reproduktivnih poteškoća u kuje za koju se iz anamneze doznaje da se parila s psom iz Srbije i Poljske (DJOKIC i sur., 2023.), a 2013. izbila je zaraza u uzgajivačnici nakon uvoza psa iz Španjolske.

2.5. Patogeneza

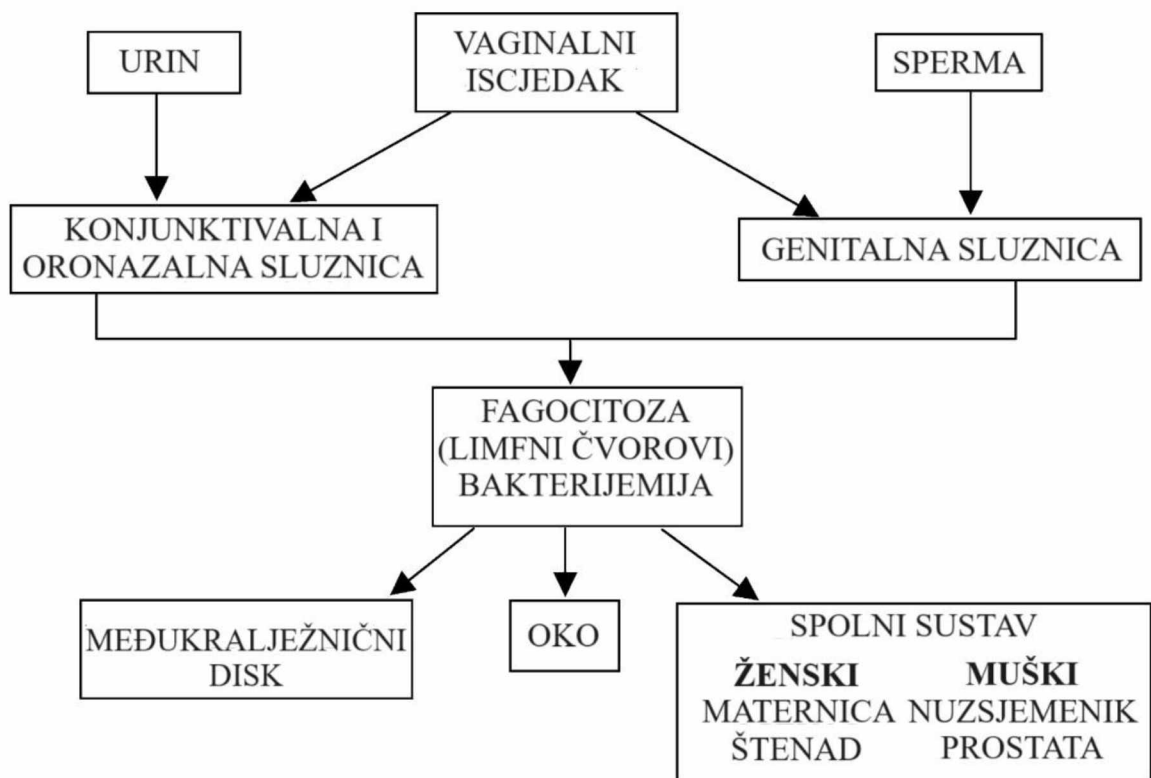
Mehanizam patogeneze vrste *B. canis* nije još u potpunosti razjašnjen (DE MASSIS i sur., 2022.), ali se pretpostavlja da je sličan onome kod drugih vrsta unutar roda *Brucella* (SANTOS i sur., 2021.). Nakon ulaska kroz konjunktivalnu, oronazalnu ili genitalnu sluznicu, ili u rjeđim slučajevima kroz kožu, brucele na ulaznom mjestu fagocitiraju stanice mononuklearnog fagocitnog sustava (COSFORD, 2018.). Bakterije iz roda *Brucella* su intracelularni organizmi koji žive i umnažaju se unutar monocita i makrofaga retikuloendotelnog sustava. Osobina brucela da ulaze u stanice jedan je od njihovih mehanizama virulencije odnosno načina da se prikriju od imunskog sustava domaćina. Kao što je već spomenuto u poglavlju o etiologiji, glatke vrste roda *Brucella* imaju O-polisaharid koji im pomaže invadirati stanicu i u njoj opstati (STRANAHAN i ARENAS-GAMBOA,

2021.). S obzirom da ne postoje konkretna istraživanja o patogenezi vrste *B. canis*, pretpostavlja se da je slična patogenezi glatkih inačica iz roda *Brucella*, čije intracelularno preživljavanje ovisi o sekrecijskom sustavu tipa IV (engl. *Type IV secretion system*, T4SS) kojim upravlja *virB* operon. Ukoliko T4SS sustav nije funkcionalan brucela se nije u mogućnosti uspješno replicirati unutar stanice domaćina (SANTOS i sur., 2021.). Ulaskom u stanicu uzročnik se nalazi u vakuoli tj. fagosomu kojeg T4SS usmjerava prema hrapavom endoplazmatskom retikulumu stanice gdje će se replicirati. Pretpostavlja se da isti T4SS ima jednako bitnu ulogu u intracelularnoj replikaciji vrste *B. canis* i *B. ovis* kao i u glatkim vrsta brucela (STRANAHAN i ARENAS-GAMBOA, 2021). Unutar stanice uzročnik također inhibira aktivnost baktericidne mijeloperoksidaze (COSFORD, 2018; SYKES, 2023.) i TNF- α (faktor tumorske nekroze, engl. *tumor necrosis factor*) (SYKES, 2023.).

Nakon ulaska u organizam, uzročnik putuje do područnih limfnih čvorova: retrofaringealnih, ingvinalnih ili superficijalnih ilijačnih gdje se odvija primarno umnažanje, nakon čega 7 do 30 dana od inicijalne izloženosti dolazi do bakterijemije (SYKES, 2023.) koja traje 3 do 4 mjeseca (COSFORD, 2018.) ili se u isprekidanim intervalima pojavljuje i do 64 mjeseca od inicijalne infekcije (WANKE, 2004.). U eksperimentalno inficiranih pasa zabilježeno je i trajanje bakterijemije od 5,5 godina (COSFORD, 2018.). U nekih pasa bakterijemija je perzistentna dok drugi sekvestiraju uzročnika u tkivu. U onim slučajevima kad *B. canis* više nije prisutna u krvi, dolazi do smanjenja titra aglutinacijskih protutijela što može predstavljati problem u dijagnostici odnosno jedinke mogu biti lažno negativne ili imati vrlo nizak titar, dok će u stvarnosti biti izvor infekcije (SYKES, 2023.). Također, psi mogu razviti bakterijemiju tek 27 do 64 mjeseca nakon inicijalne izloženosti uzročniku (SYKES, 2023.). Protutijela na vrstu *B. canis* pojavljuju se otprilike 2 do 4 tjedna nakon inicijalne infekcije, ali moguća je i tzv. „kasna reakcija“ kod koje specifična protutijela nalazimo tek 8 do 12 tjedna nakon infekcije (COSFORD, 2018.).

Sve vrste iz roda *Brucella*, pa tako i *B. canis*, imaju poseban afinitet prema reproduktivnim organima (tkivima „ovisnim o steroidima“) pa su tako ciljni organi prostata, testisi, nuzsjemenik, gravidna maternica, placenta (Slika 2) (COSFORD, 2018.) i stanice limfnog sustava (DE MASSIS i sur., 2022.; SYKES, 2023.). Nakon inicijalne replikacije u limfnim organima uzročnik krvlju putuje do ciljnih organa gdje se lokalizira i zadržava dulje vrijeme, te povremeno izlučuje. U mužjaka odlazi u prostatu, testise i nuzsjemenike (HOLLETT, 2006). Zahvaljujući toj poziciji izlučivat će se putem ejakulata, gdje će koncentracija biti izrazito visoka u prva dva mjeseca, a s vremenom će se smanjivati (HOLLETT, 2006.; SYKES, 2023.).

Sve upalne promjene (orhitis, epididimitis, prostatitis, metritis, placentitis), ali i druge lezije u reproduktivnom sustavu posljedica su nekrotizirajućeg vaskulitisa i granulomatozne upale u reproduktivnom tkivu (COSFORD, 2018.). Brucele, u pojedinim slučajevima, krvlju mogu doći i do intervertebralnih diskova, očiju, bubrega, jetre ili drugih organa i izazvati promjene u obliku diskospondilitisa, uveitisa, glomerulonefritisa ili meningoencefalitisa (SYKES, 2023.).

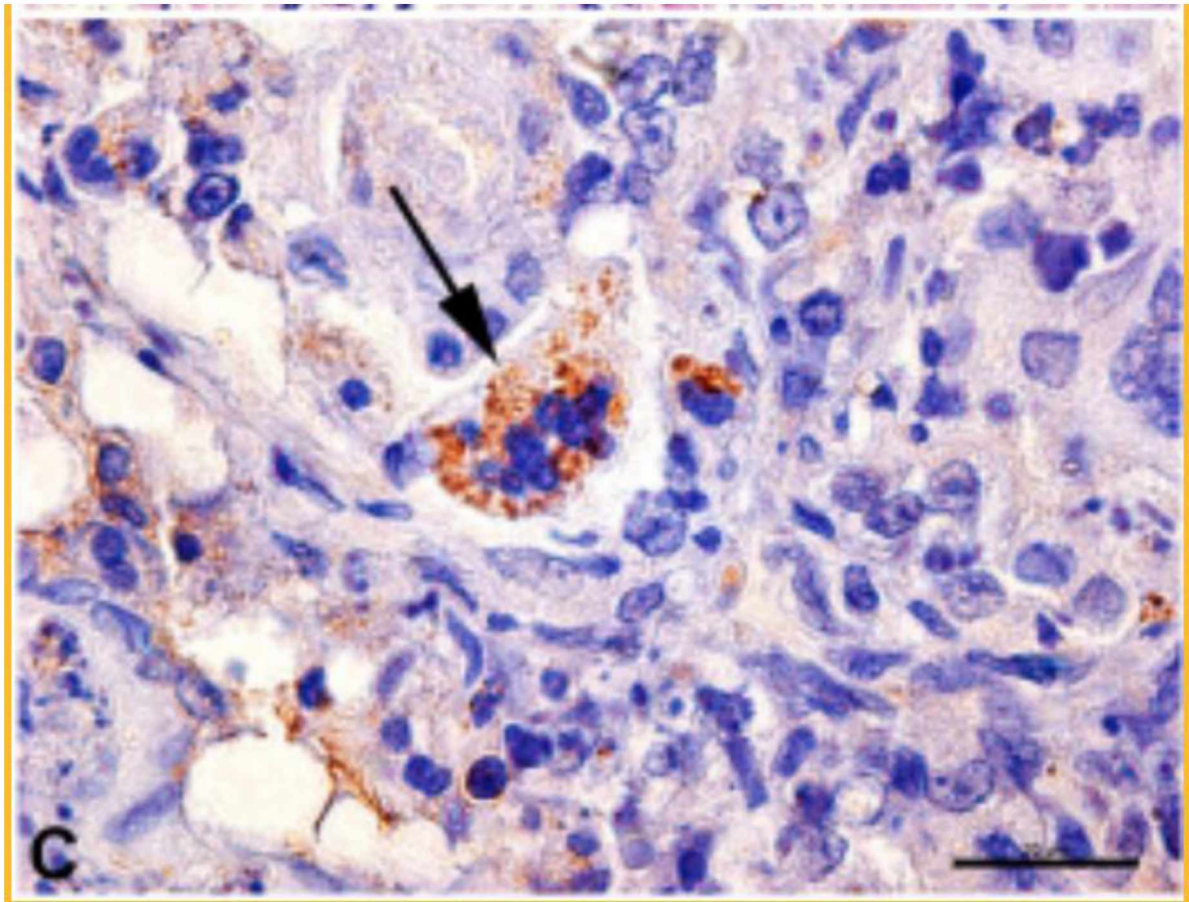


Slika 2. Patogeneza i ciljni organi vrste *B. canis* (Izvor: WANKE, 2004.).

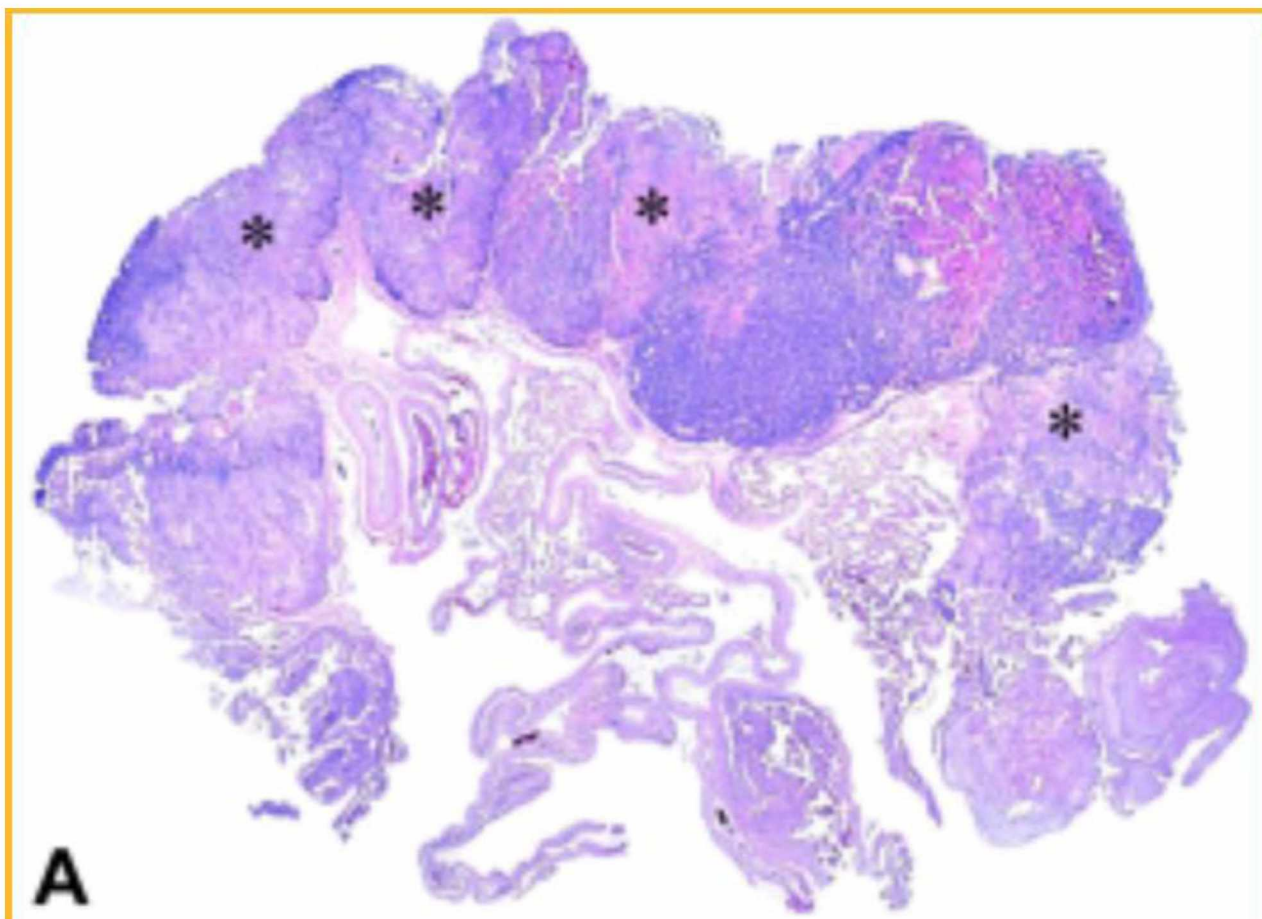
2.6. Klinička slika i patološke promjene

Razdoblje inkubacije vrlo je varijabilan i može iznositi 2 tjedna pa sve do 3 mjeseca (COSFORD, 2018.). Klinički znakovi također mogu biti vrlo raznoliki (DE MASSIS i sur., 2022.). Bolest može proći subklinički ili se očitovati kliničkim znakovima povezanim s reproduktivnim traktom. Životinje su većinom afebrilne, a u pojedinim slučajevima može se razviti limfadenopatija, splenomegalija, i/ili diskospondilitis. Opisuju se, ali rjeđe, i neka druga klinička očitivanja bolesti koja nisu vezana uz reproduktivni sustav (HENSEL i sur., 2018.; DJOKIC i sur., 2023.; SYKES, 2023.). U odraslih pasa pobol je visok ali je stopa smrtnosti niska (COSFORD, 2018.; DARBAZ i sur., 2019.).

U negravidnih ženki jedini primjetni znak može biti limfadenomegalija retrofaringealnih limfnih čvorova ukoliko je oronazalna sluznica bila ulazni put infekcije, te ingvinalnih ili ilijačnih limfnih čvorova ako su se zarazile spolnim putem (SYKES, 2023.), a isti klinički znakovi mogu se javiti i u mužjaka (CVETNIĆ, 2015.). U gravidnih će ženki klinički znakovi biti izraženiji, a promjene će zahvatiti gravidnu maternicu, placentu i plod/ove (HOLLETT, 2006.). Do reproduktivnih poremećaja kao što su rana embrionalna smrtnost s resorpcijom (RES), pobačaji, mrtvorodenja i rjeđe neplodnosti, dolazi uslijed metritisa i placentitisa (BUHMANN i sur., 2019.). Do rane embrionalne smrtnosti s resorpcijom može doći već 20 dana nakon parenja tako da često prođe neprimjetno, a može se zamijeniti i sa izostankom koncepcije odnosno neplodnošću, osobito u onim slučajevima kad nema rane dijagnostike graviditeta (HENSEL i sur., 2018.; SYKES, 2023.). *Brucella canis* je unutarstanična bakterija i osim u mononuklearnim fagocitima može se lokalizirati i u trofoblastima (Slika 3) pa na posteljici uzrokovati opsežni nekrotični placentitis (Slika 4) s infarktom labirintne regije posteljice, koagulacijsku nekrozu korionskih resica i nekrotizirajući arteritis. Posljedica nastalih promjena bit će uginuće ploda (SYKES, 2023.). Pobačaji uzrokovani sa vrstom *B. canis* najčešći su u zadnjoj trećini graviditeta (45- 59 dan) (HENSEL i sur., 2018.; SYKES 2023.).



Slika 3. Imunohistokemijskom metodom prikazana *B. canis* unutar citoplazme trofoblata (Izvor: SANTOS i sur., 2021.).

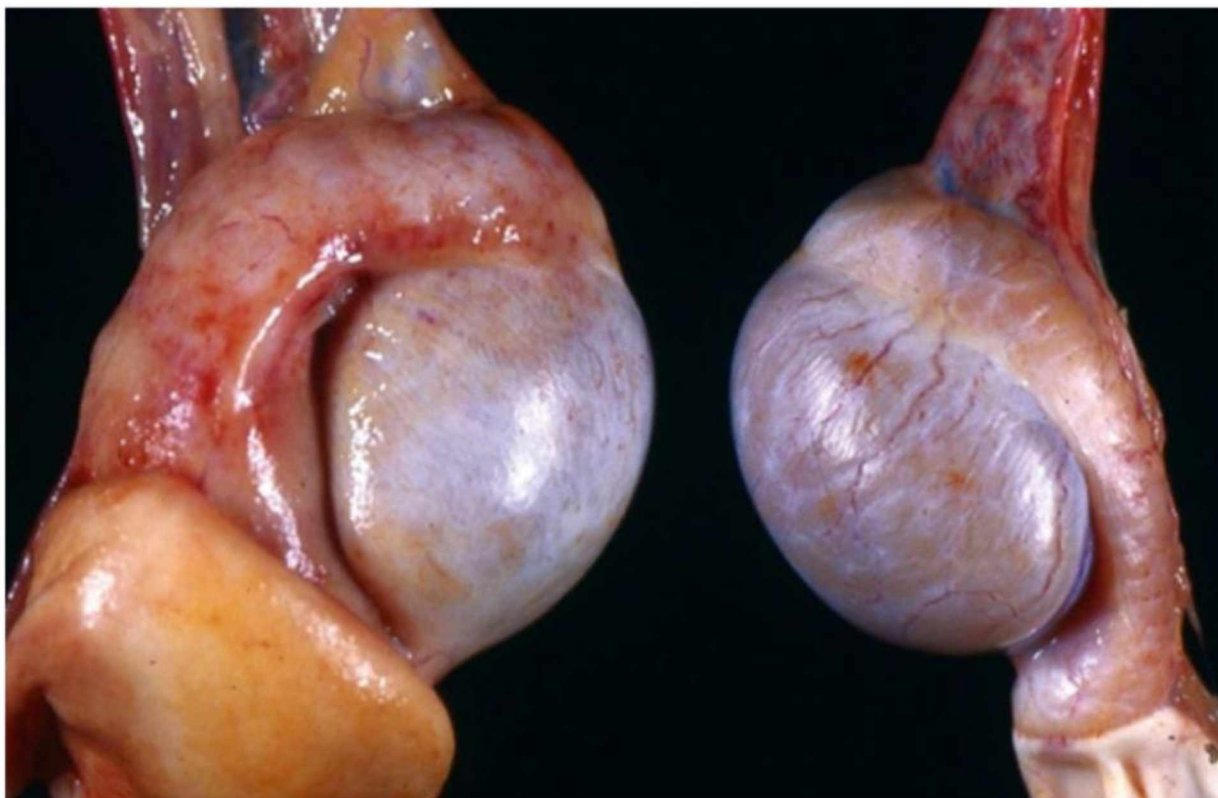


Slika 4. Prikaz placente i opsežnih nekrotičnih područja (označeno zvjezdicom -*) koja karakteriziraju nekrotični placentitis (Izvor: SANTOS i sur., 2021.).

Pobačeni plodovi bit će djelomično autolizirani, a makroskopskim pregledom mogu se naći nespecifične lezije kao što su potkožni edemi, krvarenja i kongestije, najčešće u potkožju abdominalnog područja (HENSEL i sur., 2018.). Na razudbi se mogu pronaći i bronhopneumonija, hepatitis, limfadenitis, miokarditis i renalna krvarenja (SANTOS i sur. 2021.), te degenerativne lezije po jetri, slezeni, bubrezima i crijevima uz peritonealni izljev (WANKE, 2004.). U želučanom sadržaju pobačenih fetusa može se naći uzročnik (SYKES, 2023.), kao i leukociti koji su nađeni i u amnionskoj tekućini što može ukazivati da se plodovi inficiraju intrauterino aspiracijom amnionske tekućine (CVETNIĆ, 2015.). Nakon pobačaja javlja se vaginalni iscjedak koji može biti krvav, ponekad sluzav (RASOOL i sur., 2023.), no najčešće je smeđe-žute do zelenkaste boje, bez mirisa i perzistira u razdoblju od 1 do 6 tjedana (HENSEL i sur., 2018.; SYKES, 2023.).

Inficirana kuja koja pobaci, u sljedećem ciklusu može normalno iznijeti graviditet ili imati isprekidanih problema s neplodnošću (HENSEL i sur., 2018.). Rijetko se događa da ženka iznese graviditet do termina, a u tom će slučaju u istom leglu izleći živorođene i mrtvorodne štence. Ukoliko se to i dogodi, većina živorođenih štenaca bit će slaba i uginut će unutar nekoliko sati ili dana (WANKE, 2004.; DE MASSIS i sur., 2022.). Ona štenad koja ipak preživi bit će subklinički inficirana sve do svoje reproduktivne zrelosti (HENSEL i sur., 2018.). Takva štenad je naočigled zdrava, ali izlučuje uzročnika i predstavlja izvor infekcije za ljude (SANTOS i sur. 2021.) i druge pse (HENSEL i sur., 2018.) stoga se preporuča njihovo izlučivanje iz uzgoja. Generalizirani limfadenitis inficirane štenadi najčešće je jedini klinički znak prisutan do razdoblja spolne zrelosti (CVETNIĆ, 2015.).

U mužjaka, *Brucella canis* prvenstveno inficira dijelove reproduktivnog sustava koji sudjeluju u maturaciji, transportu i skladištenju spermija (SYKES, 2023.), tj. tkiva ovisna o androgenim hormonima (HOLLET, 2006.). Izaziva nekrotizirajući arteritis i granulomatoznu upalu u području testisa, nuzsjemenika i prostate koja se javlja oko pet tjedana nakon infekcije (SYKES, 2023.). Granulomatozna upala nuzsjemenika i testisa će uzrokovati curenje sjemene tekućine u okolna tkiva i posljedično stvaranje aglutinirajućih protutijela i reakciju kasnog tipa preosjetljivosti na vlastite spermije (SYKES, 2023.). Ova će reakcija preosjetljivosti potaknuti progresiju upale u području nuzsjemenika (Slika 5) i testisa, te dovesti do smanjenog stvaranja spermija, a na kraju može dovesti do potpunog zaustavljanja spermatogeneze (COSFORD, 2018.; SYKES, 2023.). Stvorena protutijela se mogu dokazati u sjemenoj tekućini i krvi 11 do 14 tjedana nakon inicijalne infekcije (CVETNIĆ, 2015.).



Slika 5. Povećani rep nuzsjemenika eksperimentalno inficiranog psa 60 dana nakon inokulacije uzročnika (lijevo), te nuzsjemenik i testis neinficiranog psa (desno) (Izvor: SYKES, 2023.).

Opisane promjene uzrokovati će kliničke znakove kao što su smanjen libido, bolna ejakulacija, smanjen volumen ejakulata (SYKES, 2023.), te abnormalnosti spermija (VAN DIJK i sur., 2021.) koje se mogu naći na pregledu uzorka ejakulata. Pregled ejakulata se često rutinski radi kod sumnje na neplodnost, a ukoliko je mužjak inficiran *B. canis* uzorak obiluje uzročnikom i vrlo je infektivan. Na mikroskopskoj pretrazi već 5. tjedan od početka infekcije mogu se uočiti promjene u morfologiji spermija kao što su teratospermija i abnormalnosti poput odvojenih glava spermija, citoplazmatskih uklopina te deformiteta akrosome, slaba pokretljivost ili astenospermija i oligospermija ili smanjen broj spermija, a iste promjene postaju jasno izražene oko 8. tjedna infekcije (SYKES, 2023.). Peti tjedan infekcije u uzorku su vidljivi neutrofili i makrofagi zajedno s morfološki promijenjenim spermijima, dok će u kasnoj fazi upale u uzorku biti vidljive nakupine upalnih stanica i makrofagi koji sadrže ostatke fagocitiranih spermija (WANKE, 2004.). Oko 15. tjedna infekcije u uzorku se mogu naći aglutinirani spermija (COSFORD, 2018.). Oko 20. tjedna infekcije više od 90% spermija je

abnormalno, a u kroničnom tijeku bolesti kada dođe do potpunog prestanka spermatogeneze javit će se i azoospermija tj. potpuni nestanak spermija (SYKES, 2023.). Svi opisani poremećaji i promjene u spermogramu nisu specifični za infekciju sa vrstom *B. canis* (DE MASSIS i sur., 2022.). Tri do četiri mjeseca nakon inicijalne infekcije može se javiti i piospermija (SYKES, 2023.). Bolnost na palpaciju testisa i skrotuma može (SANTOS i sur., 2022.), ali i ne mora biti prisutna (DE MASSIS i sur., 2022.). Testisi su vizualno nejednake veličine zbog upale (Slika 6) i edema mošnje (SYKES, 2023.), a pojaviti se može i fibrinopurulentni eksudat unutar stijenke tunike vaginalis (SANTOS i sur. 2021.). Ukoliko upala uznapreduje i pređe u kronični oblik može se razviti unilateralna ili bilateralna testikularna atrofija i životinja može ostati neplodna (HENSEL i sur., 2018.). Imunodestruktivna patogeneza najčešće dovodi do progresivne upale i upalnih promjena unatoč liječenju (SYKES, 2023.). Unatoč neplodnosti, mužjak i dalje izlučuje uzročnika i ostaje izvor zaraze (WANKE, 2004.).



Slika 6. Povećani desni testis i crvenilo mošnje u psa s brucelozom uzrokovanom vrstom *B. canis*. (Izvor: EGLOFF i sur., 2018.).

Često je prisutan i skrotalni dermatitis koji nastaje kao posljedica lizanja iritiranog područja (COSFORD, 2018.), a može biti kombiniran i sa sekundarnim bakterijskim infekcijama (SYKES, 2023.).

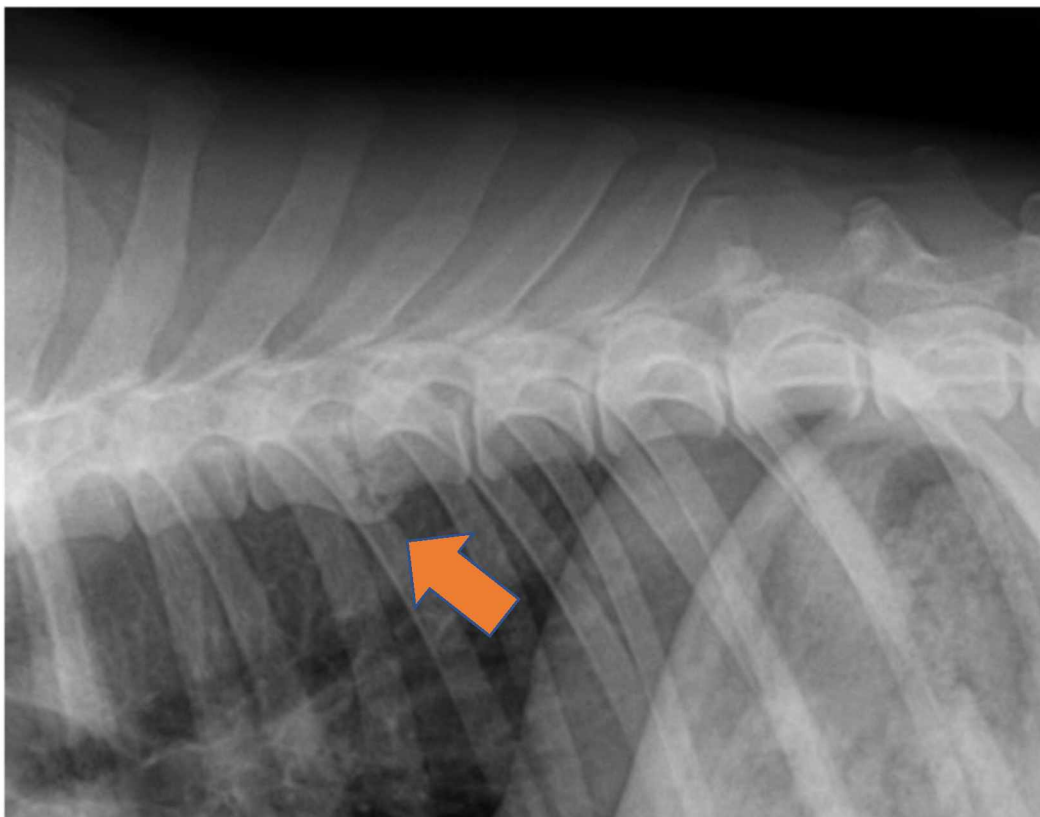
Klinička očitovanja bolesti nevezana uz reproduktivni sustav su najčešće limfadenomegalija (VAN DIJK i sur., 2021.), splenomegalija (SYKES, 2023.) i diskospondilitis (HENSEL i sur., 2018.). Javljaju se i uveitis i endoftalmitis, te rjeđe osteomijelitis i poliartritis, meningoencefalitis, glomerulonefritis, piogranulomatozni dermatitis i endokarditis (COSFORD, 2018.). Ove promjene mogu se javiti u oba spola (HOLLETT, 2006.).

Diskospondilitis je najučestaliji klinički znak bruceloze u pasa koji nije povezan s promjenama na reproduktivnom traktu (BUHMANN i sur., 2019.). Može zahvatiti prsne kralješke, slabinske kralješke (HOLLETT, 2006.), te vratne kralješke, iako je vratni dio kralježnice obično najrjeđe zahvaćen ovom patologijom (GRAHAM i sur., 2022.). Najčešće zahvaćeno mjesto na kralježnici je lumbosakralni zglob (LONG i sur., 2022.). Osim nekih vrsta brucela (*B. canis* i *B. suis*) mogu ga uzrokovati i neki drugi mikroorganizmi kao što su bakterije rodova *Staphylococcus* i *Streptococcus*, *Escherichia coli* ili *Aspergillus spp.* (BUHMANN i sur., 2019.). Ipak kombinacija boli u kralježnici i nekih drugih kliničkih znakova poput reproduktivnih poteškoća i/ili povećane slezene i/ili limfnih čvorova trebala bi pobuditi kliničku sumnju na brucelozu. Incidencija diskospondilitisa viša je u mužjaka nego u ženki, pretpostavlja se zbog lokalizacije uzročnika u prostati kroz dulje vrijeme iz koje se sporadično oslobađa u krv kojom odlazi do drugih organa (HENSEL i sur., 2018.). *B. canis* dokazana je u 8,9 do 10% slučajeva diskospondilitisa, no pretpostavlja se da je taj broj u stvarnosti daleko veći, (LONG i sur., 2022.). Najčešće se javlja u srednjih i većih pasmina pasa, čak i u onih koji nisu bili spolno aktivni (SYKES, 2023.). Može se javiti u naizgled zdravih pasa, ali i u onih koji imaju reproduktivnih poteškoća (HENSEL i sur., 2018.). Rizik od pojave diskospondilitisa raste proporcionalno s dobi: najveći rizik od nastanka imaju psi stariji od deset godina (LONG i sur., 2022.), no pojavljuje se i u pasa mlađe dobi (GRAHAM i sur., 2022.). Očitovati će se pojavom boli u kralježnici, hromošću i ukočenosti pri kretanju (HENSEL i sur., 2018.), te depresijom i anoreksijom (SEO i sur., 2023.). Osim diskospondilitisa uzrok sličnih kliničkih znakova može biti i vertebralni osteomijelitis uzrokovan vrstom *B. canis* (HENSEL i sur., 2018.). U slučaju kompresije leđne moždine mogu se javiti i ataksija i pareza (DE MASSIS i sur., 2022.; SYKES, 2023.).

GRAHAM i sur. (2022.) zabilježili su slučaj diskospondilitisa u vratnom dijelu kralježnice (C6-C7) uzrokovanog vrstom *B. canis* koji se se pojavljivao u epizodama: labrador

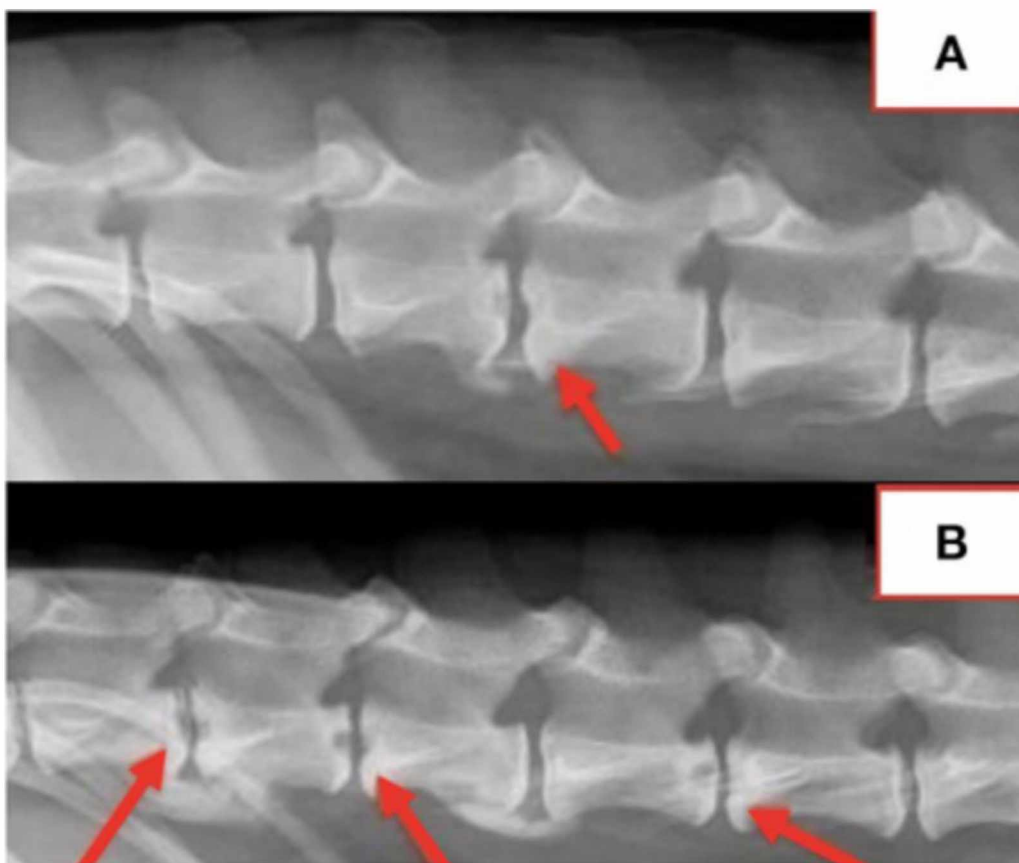
star dvije godine je sa 7 mjeseci starosti počeo pokazivati znakove letargije i boli u području vratne kralježnice koji su bili praćeni zakrenutošću glave i kruženjem u desnu stranu. Svi klinički znakovi bili bi izraženi nekoliko dana nakon čega bi u potpunosti prestali, te se nakon nekog vremena ponovo pojavljivali. Opći klinički i neurološki pregled provedeni u razdoblju između „epizoda“ nisu odstupali od fizioloških vrijednosti.

Lezije koje odgovaraju diskospondilitisu mogu se detektirati pomoću metoda radiološke dijagnostike kao što su rendgen (RTG) (Slika 7), kompjuterizirana tomografija (CT, engl. *Computed tomography*) i magnetska rezonanca (MR, engl. MRI, *Magnetic resonance imaging*).

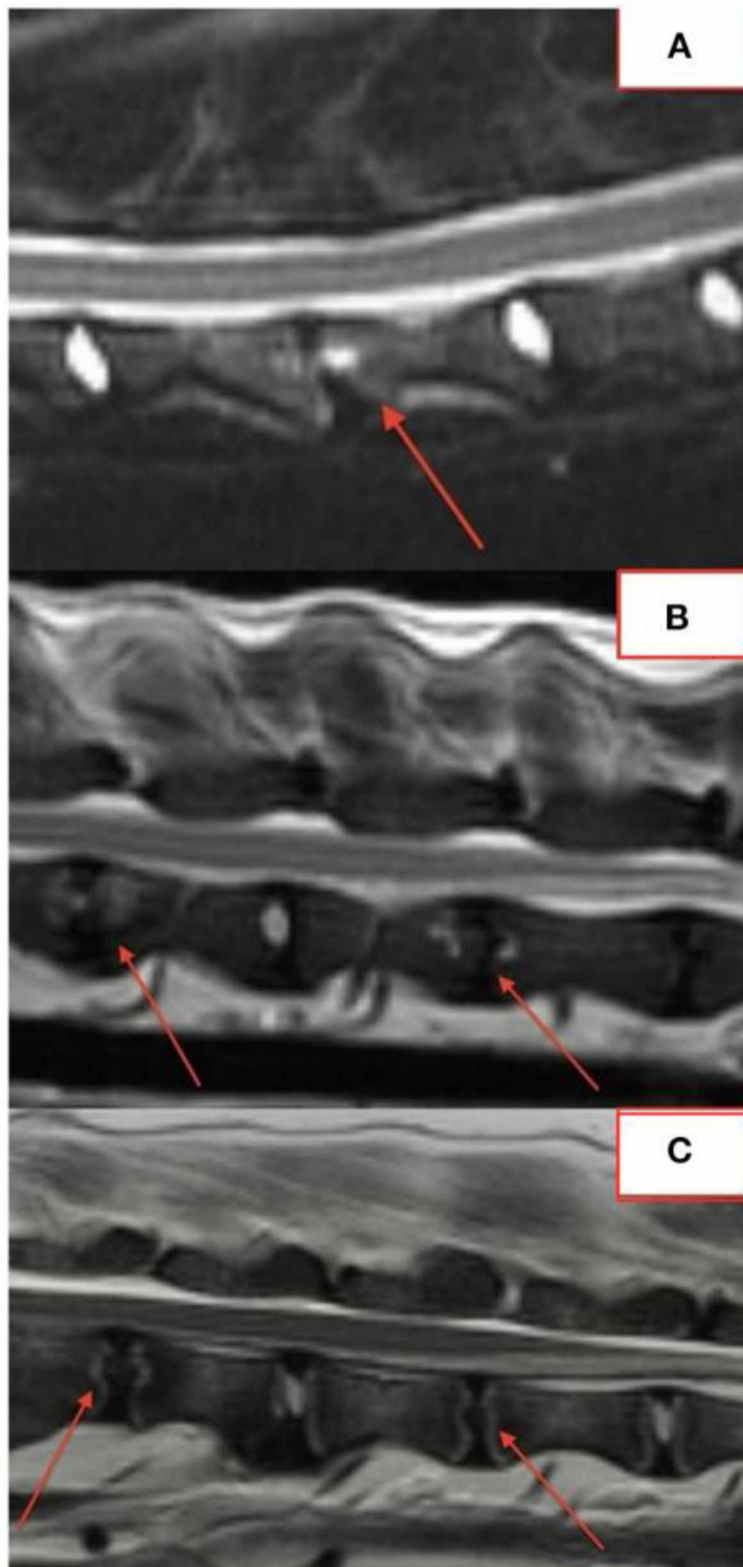


Slika 7. Rendgenogram prsnog dijela kralježnice s diskospondilitisom uzrokovanim vrstom *B. canis* u međukralježničnom prostoru T7-T8 i vidljivom ventralnom spondilozom i kolapsom međukralježničkog prostora (Izvor: SYKES, 2023.).

Diskospondilitis uzrokovan stafilokokima može uzrokovati lezije poput osteolize okrajaka kralježaka, kolapsa međukralježničnog prostora, skleroze i proliferacije kosti uz litične lezije, a može doći i do subluksacije intervertebralnog prostora zahvaćenog promjenama. Slične promjene zabilježene su i u slučajevima diskospondilitisa uzrokovanog sa vrstom *B. canis*. LONG i sur. (2022.) također opisuju i tzv. „hole punch“ litične lezije karakteristične za diskospondilitis uzrokovan vrstom *B. canis* koje prikazane CT-om, RTG-om (Slika 8) i MR-om (Slika 9) izgledaju kao prazno, lucentno područje omeđeno područjima rane osteolize. U istraživanju kojeg su proveli LONG i sur. (2022.) 21 od 57 lezija (37%) karakterističnih za diskospondilitis pronađenih na MR-u nije uspješno detektirano na RTG-u, na temelju čega autori dolaze do zaključka da RTG pretraga sama po sebi nije dovoljna kako bi se postavila dijagnoza diskospondilitisa.



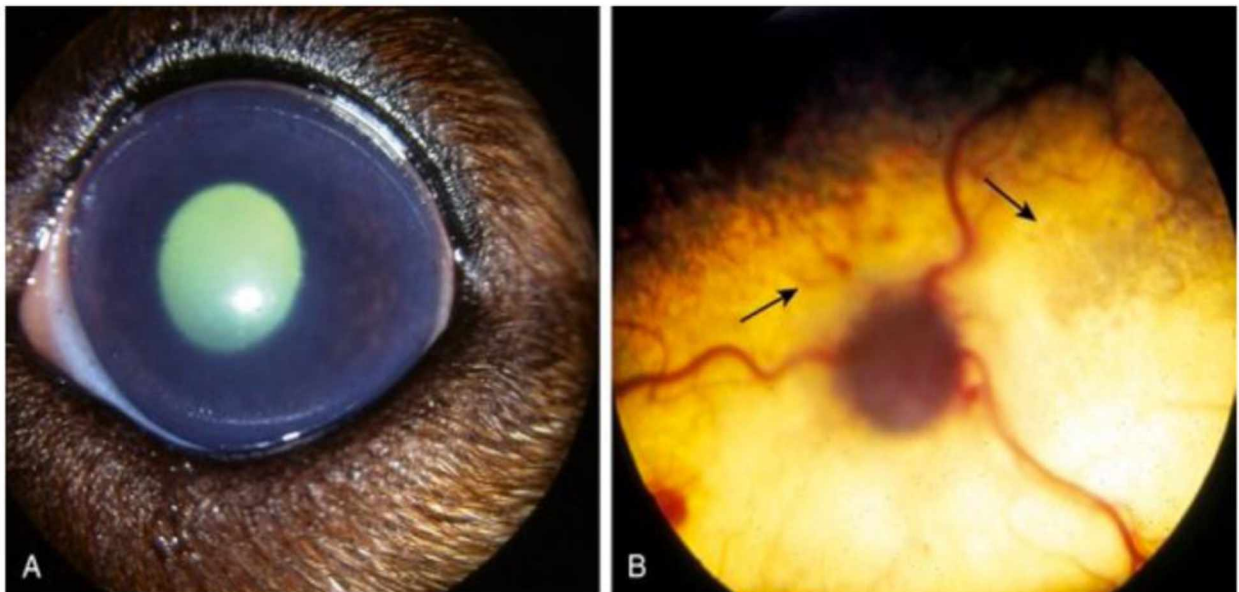
Slika 8. Rendgenski prikaz karakterističnih litičkih (tzv. *Hole punch*) lezija u psa sa diskospondilitisom uzrokovanim *B. canis* (Izvor: LONG i sur., 2022.).



Slika 9. Karakteristične litičke (tzv. *Hole punch*) lezije prikazane magnetskom rezonancom (Izvor: LONG i sur., 2022.).

Rendgenom se osim diskospondilitisa može detektirati i splenomegalija, koja se vidi i na ultrazvuku (UZV). Ultrazvučnom pretragom abdomena mogu se primjeti i povećani abdominalni limfni čvorovi, a ultrazvuk mošnje pokazat će i edem te povećanje nuzsjemenika s hiperehogenim područjima, te povećane testise s gubitkom parenhima (SYKES, 2023.). Ponekad se mogu uočiti i mali apscesi u tkivu testisa (SANTOS i sur., 2021.).

Promjene na očima koje se povezuju s brucelozom pasa često su unilateralne i očituju se kao uveitis (Slika 10) koji često ima kroničan tijek (COSFORD, 2018.), multifokalni granulomatozni korioretinitis (SYKES, 2023.), te endoftalmitis (HOLLETT, 2006.; COSFORD, 2018.).



Slika 10. (A) Uveitis i (B) zacijeljene korioretinalne lezije (označene strelicama) u psa s brucelozom (Izvor: SYKES, 2023.).

Od kliničkih znakova mogu se primjetiti promjene poput zamućenja očne vodice, hipopion, posteriorne sinehije, sekundarni glaukom (COSFORD, 2018.; SYKES, 2023.), hiperpigmentacija šarenice te gubitak normalne konture njene površine (SYKES, 2023.). Pojavljuju se i blefarospazam, hiperemija konjunktive (COSFORD, 2018.; SYKES, 2023.), mioza, hifema (COSFORD, 2018.), edem rožnice, zamućenja staklovine, oticanje i hiperemija

optičkog diska (SYKES, 2023.), te lezije na mrežnici (SANTOS i sur., 2021.). Sam uveitis javlja se zbog taloženja imunih kompleksa u očnim strukturama (HOLLETT, 2006.).

Relativno rijetko mogu se pojaviti i vrlo blagi klinički znakovi koje primjećuju vlasnici: letargija, smanjen apetit (COSFORD, 2018.), suha dlaka loše kvalitete (SYKES, 2023.), te promjene u ponašanju kao što su smanjena radna sposobnost i manjak pozornosti (HOLLETT 2006.; COSFORD 2018.). Povišena tjelesna temperatura može biti prisutna (COSFORD, 2018.), ali relativno rijetko jer *B. canis*, za razliku od drugih brucela ne posjeduje lipopolisaharide koji proizvode endotoksine (HOLLETT, 2006.; DARBAZ i sur., 2019.).

Laboratorijski pokazatelji često su nepromijenjeni ili nespecifični. U hematološkom nalazu može biti prisutna leukocitoza/neutrofilija, ponekad s degenerativnim skretanjem ulijevo, te rjeđe monocitoza i limfopenija (COSFORD, 2018.; SYKES 2023.). Zabilježeni su i pozitivni rezultati na Coombsovom testu, no bez anemije. Od biokemijskih pokazatelja u serumu se mogu naći hiperglobulinemija i hipoalbuminemija. Oba pokazatelja učestalija su u kronično inficiranih pasa, a mogu i kompletno izostati (COSFORD, 2018.; SYKES 2023.). Nalazi urina najčešće su nepromijenjeni čak i kada je uzročnik prisutan u mokraći (SYKES, 2023.).

Na mikroskopskoj razini promjene unutar reproduktivnog sustava se sastoje od nekrotizirajućeg vaskulitisa, te granulomatozne upale (SYKES, 2023.), a limfni čvorovi povećani su zbog hiperplazije limfoidnih i retikuloendotelnih stanica (HOLLETT, 2006.). U slučaju kronične bakterijemije u organima poput slezene i limfnih čvorova primjećuje se infiltracija plazma stanicama i makrofagima u kojima se nalaze fagocitirane bakterije, dok se u sloju submukoze prostate, nuzsjemenika, maternice i bubrežne zdjelice može primjetiti limfoidna infiltracija (DE MASSIS i sur., 2022.). Za citološku pretragu uzorkuju se aspirati slezene i limfnih čvorova gdje se može pronaći limfoidna reaktivnost ili ponekad plazmacitoza, te uzorak prostate ukoliko je prisutan prostatitis u kojem se pronalazi granulomatozna upala s vidljivim intracelularnim uzročnikom koji se po Gramu boji negativno. Pretraga cerebrospinalnog likvora ne pokazuje karakteristične promjene: ukoliko je prisutan meningoencefalitis prisutni mogu biti neutrofil i povišena koncentracija proteina (DE MASSIS i sur., 2022.).

2.7. Dijagnostika

Zbog zoonotskog potencijala *B. canis* i mogućnosti aerogenog širenja, ali i kontaminacije okoliša, dijagnostika bruceloze pasa izazov je za veterinare i laboratorijske djelatnike.

Klinički znakovi bruceloze pasa često mogu izostati i vrlo su nespecifični, ali sumnja na brucelozu trebala bi se postaviti kod pobačaja u naizgled zdrave ženke koji se javlja oko dva tjedna prije termina štenjenja, splenomegalije ili abdominalne limfadenomegalije u pasa s diskospondilitisom, ili kombinacija nekih od navedenih kliničkih znakova (SYKES, 2023.), ali i svaka pojava diskospondilitisa u pasa (GRAHAM i sur., 2022.). Kao što je već spomenuto u poglavlju o epizootiologiji, inficirati se može svaki spolno zreli pas, neovisno o spolu i neovisno o tome je li kastriran ili već prethodno korišten za rasplod ili ne (SYKES, 2023.). Objektivna dijagnostika bruceloze u pasa iznimno je kompleksna; za potvrdu dijagnoze nije dovoljan samo jedan, već se treba koristiti nekoliko seroloških testova u kombinaciji s drugim metodama poput bakterijske izolacije i identifikacije i molekularnih metoda (SANTOS i sur., 2021.).

Diferencijalna dijagnoza uključuje herpesvirusne i infekcije mikobakterijama, bolesti koje se vežu uz splenomegaliju poput babezioze, erlihioze i Q groznice, te ostalih gljivičnih, virusnih, bakterijskih bolesti i neoplazija koje uzrokuju simptome slične brucelozi. Dijagnoza uveitisa trebala bi navesti dijagnostičara da osim na brucelozu pomisli i na toksoplazmozu, leptospirozu, te na bolesti uzrokovane rikecijama (SYKES, 2023.).

2.7.1. Serološke pretrage

Serološke pretrage su najčešće korištene metode za dijagnostiku bruceloze uzrokovane vrstom *B. canis*. U praksi se ove pretrage koriste za:

1. rutinsko testiranje zdravih pasa; profilaktičko dvokratno testiranje životinje barem mjesec dana prije planiranog datuma parenja ili prije uvođenja nove životinje u uzgajivačnicu, te za redovno testiranje rasplodnih pasa na godišnjoj bazi.
2. za testiranje pasa sumnjivih na infekciju *B. canis* odnosno onih koji pokazuju kliničke znakove kao što su neplodnost, kasni pobačaj, orhitis ili epididimitis, limfadenomegalija ili splenomegalija, te diskospondilitis ili pse koji su bili u kontaktu sa zaraženim psom.

Za serološke pretrage koriste se: brzi aglutinacijski test na predmetnici ili RSAT (engl. *Rapid slide agglutination test*), ME-RSAT (merkaptotanol RSAT, modificirani RSAT), test spore aglutinacije u epruveti ili TAT (engl. *Tube agglutination test*), gel difuzijska precipitacija ili GDP, indirektna imunofluorescencija (IFA, engl. *Immunofluorescence assay*), te

imunoenzimski test ili ELISA (engl. *Enzyme-linked immunosorbent assay*). Neki autori spominju i korištenje metode reakcije vezanja komplemenata (RVK) čiji su rezultati u dobroj korelaciji s onima dobivenim TAT-om, no ne koristi se rutinski zbog anti-komplementarne aktivnosti psećeg seruma (WANKE, 2004.). Spominje se i korištenje mikroaglutinacijskog testa (MAT) (MOL i sur., 2020.), te imunoblotinga (DE MASSIS i sur., 2022.). Testovi kao antigene koriste *B. ovis* ili *B. canis*, te nemukoidni M-soj vrste *B. canis* čija će upotreba rezultirati s najmanje lažno pozitivnih rezultata (WANKE, 2004.).

RSAT test (zbog njenih antigenskih sličnosti s vrstom *B. canis*) kao antigen koristi toplinski inaktiviranu vrstu *B. ovis* u otopini sa rose bengal bojom (HOLLETT, 2006.). RSAT ima visoku osjetljivost, najvišu od svih seroloških testova (GRAHAM i sur., 2022.): čak i do 99% (DE MASSIS i sur., 2022.), ali nisku specifičnost: ovim testom isključit će se stvarno negativne jedinice, ali lažno pozitivni rezultati su dosta česti, u 20-50% (DE MASSIS i sur., 2022.), pa čak i u 50-60% slučajeva i to zbog unakrižnih reakcija s protutijelima na neke druge uzročnike kao što su *Bordetella bronchiseptica*, *Pseudomonas spp.*, *Moraxella spp.* (HOLLETT, 2006.), *Actinobacillus equuli*, *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli* (SANTOS i sur., 2021.) i druge Gram negativne, ali i Gram pozitivne bakterije: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* (MOL i sur., 2020.). Zbog navedenih faktora RSAT se koristi kao probirni tj. tzv „screening“ test, a svi pozitivni rezultati obavezno se moraju potvrditi nekim drugim, serološkim testom koji ima višu specifičnost. Specifičnost se može povećati upotrebom M-varijante vrste *B. canis* umjesto vrste *B. ovis* kao antigena u ovom serološkom testu (HENSEL i sur., 2018.). RSAT detektira protutijela protiv antigena stanične stijenke vrste *B. canis* (LONG i sur., 2022.).

ME-RSAT ili modificirani RSAT obično je idući korak u dijagnostici i koristi se za dodatno pretraživanje RSAT-u pozitivnih jedinica. Sadrži dodani 2-merkaptetanol kojim se inaktiviraju u prethodnom koraku spomenuta IgM protutijela čime se smanjuje mogućnost unakrižnih reakcija, dodatno se povisuje specifičnost testa (HOLLETT, 2006.) i smanjuje mogućnost pojave lažno pozitivnih rezultata s 50% na svega 12%, a osjetljivost ostaje ista (CVETNIĆ 2015.). Korištenje ne-mukoidnog soja vrste *B. canis* također umanjuje mogućnost pojave lažno pozitivnih rezultata (SANTOS i sur., 2021.). Lažno negativni rezultati mogući su tijekom prvih 8 tjedana nakon infekcije (HOLLETT, 2006.). Test se provodi miješanjem 1 kapi pretraživanog seruma s 1 kapi 2- merkaptetanola na sobnoj temperaturi, miješanjem nekoliko sekundi te dodavanjem 1 kapi antigena. Nakon 2 minute prosuđuju se rezultati (CVETNIĆ 2015.). Može se koristiti kao probirni i kao potvrdni test (SANTOS i sur., 2021.). Prednost oba brza aglutinacijska testa je njihova brzina i jeftinost (LONG i sur., 2022.).

Nakon brzih aglutinacijskih testova slijedi TAT kojim se dodatno potvrđuju pozitivni rezultati brzih aglutinacijskih testova. Test je semikvantitativan i njime se može približno odrediti titar protutijela (DE MASSIS i sur., 2022.). Titar 1:200 smatra se potvrđnim za aktivnu infekciju (HOLLETT, 2006.), a titar $\geq 1:200$ u dobroj je korelaciji s pozitivnim krvnim kulturama (HOLLETT, 2006.; SYKES, 2023.). Titar protutijela manji od 1:50 smatra se negativnim, a sve između 1:50 i 1:200 smatra se sumnjivim (DE MASSIS i sur., 2022.). Test je osjetljiv, ali nije specifičan što i dalje ostavlja mogućnost dobivanja lažno pozitivnih (DE MASSIS i sur., 2022.), kao i lažno negativnih rezultata (SANTOS i sur., 2021.). Zbog niske specifičnosti koristi se kao probirni test (HOLLETT, 2006.). Kao RSAT, i njegova se specifičnost može poboljšati na isti način: dodavanjem 2-merkaptotetanolu čime se dobiva 2-ME-TAT kojim će se smanjiti mogućnost pojave lažno pozitivnih nalaza (DE MASSIS i sur., 2022.).

Konačnu potvrdu stvarno pozitivnih uzoraka iz prethodnih testova dat će GDP ili gel difuzijska precipitacija. Postoje dvije varijante ovog testa: jedna u kojoj se koristi antigen stanične stijenke uzročnika (engl. *Cell wall assay* - cwa), te druga koji koristi citoplazmatske antigene (engl. *Citoplasmic assay* - cpa) specifične za rod *Brucella*. GDPcpa ima visoku specifičnost pa je dobar odabir za potvrdu pozitivnih uzoraka s prethodnih brzih testova (COSFORD, 2018.). GDPcwa će detektirati precipitine između 5. i 10. tjedna infekcije (SANTOS i sur., 2021.; LONG i sur., 2022.), no primjena ove metode zbog mogućih unakrižnih reakcija s protutijelima na druge nepatogene uzročnike i dalje ostaje prostora za pojavu lažno pozitivnih rezultata (SANTOS i sur., 2021.). S druge strane, GDPcpa će zahvaljujući visokoj specifičnosti vrlo dobro detektirati stvarno pozitivne uzorke, no niti ovaj test nije imun na lažno pozitivne rezultate: budući da sadrži citoplazmatske antigene specifične za rod *Brucella* moguće su unakrižne reakcije s drugim vrstama iz roda (SANTOS i sur., 2021.). Njegova mana leži i u manjoj osjetljivosti tijekom akutne infekcije koju će bolje detektirati GDPcwa, dok će GDPcpa uspješno detektirati precipitine u kasnijim stadijima infekcije u kronično inficiranih pasa, čak i 3 godine od početka infekcije (SANTOS i sur., 2021.). Mana ovih testova je nepraktičnost pošto za izvedbu i interpretaciju zahtjeva educirane laboratorijske djelatnike i poseban medij za pripremu (SYKES, 2023.).

Indirektna imunofluorescencija (IFA) koristi se ukoliko RSAT i TAT nisu dostupni (DE MASSIS i sur., 2022.), no ima nižu osjetljivost od drugih seroloških testova (HOLLETT, 2006.; SYKES, 2023.) tako da postoji mogućnost pojave lažno negativnih rezultata (HOLLETT, 2006.). Test je dobar za potvrdu bolesti u uzoraka pozitivnim na brzim serološkim testovima. Specifičnost ovog testa nije dovoljno istražena (LONG i sur., 2022.).

ELISA ili imunoenzimski test kao antigene u procesu koristi površinske antigene vrste *B. canis*, citoplazmatske antigene vrste *B. abortus* ili antigene nemukoidne varijante vrste *B. canis* (SANTOS i sur., 2021.). Specifičnost i osjetljivost ovise o tipu antigena upotrijebljenom u testu (SANTOS i sur., 2021.). Nisku osjetljivost, ali najvišu specifičnost pokazala je upotreba M-soja vrste *B. canis* (DE MASSIS i sur., 2022.). Kao probirna metoda, indirektna ELISA ima veću specifičnost, ali nižu osjetljivost od TAT-a, no ima veću osjetljivost od AGID-a i aglutinacijskih testova. Uspješno će detektirati protutijela u kronično inficiranih pasa čiji su uzorci bili negativni na 2-ME-RSAT i AGID testu stoga se koristi kao potvrđni test (SANTOS i sur., 2021.).

Serološki testovi moraju se kombinirati međusobno i s drugim dijagnostičkim metodama - razlikuju se u osjetljivosti i specifičnosti i samo jedna vrsta testa nije dovoljna za potvrdu ili isključivanje infekcije sa vrstom *B. canis*. Iako su lažno pozitivni rezultati znatno učestaliji, postoji i mogućnost pojave lažno negativnih rezultata ukoliko se životinju testira prerano ili kod kronično inficiranih životinja u kojih je titar protutijela nizak (COSFORD, 2018.). Lažno negativni rezultati česti su u prva 3 do 4 tjedna od početka infekcije tj. prije serokonverzije (SANTOS i sur., 2021.; DE MASSIS i sur., 2022.) do koje dolazi u periodu od 2. do 12. tjedna od inicijalne izloženosti uzročniku (SYKES, 2023.). Upravo zato bi se pas u slučaju negativnog rezultata trebao testirati dvokratno, u intervalu od 30 dana (SANTOS i sur., 2021.). Čak i ukoliko se serološki test provede u optimalnom razdoblju moguća je pojava lažno negativnih nalaza jer titar protutijela u serumu može varirati čak i uz prisutstvo kontinuirane bakterijemije (DE MASSIS i sur., 2022.). Primjena antimikrobnih lijekova prije uzorkovanja krvi za pretrage može suprimirati bakterijemiju i prateći serološki odgovor, te rezultirati lažno negativnim nalazima (SYKES, 2023.). Dobro razdoblje za uzorkovanje krvi za serološke pretrage je razdoblje proestrusa i estrusa jer je razina bakterijemije i pratećeg titra protutijela visoka pod hormonalnim utjecajem (HOLLETT, 2006.), te razdoblje gravidnosti ili netom nakon pobačaja (SANTOS i sur., 2021.). Bitno je koristiti testove namijenjene upravo detekciji vrste *B. canis* budući da serološki testovi koji su namijenjeni detekciji „glatkih“ brucela koje imaju O-polisaharid u sklopu površinskog antigena neće uspješno detektirati protutijela na „hrapave“ brucele (HENSEL i sur., 2018.).

Uzorci za serološke pretrage trebali bi se unutar 24 sata od uzorkovanja dostaviti ovlaštenom laboratoriju, ohlađeni, ali ne zamrznuti (HOLLETT, 2006.). U uzorkovanom serumu ne smije biti prisutna hemoliza zbog toga što prisutnost hemoglobina može uzrokovati aglutinaciju i time pojavu lažno pozitivnih rezultata (SANTOS i sur., 2021.). Svaki pozitivni probirni serološki test (RSAT, ME-RSAT, TAT) mora se potvrditi bakterijskom kulturom ili

lančanom reakcijom polimerazom (engl. *Polymerase chain reaction*, PCR) ili nekim serološkim testom koji ima višu specifičnost (GDPcpa).

2.7.2. Bakterijska izolacija i identifikacija

Zbog zoonotskog potencijala i mogućnosti aerogenog širenja izdvajanje brucela može se provoditi samo u laboratorijima biosigurnosne razine 3. Hemokultura se smatra najboljim načinom potvrde bruceloze pasa uzrokovane vrstom *B. canis*, pogotovo u prva 2 mjeseca nakon infekcije (SYKES, 2023.), te nakon pobačaja (HENSEL i sur., 2018.). Za ovu pretragu je potreban uzorak pune krvi jer se uzročnik nalazi unutar frakcije leukocita (SYKES, 2023.). Osim krvi, za izdvajanje se mogu uzorkovati vaginalni iscjedak, urin, sjeme, pobačeno tkivo, plodne vode (COSFORD, 2018.), placenta (SYKES 2023.), cerebrospinalni likvor (RASOOL i sur., 2023.), kao i uzorci intervertebralnih diskova ili aspirata u slučaju prisutnog diskospondilitisa, te tkiva ili aspirati limfnih čvorova, slezene, jetre, te muških reproduktivnih organa, prikupljeni zaživotno ili postmortalno. Kod slučajeva osteomijelitisa za pretragu se može uzorkovati i koštana srž, a ako je prisutan uveitis uzima se aspirat očne vodice (SANTOS i sur., 2021.), a nasaditi se može i uzorak mlijeka (DE MASSIS i sur., 2022.). Pobačeni materijal, plodne tekućine i placenta dobar su materijal za bakteriološku pretragu jer sadržavaju vrlo veliku količinu uzročnika (SANTOS i sur., 2021.; SYKES, 2023.). Ako se za izdvajanje koristi vaginalni ili maternični iscjedak, isti bi se trebao uzorkovati tijekom razdoblja proestrusa ili estrusa, u razdoblju kada postoji veća šansa izlučivanja brucela, te od kuja koje su nedavno pobacile (SANTOS i sur., 2021.; SYKES, 2023.). U kronično inficiranih pasa, *B. canis* najčešće se uspješno izdvoji iz prostate i nuzsjemenika (CVETNIĆ, 2015.). Ejakulat je najbolje uzorkovati u prva 3 mjeseca (SYKES, 2023.) tj. 3. do 11. tjedan od početka infekcije (SANTOS i sur., 2021.) jer tada sadrži vrlo veliku koncentraciju uzročnika, nakon čega se značajno smanjuje ili isprekidano izlučuje (SYKES, 2023.). Urin je dobar uzorak ukoliko je od inicijalne izloženosti uzročniku prošlo 8. do 30. tjedna. Najpouzdanija metoda uzorkovanja je cistocenteza (SANTOS i sur., 2021.) pošto se njome sprječava kontaminacija uzorka drugim, brzorastućim, bakterijama koje bi tijekom uzgoja prerasli kolonije vrste *B. canis*. Ipak, skupljanje urina mužjaka može češće rezultirati pozitivnim nalazom pošto je urin u tom slučaju kontaminiran ejakulatom koji sadrži vrlo velik broj brucela (SANTOS i sur., 2021.; SYKES, 2023.). Urinokultura može biti pozitivna čak iako je krvna kultura negativna (SYKES, 2023.). Zbog intermitentne bakterijemije negativan rezultat samo jedne hemokulture ne može se smatrati pouzdanim rezultatom (HENSEL i sur., 2018.), pa se uzorkovanje krvi za kulturu

provodi trokratno u razmacima od barem 24 sata (HOLLETT, 2018.). Primjena antimikrobnih lijekova prije obavljanja pretraga također može utjecati na točnost završne dijagnoze (SYKES, 2023.). Uzrok lažno negativnog rezultata može biti i neodgovarajuće uzorkovanje, odabir neodgovarajuće hranjive podloge (COSFORD, 2018.; SYKES 2023.), te korištenje epruvete koja sadrži EDTA koji inhibira rast bakterija (SANTOS i sur., 2021.; SYKES, 2023.), stoga se preporuča upotreba epruvete s heparinom ili natrijevim citratom pri uzorkovanju krvi za ovu vrstu pretrage (SANTOS i sur., 2021.; SYKES, 2023.).

Uzorci se trebaju čuvati u hladnjaku i dopremiti do laboratorija unutar 24 sata od uzorkovanja (DE MASSIS i sur., 2022.). Uspjeh ove pretrage ovisi i o kvaliteti tkiva uzorkovanog za pretragu, te koncentraciji uzročnika u tkivu u trenutku uzorkovanja (DE MASSIS i sur., 2022.). Zbog niske osjetljivosti, test se ne može koristiti kao probirni test, no idealan je za potvrdu infekcije. Još jedan nedostatak ove pretrage je njena vremenska zahtjevnost jer se na rezultate može čekati i po 9 dana (HENSEL i sur., 2018.). Unatoč niskoj osjetljivosti, izdvajanje ima 100% specifičnost: pozitivan nalaz je definitivni dokaz uzročnika (APHA, 2023.).

Prosudivanje vrste bakterijskih kolonija koje narastu na hranjivoj podlozi određuje se na temelju morfologije kolonija. Kao što je već spomenuto u poglavlju o etiologiji, *B. canis* raste u mrvičastim i sluzavim kolonijama, dok *B. melitensis*, *B. suis* i *B. abortus* rastu u glatkim kolonijama. Za identifikaciju vrste u posljednje vrijeme se koristi i matricom potpomognuta laserska desorpcija/ionizacija spregnuta sa spektrometrijom masa temeljenom na vremenu leta iona (engl. *Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry - MALDI-TOF MS*) (SYKES, 2023.).

2.7.3. Molekularne pretrage

Najčešće korištena molekularna pretraga je PCR, a najbolji uzorak za nju je puna krv. Može se koristiti i serum, koji je sigurniji za zdravlje laboratorijskih djelatnika (MAJZOBI i sur., 2018.), ali u tom je slučaju osjetljivost pretrage niska. Na pretragu se mogu poslati i uzorak ejakulata (HENSEL i sur., 2018.; SANTOS i sur., 2021.), vaginalni iscjedak (DE MASSIS i sur., 2022.; HENSEL i sur., 2018.), kao i aspirat očne vodice i limfnog čvora, te tkiva pobačenih plodova i mrtvorodne štenadi uzetih za vrijeme razudbe. Pretraga ima visoku osjetljivost i specifičnost i rezultati se dobivaju vrlo brzo (SANTOS i sur., 2021.) pa se može koristiti kao probirni i potvrdni test (HENSEL i sur., 2018.; SANTOS i sur., 2021.). Pokazao se kao odlična i vrlo osjetljiva metoda i u pretrazi rasplodnih pasa prije parenja; u uzorku ejakulata pasa

negativnih na kulturama uspješno je detektirana *B. canis*. RT-PCR pretragom *B. canis* je dokazana u urinu, leukocitnom međusloju (engl. *Buffy coat*) i uzorku međukralježničnog diska kada je bakteriološka pretraga istih uzoraka bila negativna. Isto tako, PCR vaginalnog obriska kuja bio je pozitivan i u onim slučajevima kad je PCR pune krvi i hemokultura istih životinja bila negativna (SYKES, 2023.). Prednost molekularne pretrage leži i u činjenici da moguća kontaminacija uzorka ne predstavlja problem, kao što je to slučaj kod bakteriološke pretrage (KANG i sur., 2014.). Ovom pretragom može se odrediti točna vrsta iz roda *Brucella* (DE MASSIS i sur., 2022.). Ipak, većina PCR metoda koji se danas koriste u dijagnostici identificirat će brucele samo na razini roda (COSFORD, 2018.; SANTOS i sur., 2021.). Multiplex PCR-om možemo utvrditi točnu vrstu brucele, no ova se pretraga ne može upotrijebiti na kliničkim uzorcima već samo na izolatima (SANTOS i sur., 2021.). Tek posljednjih godina razvijen je i PCR protokol koji dokazuje isključivo *B. canis* (SANTOS i sur., 2021.; DE MASSIS i sur., 2022.), no specifičnost i osjetljivost ove metode još nisu utvrđene (SANTOS i sur., 2021.).

2.8. Liječenje i prevencija

Liječenje bruceloze je problematično zbog kompleksne patogeneze uzročnika. *B. canis* je intracelularna bakterija i boravak unutar stanice štiti ju od djelovanja imunskog sustava domaćina i antimikrobnih pripravaka, iako je na mnoge osjetljiva *in vitro*. Zbog male vjerojatnosti da se ova bolest antimikrobnom terapijom može u potpunosti izliječiti, te zbog opasnosti koju ovaj uzročnik predstavlja za zdravlje drugih pasa i ljudi, preporuča se eutanazija svih uistinu pozitivnih pasa (COSFORD, 2018.; RASOOL i sur., 2023.; SYKES, 2023.). Za one pse kod kojih se ipak odlučuje na liječenje, isto se mora provesti uz obaveznu izolaciju oboljele životinje. Antimikrobna terapija provodi se pod strogim nadzorom veterinara (SANTOS i sur., 2021.) koji je dužan educirati vlasnika o bolesti i opasnostima koju ona predstavlja za ljude i druge pse (COSFORD, 2018.), informirati o troškovima i dugotrajnosti terapije, mogućnosti njenog neuspjeha i relapsa bolesti (DE MASSIS i sur., 2022.; DJOKIC i sur., 2023.). Osim antibiotske terapije uvijek preporuča i kastracija, nakon koje životinje i dalje ostaju izvor zaraze, no količina uzročnika koja se izlučuje značajno će se smanjiti (SYKES, 2023.). Pas više ne smije dolaziti u kontakt s djecom (SANTOS i sur., 2021.), imunokompromitiranim ljudima (DJOKIC i sur., 2023.), trudnicama (HOLLET, 2006.), starijim osobama i drugim psima.

Istraživanja ukazuju na veću stopu izliječenja u pasa kod kojih se primjenjivala kombinirana antimikrobna terapija, u odnosu na one koji su liječeni samo jednim antimikrobnim pripravkom (COSFORD, 2018.; SYKES, 2023.). Većina autora predlaže upotrebu jednog antibiotika iz skupine tetraciklina poput tetraciklin hidroklorida, doksiciklina ili minociklina peroralno u kombinaciji s aminoglikozidnim antibiotikom: dihidrostreptomycinom, streptomycinom ili gentamicinom parenteralno (COSFORD, 2018.; SYKES, 2023.). Najčešće predlagani pripravci, njihove doze i put primjene prikazani su u Tablici 2.

Tablica 2. Antimikrobni pripravci čije su kombinacije pokazale najbolje rezultate u liječenju bruceloze pasa uzrokovane vrstom *B. canis* (Izvor: SYKES, 2023.)

ANTIBIOTIK	DOZA (mg/kg)	NAČIN PRIMJENE	INTERVAL PRIMJENE
DOKSICIKLIN ILI MINOCIKLIN	5-10	PO	q12 h kroz 4 tjedna
STREPTOMICIN	5	IM ili SC	q 24 h prvi i 4. tjedan
GENTAMICIN	5	PO	q12 h kroz 4 tjedna
ENROFLOKSACIN	10	PO	q24 h kroz 4 tjedna
RIFAMPICIN	5	PO	q 24 h

Tetraciklinski antibiotici primjenjuju se svakodnevno u trajanju od 1 do 2 mjeseca, dok se aminoglikozidni antibiotici primjenjuju jednokratno 7 do 14 dana ili u trajanju od 7 dana svaka 3 do 4 (COSFORD, 2018.) ili 4 do 8 tjedana (SYKES, 2023.). Kod primjene aminoglikozida treba se obratiti posebnu pažnju na rad i funkciju bubrega zbog njihove izrazite nefrotoksičnosti. Uz to, nedovoljno prodiru u oko i središnji živčani sustav i nisu učinkoviti u liječenju uveitisa (COSFORD, 2018.; SYKES, 2023.), ni meningitisa (SYKES, 2023.), a problem predstavlja i njihov put primjene: ne postoji oblik za peroralnu primjenu već se moraju davati parenteralno što vlasnicima predstavlja dodatnu komplikaciju (SYKES, 2023.).

DE MASSIS i sur. (2022.) spominju terapiju koja je rezultirala negativnim serološkim testovima u 96% životinja unutar 2 mjeseca od početka liječenja. Radi se o kombinaciji tetraciklina (25 mg/kg svakih 8 sati, PO) kroz 4 tjedna, te dihidrostreptomicina (10 mg/kg svakih 12 sati IM) u prvom i zadnjem tjednu terapijanja (DE MASSIS i sur., 2022.). Autori također preporučaju provođenje kontrolnog GDPcpa testa svakih 2 do 6 mjeseci, gdje dva negativna testa za redom ukazuju na uspjeh odabrane terapije. Liječenje se pokazalo uspješnijim u ženskih nego u muških životinja (DE MASSIS i sur., 2022.). SANTOS i sur. (2021.) su sa istom kombinacijom antibiotika, ali uz korištenje streptomicina samo u prvom tjednu liječenja, imali uspjeh od 79% u eliminaciji bakterijemije i uzročnika iz limfnih čvorova, slezene i reproduktivnih organa. Spominju i da enrofloksacin postiže slične rezultate kao i streptomicin, a uz to je manje toksičan i sigurniji za primjenu u gravidnih životinja, s čime se slaže i SYKES (2023.) koja spominje i istraživanje u kojem se enrofloksacin (5 mg/kg, q12h, PO kroz 4 tjedna) pokazao dobar u eradikaciji kliničke slike, sprječavanju nastanka pobačaja, održavanju plodnosti i smanjenju mogućnosti prijenosa infekcije na štenad, no nije dokazana kompletna eradikacija uzročnika iz organizma. Enrofloksacin se može uvesti u terapiju za pse koji ne toleriraju terapiju aminoglikozidima ni rifampicinom (SYKES, 2023.).

Enrofloksacin, ponekad i rifampicin, koriste se uz tetracikline i aminoglikozide u liječenju uveitisa budući da aminoglikozidi imaju slab učinak na liječenje očnih i infekcija središnjeg živčanog sustava (SYKES, 2023.). COSFORD (2018.) spominje uspješno izlječenje kroničnog i rekurentnog uveitisa u tri zaražena psa uporabom doksiciklina, enrofoloksacina i streptomicina sa ili bez rifampicina, a SYKES (2023.) umjesto streptomicina spominje korištenje gentamicina. Kod liječenja uveitisa, uz sistemsku terapiju mogu se koristiti i masti za topikalnu primjenu s 1% prednizon acetatom ili atropinom. Ukoliko su lezije na oku opsežne, a vid je nepovratno oštećen, umjesto antimikrobne terapije predlaže se enukleacija jer je zahvaćeno oko i dalje mjesto umnažanja uzročnika (SYKES, 2023.).

Za liječenje diskospondilitisa, kao i drugih lokaliziranih infekcija u teško dostupnim područjima, preporuča se dugotrajna terapija antibioticima. Točna duljina i intenzitet terapije prosuđuju se na temelju kliničke slike, RTG nalaza, te serološke dijagnostike, a preporuča se terapija doksiciklinom i aminoglikozidom u najmanje dva intervala u trajanju od 4 tjedna. Terapija se može provesti tijekom 8 tjedana (neprekinuto) ili u dva terapijska intervala u trajanju od 4 tjedna. Preporuča se provođenje opetovanih kvantitativnih seroloških pretraga tijekom 3 do 6 mjeseci, kako bi se na temelju titra protutijela pratio napredak i uspjeh terapije, te kako bi se utvrdilo treba li se terapija nastaviti ili mijenjati (SYKES, 2023.). GRAHAM i sur. (2022.) su, nakon potvrde dijagnoze, brucelozu uzrokovanu *B. canis* u psa sa potvrđenim cervikalnim

diskospondilitisom liječili doksiciklinom (5 mg/kg PO q12h) u kombinaciji s marbofloxacinom (3,3 mg/kg PO q24h) u trajanju od 12 mjeseci. Puna krv uzorkovana je za bakterijsku kulturu 6, 12 i 18 mjeseci od inicijalne dijagnoze i sva tri testa pokazala su negativne rezultate, no do relapsa bolesti došlo je 26 mjeseci od postavljanja dijagnoze. SEO i sur. (2023.) diskospondilitis liječe doksiciklinom (10 mg/kg, PO q24h) do nestanka kliničkih znakova i negativne krvne kulture, no 2 tjedna nakon ukidanja antibiotika ponovo se razvijaju klinički znakovi bolesti. Tad u terapijski protokol dodaju enrofloksacin i periodički testiraju psa testom imunoflorescencije na kojem pas ostaje pozitivan nakon 3, 9 i 16 mjeseci unatoč antibiotskoj terapiji. Titar protutijela ostaje viši od 1:200 što i dalje ukazuje na prisutnu infekciju i neuspjeh u izlječenju.

Neki sojevi vrste *B. canis* smatraju se rezistentnijima na streptomycin i tetraciklin nego druge vrste brucela (SANTOS i sur., 2021.). Primjena antimikrobne terapije će smanjiti titar protutijela u serumu, čineći životinju prividno negativnom na serološkom testu, no infekcija će i dalje biti prisutna (SYKES, 2023.). Relapsi su česti (HOLLETT, 2006.), a manifestiraju se u obliku akutne infekcije (DJOKIC i sur., 2023.). Nestanak kliničke slike nakon terapije ne znači da infekcija i dalje nije prisutna (SANTOS i sur., 2021.). U *in vitro* uvjetima doksiciklin i rifampicin imaju antagonistički efekt, dok enrofloksacin i streptomycin sinergistički djeluju protiv bakterija (SANTOS i sur., 2021.). Kombinacija doksiciklina i rifampicina pokazala se učinkovitom u liječenju zaraze u pasa sa vrstom *B. suis* (BUHMANN i sur., 2019.).

Bitno je naglasiti da svaka metoda liječenja uvelike ovisi o imunom odgovoru životinje i niti jedan opisani protokol ne garantira potpuno izlječenje (COSFORD, 2018.). Potpuni oporavak moguć je jednu do pet godina nakon inicijalne izloženosti uzročniku, no sistemsko očitovanje bolesti s diskospondilitisom i/ili oftalmološkim promjenama često je progresivno ukoliko se ne liječi (SYKES, 2023.).

Dobra profilaksa sastoji se od standardnih higijenskih mjera, redovitog serološkog testiranja pasa u uzgajivačnicama i skloništima, te provođenju karantene pri uvođenju novih životinja u prostore i uzgajivačnice slobodne od bruceloze (DE MASSIS i sur., 2022.). Preporučeno trajanje karantene kod uvođenja novih pasa u objekt je 8 tjedana (DE MASSIS i sur., 2022.; RASOOL i sur., 2023.) ili barem mjesec dana (SANTOS i sur., 2021.), a serološko testiranje trebalo bi se provesti u prvom i osmom tjednu karantene (DE MASSIS i sur., 2022.). Ukoliko oba serološka testa budu negativna životinju se smije uvesti u uzgoj (DE MASSIS i sur., 2022.). Isto tako, poželjno je da životinja koja se nabavlja za rasplod dolazi iz „bruceloza free“ uzgajivačnice (HOLLETT, 2006.). Rasplodnog mužjaka trebalo bi se podvrgnuti serološkom testiranju barem 8 tjedana prije parenja ili prikupljanja sjemena za umjetno

osjemenjivanje. Sve rasplodne pse trebalo bi podvrgnuti redovnom serološkom testiranju barem jednom godišnje (SYKES, 2023.). U mjere profilakse spada i odgovarajuća edukacija i opremljenost osoblja, vlasnika i uzgajivača, tj. svih ljudi koji se bave psima i koji su potencijalno izloženi infekciji.

Ne postoji komercijalno dostupno cjepivo (SANTOS i sur., 2021.; SEO i sur., 2023.), a cjepiva koja su trenutačno dostupna sadrže *B. ovis* antigen, ne pružaju adekvatnu zaštitu od infekcije i ometaju serološku dijagnostiku (SYKES, 2023.). Živa cjepiva se ne preporučaju zbog mogućnosti izlučivanja i zadržavanja određenog stupnja virulencije što ih čini opasnim za ljude (DJOKIĆ i sur., 2023.; SANTOS i sur., 2021.).

U slučaju izbijanja zaraze unutar objekta (uzgajivačnice, skloništa, kućanstva), osoblje tj. vlasnici pasa o situaciji moraju biti obavješteni i testirani ukoliko se smatra da je to potrebno (SANTOS i sur., 2021.). Potpuna eradikacija bolesti iz uzgajivačnica često je neuspješna bez uklanjanja svih trenutno ili prethodno inficiranih životinja čak ni uz pridržavanje strogih mjera karantene i higijene (SYKES, 2023.). Prostor u kojem su boravili zaraženi psi treba temeljito očistiti i dezinficirati uz odgovarajuću zaštitnu opremu. Uzročnik ne preživljava dugo u okolišu i lako se uništava standardnim dezinficijensima navedenim u poglavlju o etiologiji. Izloženost suncu i isušivanje također inaktiviraju uzročnika (COSFORD, 2018.; RASOOL i sur., 2023.). Preporuča se korištenje jednokratne medicinske opreme poput rukavica, maski, zaštitnih naočala, zaštitnih odijela i čizama (RASOOL i sur., 2023.) uz obavezno i temeljito pranje ruku nakon kontakta s kontaminiranim i potencijalno opasnim materijalom (SYKES, 2023.). Uz sve navedene mjere trebalo bi se provesti i epizootiološko istraživanje kako bi se utvrdio način unosa i svi kontakti zaraženog psa (DJOKIĆ i sur., 2023.). Pse koji su bili u bliskom kontaktu sa zaraženim jedinkama također treba izolirati i držati pod nadzorom u periodu od 60 dana uz redovite preglede i testiranja na zarazu, a u periodu karantene ostatak životinja ne smije se izvoditi iz uzgajivačnice, niti se smije uvoditi nove životinje (SYKES, 2023.). Sve pse u uzgajivačnici starije od 6 tjedana treba podvrgnuti probirnim serološkim testovima (RSAT, 2ME-RSAT i TAT) čiji će rezultati biti objektivni ukoliko testirani psi nisu bili liječeni antibiotikom unutar 3 mjeseca prije testiranja. Ukoliko je rezultat probirnog testa negativan, isti se ponavlja za 4 tjedna. Ukoliko je bilo koji od 2 testa pozitivan, uzorak se ponovno uzima za 4 tjedna i šalje na serološki test s višom specifičnosti (najčešće AGIDcpa), a pas se smatra sumnjivim na zarazu i stavlja u izolaciju do rezultata sljedećeg testa. Ukoliko potvrdni test bude pozitivan, sljedeći uzorak se najčešće šalje na bakteriološku pretragu kako bi se konačno potvrdila ili isključila zaraza. Za potvrdu, odnosno isključivanje dijagnoze može se upotrijebiti i treći serološki test (AGIDcpa) ili PCR. Štenadi mlađoj od 6 tjedana uzorkuje se krv za 3

uzastopne hemokulture svaka 24 sata nakon čega se pozitivne jedinke uklanjaju (DE MASSIS i sur., 2022.).

2.9. Javno zdravstvo

Brucella canis ima zoonotski potencijal i ne smije se zanemariti mogućnost infekcije veterinarskih i laboratorijskih djelatnika, ljudi koji se profesionalno bave psima ili rizičnih skupina poput imunokompromitiranih osoba (BUHMANN i sur., 2019.), djece (HENSEL i sur., 2018.), starijih osoba (DJOKIC i sur., 2023.) i trudnica (HOLLETT, 2006.). Kada govorimo o nadzoru bruceloze, više se pažnje posvećuje vrstama s većim zoonotskim potencijalom kao što su *B. melitensis*, *B. abortus* i *B. suis*, dok je manje pažnje posvećeno nadzoru bruceloze izazvane vrstom *B. canis*, iako psi žive u bližem kontaktu s ljudima nego farmske životinje (BUHMANN i sur., 2019.).

Ljudi se najčešće inficiraju oronazalnim putem nakon baratanja kontaminiranim tjelesnim tekućinama, pobačenim plodovima i placentom te materijalima, uključujući i laboratorijske uzorke, od zaražene životinje (SANTOS i sur., 2021.). Ne smije se zanemariti ni direktna izloženost veterinarima ovom patogenu pri kastraciji zaražene životinje ili uzorkovanju ejakulata (DJOKIC i sur., 2023.).

Period inkubacije može trajati od tjedan dana do 6 mjeseci (APHA, 2023.). Infekcija i u ljudi može proći subklinički ili se očitovati kao „gripi slična bolest“ s undulirajućom groznicom (HENSEL i sur., 2018.), obilnim znojenjem (COSFORD, 2018.) osobito noću (SYKES, 2023.), depresijom, gubitkom tjelesne mase, limfadenomegalijom (VAN DIJK i sur., 2021.), glavoboljom (KOLWIJCK i sur., 2022.) i mučninom (FORBES i sur., 2019.). Mogu se pojaviti i bol u kralježnici i bol u zglobovima (SANTOS i sur., 2021.), a rjeđe se mogu naći hepatomegalija i splenomegalija (GŁOWACKA i sur., 2018.; SYKES, 2023.). Iako je *B. canis* slabije patogena i uzrokuje blaži oblik bolesti od njenih inačica koje se pojavljuju u farmskih životinja, i dalje se može javiti teža klinička slika i komplikacije u obliku endokarditisa, artritisa, osteomijelitisa, peritonitisa, epiduralnih apscesa (SANTOS i sur., 2021.), pleuralnih izljeva, (COSFORD, 2018.), neurobruceloze (KOLWIJCK i sur., 2022.), te pobačaja (DENTINGER i sur., 2015.). Ipak, pretpostavlja se da većina zdravih, imunokompetentnih osoba neće ni razviti klinički oblik bolesti, dok su teži oblici češće zabilježeni unutar rizične populacije i u ljudi sa komorbiditetima (PHE, 2021.). Opisani su relapsi i neuspjesi u liječenju bruceloze u ljudi (KOLWIJCK i sur., 2022.), no smrtni slučajevi su rijetki osim u slučajevima u kojima se terapija započne prekasno (COSFORD, 2018.), a ukoliko se bolest ne liječi može ostaviti dugotrajne posljedice na ljudsko zdravlje (DJOKIC i sur., 2023.).

Nedostatak programa praćenja bruceloze uzrokovane vrstom *B. canis* u pasa te slobodan promet unutar EU vjerojatni je razlog pojavljivanja bolesti u ljudi. Prvi slučaj zabilježen je u lipnju 2021. godine u Nizozemskoj, a po saznanju autora to je prvi slučaj zaraze ljudi u Europi u 35 godina (KOLWIJCK i sur., 2022.). Radilo se o 55-godišnjoj uzgajivačici pasa koja se zarazila nakon direktnog kontakta sa mrvorodenom štenadi i placentama plodova bolesne kuje uvezene iz Rusije 2020. U Velikoj Britaniji se od ljeta 2020. godine primjećuje se porast u broju slučajeva zaraze u pasa (PHE, 2021.), a prvi slučajevi humane zaraze zabilježeni su u srpnju 2023. godine. Slučaj teže kliničke slike s mučninom, povraćanjem, te bolovima u kralježnici i zglobovima zabilježen je 2018. u Iranu gdje je pacijentici, nakon višestruko negativnih seroloških testova, dijagnoza potvrđena pozitivnim bakteriološkim nalazom aspirata koštane srži (MAJZOOBI i sur., 2018.), te Japanu gdje je 68-godišnjaku nakon brojnih neuroloških simptoma dijagnosticiran meningoencefalitis uzrokovan vrstom *B. canis*. Pacijent je imao pridružene komorbiditete, a oko godinu dana prije pojave prvih simptoma udomio je psa (ISHIHARA i sur., 2023.). WALLACH i sur. (2004.) zabilježili su slučaj zaraze laboratorijskog djelatnika M - sojem vrste *B. canis* nakon baratanja njime u laboratoriju neodgovarajućih biosigurnosnih uvjeta i bez korištenja zaštitne opreme. Nemoukoidni soj *B. canis* inače ima reduciranu virulenciju i čak ni u visokim dozama ne izaziva klasičnu kliničku sliku. COSFORD (2018.) spominje da je zabilježeno nekoliko slučajeva *B. canis* HIV pozitivnih osoba u kojih je bruceloza uspješno izliječena, uz napomenu da su osobe imale adekvatan CD4+ odgovor i negativan „viral load“ tj. virusno opterećenje. HENSEL i sur. (2018.) tvrde da bi se svaki porast u prevalenciji pseće bruceloze u populaciji pasa lualica i mogao odraziti i na zdravlje ljudi pošto mnogo ljudi u SAD-u pse udomljava iz skloništa, a testiranje na vrstu *B. canis* ne provodi se rutinski prije udomljavanja niti prije uvođenja psa u sklonište.

3. ZAKLJUČCI

1. Posljednjih godina u zemljama Zapadne Europe primjećuje se porast u broju slučajeva bruceloze u pasa uvezenih iz zemalja Jugoistočne Europe, a raste i broj potvrđenih slučajeva u ljudi koji su bili u kontaktu sa zaraženim psima.
2. Razlog povećanja pojavnosti bolesti u Zapadnoj Europi leži u nedostatku kontrole i nadzora ove bolesti (većinom u Jugoistočnoj Europi), izostanku svake zakonske regulative koja bi predlagala/zahtijevala obavezno testiranje, barem rasplodnih životinja, te slobodan promet psima na području EU.
3. Razvidan je potpuni nedostatak podataka o proširenosti *B. canis* u Hrvatskoj. Ne postoji niti jedna potvrda ili opis slučaja bruceloze uzrokovane *B. canis* u našoj zemlji, ali su zato dostupni podatci o bar dva psa sa brucelozom koji su iz Hrvatske uveženi u Nizozemsku i Veliku Britaniju.
4. Edukacija i podizanje svijesti veterinarima praktičara mogla bi uvelike pomoći u procjeni mogućih rizika te općenito omogućiti bolje poznavanje ove bolesti. Zbog iznimno kompleksne dijagnostike bilo bi dobro pripremiti protokole koji bi veterinarima kliničarima pomogli u prepoznavanju i dijagnosticiranju *B. canis* u pasa.
5. Također ostaje za istražiti koliki je zapravo zoonotski potencijal *B. canis*. Pitanje koje se postavlja je da li ova bakterija stvarno ima manji zoonotski potencijal u odnosu na druge brucele ili je niža incidencija ovih infekcija u ljudi posljedica uporabe seroloških testova koji su namijenjeni detekciji *B. abortus*, *B. melitensis* i *B. suis* koje imaju O-polisaharid u sklopu površinskog antigena pa neće uspješno detektirati protutijela na *B. canis*.

4. LITERATURA

APHA (2023): Canine Brucellosis: Summary information sheet for veterinary staff, The Animal and Plant Health Agency. <http://apha.defra.gov.uk/documents/surveillance/diseases/Canine-Brucellosis-Summary.pdf> (21.05.2024.)

APHA (2024): Zoonoses and Veterinary Public Health Annual Report 2023 Project FZ2100, The Animal and Plant Health Agency. https://assets.publishing.service.gov.uk/media/65f2cbc898122731a8f612c5/Zoonoses_and_Veterinary_Public_Health_Annual_Report_2023.pdf (21.05.2024.)

BUHMANN, G., F. PAUL, W. HERBST, F. MELZER, G. WOLF, K. HARTMANN, A. FISCHER (2019): Canine Brucellosis: Insights Into the Epidemiologic Situation in Europe. *Front. Vet. Sci.* 6, 151.

COSFORD K. L. (2018): *Brucella canis*: An update on research and clinical management. *Can. Vet. J.* 59, 74–81.

CVETNIĆ, Ž. (2015): *Brucella canis*. U: *Bruceloza*, Medicinska naklada Zagreb, str. 138-150.

CVETNIĆ, S. (2008): *Bruceloza psa*. U: *Bakterijske i gljivične bolesti životinja*, Medicinska naklada Zagreb, str. 230-231.

DARBAZ, I., O. ERGENE (2019): *Brucella canis* and Public Health Risk. *Cyprus J. Med. Sci.* 4, 52–56.

DE MASSIS, F., F. SACCHINI, A. PETRINI, F. BELLUCCI, M. PERILLI, G. GAROFOLO, G. SAVINI, M. TITTARELLI (2022): Canine brucellosis due to *Brucella canis*: description of the disease and control measures. *Vet. Ital.* 58, 5–23.

DENTINGER, C. M., K. JACOB, L. V. LEE, H. A. MENDEZ, K. CHOTIKANATIS, P. L. MCDONOUGH, D. M. CHICO, B. K. DE, R. V. TILLER, R. M. TRAXLER, E. R. CAMPAGNOLO, D. SCHMITT, M. A. GUERRA, S. A. SLAVINSKI (2015): Human *Brucella canis* Infection and Subsequent Laboratory Exposures Associated with a Puppy, New York City, 2012. *Zoonoses. public. health.* 62, 407–414.

DJOKIC, V., L. FREDDI, F. DE MASSIS, E. LAHTI, M. H. VAN DEN ESKER, A.

WHATMORE, A. HAUGHEY, A. C. FERREIRA, G. GAROFOLO, F. MELZER, F. SACCHINI, A. KOETS, S. WYLLIE, A. FONTBONNE, G. GIRAULT, A. F. VICENTE, J. MCGIVEN, C. PONSART (2023): The emergence of *Brucella canis* as a public health threat in Europe: what we know and what we need to learn. *Emerg. Microbes. Infect.*, 12, 2249126.

EGLOFF, S., M. SCHNEEBERGER, S. GOBELI, C. KRUDEWIG, S. SCHMITT, I.M. REICHLER, S. PETERHANS (2018): *Brucella canis* infection in a young dog with epididymitis and orchitis. *Brucella canis Infektion eines jungen Hundes mit Epididymitis und Orchitis. Schweiz. Arch. Tierheilkd.* 160, 743–748.

FORBES, J. N., S. W. FREDERICK, M. Y. SAVAGE, A. R. CROSS (2019): *Brucella canis* sacroiliitis and discospondylitis in a dog. *Can. Vet. J.* 60, 1301–1304.

GLOWACKA, P., D. ŻAKOWSKA, K. NAYLOR, M. NIEMCEWICZ, A. BIELAWSKA-DRÓZD (2018): *Brucella* - Virulence Factors, Pathogenesis and Treatment. *Pol. J. Microbiol.* 67, 151–161.

GRAHAM, L. T., S. N. VITALE, K. D. FOSS, D. W. HAGUE, K. M. ANDERSON, C. W. MADDOX (2022.): Canine brucellosis in three littermates, case report. *Front. Vet. Sci.* 9, 958390.

HELMS, A. B., O. BALOGH, R. FRANKLIN-GUILD, K. LAHMERS, C. C. CASWELL, J. T. CECERE (2021): Presumptive Identification of Smooth *Brucella* Strain Antibodies in Canines. *Front. Vet. Sci.* 8, https://www.researchgate.net/publication/353084351_Presumptive_Identification_of_Smooth_Brucella_Strain_Antibodies_in_Canines (20.04.2024.)

HENSEL, M. E., M. NEGRÓN, A. M. ARENAS-GAMBOA (2018.): Brucellosis in dogs and public health risk. *Emerg. Infect. Dis.* 24(8), 1401–1406.

HOLLETT, R. B. (2006): Canine brucellosis: Outbreaks and compliance. *Theriogenology.* 66, 575–587.

ISHIHARA, M., S. ABE, K. IMAOKA, T. NAKAGAWA, K. KADOTA, H. OGURO, H. NAKAJIMA, S. YAMAGUCHI, A. NAGAI (2023): Meningoencephalomyelitis Caused by *Brucella Canis*: A Case Report and Literature Review. Intern. Med. https://www.researchgate.net/publication/375414328_Meningoencephalomyelitis_Caused_by_Brucella_Canis_A_Case_Report_and_Literature_Review (23.05.2024.)

KANG, S. I., S. E. LEE, J. Y. KIM, K. LEE, J. W. KIM, H. K. LEE, S. R. SUNG, Y. R. HEO, S. C. JUNG, M. HER (2014): A new *Brucella canis* species-specific PCR assay for the diagnosis of canine brucellosis. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. 37, 237–241.

KOLWIJCK, E., S. P. M. LUTGENS, V. X. N. VISSER, M. J. VAN APELDOORN, H. GRAHAM, A. P. KOETS, M. M. W. P. SCHRAUWEN, F. A. G. REUBSAET, E. M. BROENS, L. M. KORTBEEK (2022): First Case of Human *Brucella canis* Infection in the Netherlands. Clin. Inf. Dis. 75, 2250–2252.

LANDIS, M., A. S. ROGOVSKYY (2022): The Brief Case: *Brucella suis* Infection in a Household of Dogs. J. Clin. Microbiol. 60. <https://journals.asm.org/doi/10.1128/jcm.00984-21> (03.04.2024.)

LONG, C., E. BURGERS, C. COPPLE, L. STAINBACK, R. A. PACKER, K. KOPF, J. SCHMIDT, S. EMCH, R. WINDSOR (2022): *Brucella canis* discospondylitis in 33 dogs. Front. Vet. Sci. 9, 1043610.

MAJZOBI, M. M., H. G. R. BASIR, M. R. ARABESTANI, S. AKBARI, H. NAZERI (2018.): Human Brucellosis Caused by *Brucella canis*: A Rare Case Report. Arch. Clin. Inf. Dis. 13. https://www.researchgate.net/publication/327028522_Human_Brucellosis_Caused_by_Brucella_canis_A_Rare_Case_Report (21.05.2024.)

MOL, J. P. S., A. C. B. GUEDES, C. ECKSTEIN, A. P. N. QUINTAL, T. D. SOUZA, L. A. MATHIAS, J. P. A. HADDAD, T. A. PAIXÃO, R. L. SANTOS (2020): Diagnosis of canine brucellosis: comparison of various serologic tests and PCR. J. Vet. Diagn. Invest. Inc. 32, 77–86.

NAGLIĆ, T., D. HAJSIG, J. MADIĆ, L. PINTER (2005): Porodica *Brucellaceae*. U: Veterinarska mikrobiologija Specijalna bakteriologija i mikologija, Čakovec: Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu; Hrvatsko mikrobiološko društvo, str. 19-28.

PARK, W. B., S. KIM, S. M. KYUNG, E. LEE, Y. LEE, H. S. YOO (2023): Gene expression of Toll-like receptors, cytokines and a nuclear factor and cytokine secretion in DH82 canine macrophage cells infected with *Brucella canis*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 260, <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0165242723000612> (15.05.2024.)

PHE (2021): Human Animal Infection and Risk Surveillance Group Risk review and statement on the risk *Brucella canis* presents to the UK human population, Public Health England https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/960013/20210210_Brucella_canis_statement.pdf (20.04.2024.)

RASOOL, A., P. KANNAN, S. THULASIRAMAN (2023): A Comprehensive Review of *Brucella canis*: Zoonotic Risks and Preventive Strategies. *Indian. J. Anim. Reprod.* 44, 8–13.

SANTOS, R. L., T. D. SOUZA, J. P. S. MOL, C. ECKSTEIN, T. A. PAÍXÃO (2021): Canine Brucellosis: An Update. *Front. Vet. Sci.* 8, <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fvets.2021.594291/full> (21.3.2024.)

SCHOCH, C. L., S. CIUFO, M. DOMRACHEV, C. L. HOTTON, S. KANNAN, R. KHOVANSKAYA, D. LEIPE, R. MCVEIGH, K. O'NEILL, B. ROBERTSE, S. SHARMA, V. SOUSSOV, J. P. SULLIVAN, L. SUN, S. TURNER, I. KARSCH-MIZRACHI (2020): NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. *Database (Oxford)*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=118882> (21.03.2024.)

SEO, J. H., Y. I. OH, S. H. KIM, K. W. SEO, B. J. KANG (2023): Clinical infection of *Brucella canis* in a companion dog with discospondylitis in the Republic of Korea. *Vet. Med. (Praha)*. 68, 293–298.

STRANAHAN, L. W., A. M. ARENAS-GAMBOA (2021): When the going gets rough: The significance of *Brucella* lipopolysaccharide phenotype in Host–Pathogen interactions. *Front. Microbiol.* 12, 713157.

SYKES J. E. (2023): Canine Brucellosis. U: *Greene's Infectious Diseases of the Dog and Cat*, 5. izdanje, Sykes, J., Ed., Elsevier: St. Louis, MO, USA, str. 2910-2955.

VAN DIJK, M. A. M., M. Y. ENGELSMA, V. X. N. VISSER, I. KEUR, M. E. HOLTSLAG, N. WILLEMS, B. P. MEIJ, P. T. J. WILLEMSSEN, J. A. WAGENAAR, H. I. J. ROEST, E. M. BROENS (2021): Transboundary Spread of *Brucella canis* through Import of Infected Dogs, the Netherlands, November 2016-December 2018. *Emerg. Infect. Dis.* 27, 1783 –1788.

WALLACH, J. C., G. H. GIAMBARTOLOMEI, P. C. BALDI, C. A. FOSSATI (2004): Human infection with M - strain of *Brucella canis*. *Emerg. Infect. Dis.* 10, 146–148.

WANKE M. M. (2004): Canine brucellosis. *Anim. Reprod. Sci.* 82-83, 195–207.

WYATT, H. V. (2013): Lessons from the history of brucellosis. *Rev. Sci. Tech.* 32, 17-25.

5. SAŽETAK

Bruceloza u pasa

Nika Škiljan

Bruceloza u pasa primarno je uzrokovana vrstom *Brucella canis* koja ima ograničen raspon domaćina koje inficira. Psi i divlji kanidi se smatraju prirodnim domaćinima, ali može oboliti i čovjek. Primarni izvor infekcije su reproduktivni sekreti bolesnih životinja i životinja kliconoša, ali i urin muških životinja. Bolest se najčešće prenosi spolnim putem, ali može se prenijeti i direktnim kontaktom ili kohabitacijom, a inficirati se može svaki spolno zreli pas, neovisno o spolu i o tome je li kastriran ili već prethodno korišten za rasplod ili ne. Klinički znakovi bruceloze u pasa često izostaju ili su vrlo nespecifični, no posumnjati na bolest bi se trebalo kod pobačaja naizgled zdrave ženke koji se javlja oko dva tjedna prije termina štenjenja; orhitisa i epididimitisa praćenih neplodnošću, splenomegalije ili abdominalne limfadenomegalije u pasa s diskospondilitisom, ili kombinacija nekih od navedenih kliničkih znakova. Objektivna dijagnostika bruceloze u pasa iznimno je kompleksna; za potvrdu dijagnoze nije dovoljan samo jedan, već se treba koristiti nekoliko seroloških testova u kombinaciji s drugim metodama poput bakterijske izolacije i identifikacije i molekularnih metoda. Unatoč dugotrajnom liječenju kombinacijom antimikrobnih lijekova i kastraciji bolesnih životinja potpuno izliječenje u pasa je vrlo rijetko. Zbog niske uspješnosti liječenja i zoonotskog potencijala uzročnika najčešće se predlaže eutanazija. Smatramo da je izuzetno važno educirati i podići svijest veterinaru praktičara o ovoj bolesti, olakšati procjenu mogućih rizika te općenito omogućiti bolje poznavanje ove bolesti. Uz prepoznavanje i dijagnosticiranje bolesnih životinja, odgovarajuće higijenske mjere, edukacija vlasnika i ljudi koji se bave psima, te redovito serološko testiranje pasa prije međunarodnih putovanja, rasploda ili uvođenja u uzgoj najznačajnije su preventivne mjere.

Ključne riječi: bruceloza, *B. canis*, psi, reproduktivni poremećaji, diskospondilitis

6. SUMMARY

Brucellosis in dogs

Nika Škiljan

Brucellosis in dogs is primarily caused by *Brucella canis*, which only infects a limited range of hosts. Dogs and wild canids are considered natural hosts, but humans are also susceptible to infection. The main source of infection is the reproductive secretions of sick and carrier animals and the urine of male dogs. The disease is most commonly transmitted sexually, but can also be transmitted through direct contact or cohabitation. Any sexually mature dog can become infected, regardless of sex and whether it has been neutered or previously used for breeding. The infection is often subclinical. Disease should be suspected in the presence of abortions in an apparently healthy bitch occurring about two weeks before parturition; orchitis and epididymitis accompanied by infertility, splenomegaly or abdominal lymphadenomegaly in dogs with discospondylitis, or when a combination of some of the listed clinical signs is present. The diagnosis of canine brucellosis is extremely complex; multiple serological tests should be used in combination with other methods such as bacterial isolation and identification. Despite long-term treatment with a combination of antimicrobial drugs and castration of affected animals, complete recovery in dogs is very rare. Due to poor treatment outcomes and the zoonotic potential of the pathogen, euthanasia is usually recommended. It is extremely important to educate and sensitise practising veterinarians so that this disease can be better recognised and diagnosed. In addition to the identification and diagnosis of sick animals, appropriate hygiene measures, education of owners and people involved with dogs, and regular serological testing of dogs prior to international travel or entry into breeding are the most important preventative measures.

Key words: brucellosis, *B. canis*, dogs, reproductive disorders, discospondylitis

7. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 20. kolovoza 1997. godine u Zagrebu, a odrasla sam u Samoboru gdje završavam Osnovnu školu Bogumila Tonija. Srednjoškolsko obrazovanje nastavljam u XVI. gimnaziji u Zagrebu nakon koje 2016. godine upisujem Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Tokom studija bila sam demonstrator na raznim predmetima, od kojih bih izdvojila predmet Biokemija u veterinarskoj medicini na Zavodu za kemiju i biokemiju, te predmet Zarazne bolesti domaćih životinja na Zavodu za mikrobiologiju i zarazne bolesti s klinikom. U periodu od prosinca 2020. do rujna 2023. godine volontirala sam na Klinici za zarazne bolesti gdje sam imala priliku usavršiti svoje znanje i vještine stečene tokom studija. Stručnu praksu odradila sam u Veterinarskoj stanici Samobor. Tijekom studija redovito sam sudjelovala i u raznim kongresima i radionicama od kojih bih izdvojila: „PLAVI PROJEKT“ – doprinos razvoju programa društveno korisnog učenja na Veterinarskom fakultetu, Sveučilišta u Zagrebu, 8. Hrvatski kongres veterinarara male prakse, 2nd International Students „GREEN Conference“, radionicu “Afrička svinjska kuga u divljih svinja“, te kongres Reptilia.