

Određivanje bakterija *Brucella sp.* metodom lančane reakcije polimerazom

Sanja DUVNJAK,
dipl. ing., molekularni biolog
Silvio ŠPIŠIĆ, mr. sc., dr. vet. med.
Maja ZDELAR-TUK, dr. sc., dr. vet. med.,
znanstveni suradnik
Željko CVETNIĆ, dr. sc., dr. vet. med.,
znanstveni savjetnik

Hrvatski veterinarski institut, Zagreb

Ključne riječi

bruceloza
bakteriologija
molekularna dijagnostika
lančana reakcija polimerazom

Key words

brucellosis
bacteriology
molecular diagnostics
polymerase chain reaction (PCR)

Primljeno: 2008–05–05

Received: 2008–05–05

Prihvaćeno: 2008–06–03

Accepted: 2008–06–03

Uvod

Bruceloza je zarazna bolest domaćih, divljih životinja i ljudi. Za veterinarsku i humanu medicinu najvažnijih je šest vrsta *Brucella*. *Brucella melitensis*, primarno je patogena za ovce i koze, zatim za goveda i svinje, a vrlo je patogena za ljude. *Brucella abortus*, primarno je patogena za goveda, a za infekciju su primljivi konji, deve, ovce, koze, jeleni, psi i ljudi. *Brucella suis*, primarno je patogena za svinje, biovar 1 i 3 su patogeni za ljude (američki i azijski tipovi), dok patogenost biovara 2 (danski tip) nije dokazana u ljudi. Biovarovi 4 i 5 su patogeni za sjeverne jelene.

Znanstveni rad

Bakterije roda *Brucella* su fakultativni unutarstanični mikroorganizmi. Maleni su, gram-negativni, aerobni štapići, koji uzrokuju brucelozu, zaraznu bolest domaćih, divljih životinja i ljudi. Postoji više vrsta, ali za humanu i veterinarsku medicinu najvažnije su: *Brucella melitensis*, *Brucella suis*, *Brucella abortus*, *Brucella ovis* i *Brucella canis*. Cilj ovoga rada je usporediti klasične bakteriološke tehnike s lančanom reakcijom polimeraze u identifikaciji izolata *Brucella sp.* izdvojenih iz ljudi i životinja u Republici Hrvatskoj. Identifikacija je provedena na 47 izolata izdvojenih iz različitih vrsta životinja i ljudi serološki pozitivnih na brucelozu. Bakteriološka identifikacija zasnivala se na usporedbi ponašanja dobivenih kultura s poznatim obrascima ponašanja referentnih sojeva. Nakon izdvajanja *Brucella* bakteriološkim postupcima iz materijala, metodom lančane reakcije polimerazom utvrđivana je pripadnost rodu i pojedinim vrstama. Dokazana je prisutnost različitih vrsta *Brucella sp.* u ljudi, domaćih i divljih životinja u Republici Hrvatskoj te da se identifikacija istih mora temeljiti na kombinaciji klasičnih i molekularnih metoda dijagnostike.

Identification of Bacteria *Brucella sp.* by Using the Polymerase Chain Reaction

Scientific paper

Brucellae are facultative intracellular microorganisms, small, gram-negative, aerobic rods which cause brucellosis, an infectious disease of humans, domestic and wild animals. The most important species in human and veterinary medicine are: *Brucella melitensis*, *Brucella suis*, *Brucella abortus*, *Brucella ovis* and *Brucella canis*. Our goal was to compare the efficiency of classical bacteriological techniques and polymerase chain reaction in the identification of isolated *Brucella sp.* from animals and humans in the Republic of Croatia. The identification was performed on 47 animal and human isolates that were serologically positive for brucellosis. Bacteriological identification was based on comparing the behaviour of isolated cultures with known behaviour patterns of reference strains. Polymerase chain reaction was used to determine the genus *Brucella* and specific species. This study proved the presence of different *Brucella* species in humans, domestic and wild animals in the Republic of Croatia as well as that the identification of these bacteria must be based on the combination of classical and molecular methods of diagnosis.

Brucella ovis je primarno patogena za ovce, u ovnova izaziva epididimitis te se povezuje s pobačajima u ovaca, ali nije patogena za ljude. *Brucella canis* je patogena za pse, ali je patogena i za čovjeka. *Brucella neotomae* je utvrđena u pustinjaškog šatoka *Neotoma lepida*. Bolest je osobito raširena u goveda i svinja po čitavom svijetu, a u koza i ovaca u mediteranskim zemljama pa tako i u nas.

Bruceloza je zoonoza i kao takva je profesionalna zarazna. Obično se prenosi sa životinje na čovjeka. Akutni i septikemijski stadij karakteriziraju vrućica, znojenje, opća slabost, bolovi i drugi opći infektivni simptomi. U subakutno-kroničnom stadiju, koji može trajati mjesecima i

godinama, temperatura ima valovit ili češće intermitentan karakter. Javljaju se lokalni simptomi od strane različitih organa i tkiva, među kojima važno mjesto zauzimaju i neuro-psihijatrijske manifestacije.

Dijagnostika bruceloze zasniva se na serološkim i bakteriološkim metodama. Klasične serološke metode nisu uvijek dovoljno osjetljive i specifične, sa čestim križnim reakcijama s drugim gram-negativnim bakterijama. Bakteriološka pretraga, koja obuhvaća izdvajanje i identifikaciju uzročnika, je najpouzdanija i najsigurnija metoda u dijagnostici bruceloze. Sam proces je dug i zahtjevan, a u novije doba primjenjuju se i molekularne metode. Lančana reakcija polimerazom je metoda koja samostalno ili u kombinaciji s klasičnim bakteriološkim tehnikama pruža siguran dokaz *Brucella* sp. u materijalu ili izolatu.

Brucele su maleni, gram-negativni, aerobni štapići, često kokoidalne veličine $0,5-0,7 \times 0,7-1,5 \mu\text{m}$. Pojavljuju se samostalno, u parovima ili u kratkim lancima. Nisu gibljive, nesporogene su i ne stvaraju kapsule.

Bakterije roda *Brucella* su fakultativni unutarstanični mikroorganizmi koji pripadaju α -2 podskupini Proteobakterija. Kao gram-negativne bakterije imaju ovojnicu građenu od citoplazmatske membrane, a njezin unutrašnji sloj od peptidoglikana. Ta je membrana spojena sa vanjskom membranom koja pretežno sadrži fosfolipide, lipopolisaharide i proteine. U unutrašnjosti stanice je najmanje 20 proteinskih ili glikoproteinskih antigena.

Pošto je vanjska membrana u izravnoj vezi s okolinom, smatra se da su glavne razlike u virulenciji i odabiru domaćina upravo s njom povezane. Proteini vanjske membrane su najviše istraživani i otkrivene su tri skupine proteina koje su definirane u odnosu na njihovu molekularnu masu: skupina 1–94 ili 88 kDa; skupina 2–36–38 kDa (porini) te skupina 3–31–34 kDa i 25–27 kDa (Omp31 i Omp25). Daljnjim istraživanjima uočena je značajna razlika u genima za pojedine proteine vanjske membrane na razini vrste i pojedinog biovara. Najviše istraživani su Omp2a i Omp2b te Omp25 i Omp31 [1–7].

Morfološki nije moguće razlikovati pojedine vrste *Brucellae*. Bitne su razlike u njihovim biokemijskim svojstvima i u patogenosti. O genomu bakterija roda *Brucella* još se uvijek ne zna mnogo. Pronađen je značajan broj podudarnih slijedova s drugim bakterijama kao one rodova *Rickettsia*, *Agrobacterium* i *Rhizobium*, koje kao i *Brucella*, pripadaju α -2 podskupini Proteobakterija. Ukupno 220 od 925 novopronađenih gena pokazuju sličnosti s bakterijskim slijedovima koje pripadaju ovoj skupini bakterija. Ovakvi dokazi samo potvrđuju usku filogenetsku povezanost ovih bakterija, činjenica već istaknuta sekvenciranjem 16S rRNA [8–14].

Cilj rada

Iz raspoloživog materijala dokazati i identificirati uzročnika klasičnim bakteriološkim postupcima i metodom

lančane reakcije polimerazom (PCR) te usporediti osjetljivost i specifičnost bakterioloških i molekularnih metoda u određivanju pojedinih sojeva bakterija roda *Brucella*.

Materijali i metode

U ovom radu za bakteriološku i molekularnu identifikaciju koristili smo izolate izdvojene iz različitih vrsta životinja i ljudi s različitih područja Republike Hrvatske (Tablica 1), a pozitivnih na brucelozu. Materijal je sakupljen tijekom 2003. i 2004. godine, a provedena je i identifikacija nekih izolata brucela koji su arhivirani u Laboratoriju za bakterijske zoonoze i molekularnu dijagnostiku bakterijskih bolesti Hrvatskog veterinarskog instituta Zagreb. Tijekom istraživanja ukupno smo obradili 47 izolata, izdvojenih iz ljudi (8 izolata), ovaca (11 izolata), koza (5 izolata), goveda (11 izolata), svinja (11 izolata) i zeca (1 izolat) (Tablica 1).

Tablica 1. Prikaz izolata korištenih za identifikaciju
Table 1. Isolates used for identification

Br. / No.	Uzorak / oznaka / Sample / Mark	Podrijetlo / Origin
REF.	<i>B. abortus</i> 544	referentni soj / reference strain
REF.	<i>B. melitensis</i> 16M	referentni soj / reference strain
REF.	<i>B. suis</i> 1330	referentni soj / reference strain
REF.	<i>B. ovis</i> 63/290	referentni soj / reference strain
REF.	<i>B. ovis</i> REO 198	referentni soj / reference strain
1	Čovjek 1 / Human 1	čovjek / human / (Sinj)
2	Čovjek 2 / Human 2	čovjek / human / (Sinj)
3	Čovjek 3 / Human 3	čovjek / human / (Metković)
4	Čovjek 4 / Human 4	čovjek / human / (Varaždin)
5	Čovjek 5 / Human 5	čovjek / human / (Skopje)
6	Čovjek 6 / Human 6	čovjek / human / (Bjelovar)
7	Čovjek 7 / Human 7	čovjek / human / (Bjelovar)
8	Čovjek 8 / Human 8	čovjek / human / (Sarajevo)
9	VP1	ovca/ovan / sheep/ram (Slatina)
10	VP2	ovca/ovan / sheep/ram (Slatina)
11	VP3	ovca/ovan / sheep/ram (Slatina)
12	VP4	ovca/ovan / sheep/ram (Slatina)
13	VP5	ovca/ovan / sheep/ram (Slatina)
14	VP6	ovca/ovan / sheep/ram (Slatina)
15	VP7	ovca/ovan / sheep/ram (Slatina)
16	KA1	ovca/ovan / sheep/ram (Karlovac)
17	KA2	ovca/ovan / sheep/ram (Karlovac)
18	KA3	ovca/ovan / sheep/ram (Karlovac)
19	KA4	ovca/ovan / sheep/ram (Karlovac)
20	S1	svinja / swine (Đakovo)

nastavak tablice na sljedećoj stranici

nastavak tablice sa str. 126

Br. / No.	Uzorak / oznaka / Sample / Mark	Podrijetlo / Origin
21	S2	svinja / swine (Đakovo)
22	S3	svinja / swine (Sisak)
23	S4	svinja / swine (Sisak)
24	S4	svinja / swine (Sunja)
25	S5	svinja / swine (Donji Miholjac)
26	S6	svinja / swine (Donji Miholjac)
27	S7	svinja / swine (Zdenčina)
28	S8	svinja / swine (Đakovo)
29	S9	svinja / swine (Đakovo)
30	S10	svinja / swine (Martinska Ves)
31	K1	koza / goat (Istra)
32	K2	koza / goat (Split)
33	K3	koza / goat (Sinj)
34	K4	koza / goat (Istra)
35	K5	koza / goat (Istra)
36	G1	govedo / bovine (Baranja)
37	G2	govedo / bovine (Baranja)
38	G3	govedo / bovine (Baranja)
39	G4	govedo / bovine (Baranja)
40	G5	govedo / bovine (Baranja)
41	G6	govedo / bovine (Baranja)
42	G7	govedo / bovine (Novska)
43	G8	govedo / bovine (Novska)
44	G9	govedo / bovine (Sisak)
45	G10	govedo / bovine (Sisak)
46	G11	govedo / bovine (Sisak)
47	Z1	zec / rabbit (Đurđenovac)

Bakteriološka pretraga

Za bakteriološku pretragu prilikom klanja uzeli smo testise mužjaka, maternice ženki, limfne čvorove (supramamarni, ilijačni, skapularni, submandibularni, retrofaringealni), slezenu i tkivo mliječne žlijezde, te krv ljudi. Sve organe, tkiva i krvi obradili smo u roku od 48 sata po uzorkovanju, a do obrade pohranili smo ih u hladnjak na 4 °C. Bakteriološka obrada materijala sastoji se od mikroskopske pretrage materijala, obrade i zasijavanja materijala na podloge te identifikacije izdvojenih izolata [15].

Mikroskopsku pretragu izvršili smo na razmazu sjemenca, placente, vaginalne sluzi, a također i drugih tkiva. Razmaze smo bojali modificiranom metodom po Stampu.

Obrada i zasijavanje materijala. Nekoliko grama dostavljenog materijala (testisa, maternica i limfnih čvorova) stavili smo u otopinu alkohola i sterilizirali na plameniku, te u plastičnoj vrećici sterilnim škarama narezali na što

manje komadiće. U vrećice s materijalom dodali smo 5–10 mL fiziološke otopine, a homogenizaciju vršili pomoću aparata za usitnjavanje, stomahera. Oko 1 mL homogenata nacijepili smo na selektivne hranjive podloge i to na krvni agar, *Brucella* agar i Farrellov medij [16]. Posude s nacijepjenim materijalom inkubirali smo u termostatu pri temperaturi od 37 °C uz dodatak 5–10 % CO₂. Rast kolonija promatrali smo u razmacima od 24 sata, ali obično je bio vidljiv nakon 2–7 dana.

Identifikacija izdvojenih kultura. Izolate smo identificirali na osnovi morfologije kolonija (sitne, konveksne, prozirne i hrapave), rastu na CO₂, proizvodnji H₂S, rastu na podlogama s dodatkom thionina, bazičnog fuchsina i safranina te aglutinacije s monospecifičnim antiserumima (A i M). Pojedine kolonije identificirali smo usporedbom dobivenih rezultata sa poznatim obrascima ponašanja referentnih sojeva [16, 17].

H₂S listići za testiranje. Listiće namočene u 10 %-tnu otopinu olovnog acetata umetali smo u pojedine kušalice tako da ne dodiruju medij. Ako kolonija stvara sumporovodik, listić će se zacrniti. Rezultate smo bilježili dnevno, a listiće smo mijenjali svaki dan tijekom 4 dana.

Izolacija genomske DNK iz kulture

Ušicu kulture *Brucella sp.* razmutili smo u 50 µL destilirane vode u Eppendorfovoj kušalici od 2 mL. Ovu smjesu grijali smo 15 minuta na 100 °C u termobloku uz povremeno tresenje. Potom smo kušalice centrifugirali na 14000 g kroz 1 minutu. Za potrebe pretrage koristili smo 2 ili 5 µL nadtaloga.

Lančana reakcija polimerazom (PCR)

Lančana reakcija polimerazom ima velike prednosti nad standardnim bakteriološkim metodama jer je, osim iznimne osjetljivosti, i znatno brža. Nakon izdvajanja brucela bakteriološkim tehnikama iz materijala, metodom lančane reakcije polimerazom (PCR) utvrđivali smo priпадnost istih rodu *Brucella* i pojedinim vrstama:

1.) Pripadnost rodu *Brucella* dokazivali smo umnožavanjem dijela genoma koji kodira sintezu proteina BCSP-31. Ovaj protein je membranski antigen osebujan za rod *Brucella*. Veličina proizvoda umnožavanja iznosi 443 bp (baznih parova) [18, 19]. Sastav reakcijske mješavine: Reakcijska mješavina za svaki uzorak sastojala se od 46 µL otopine Hot Start Master Mix kit (Qiagen), a osnovni sastojci kao što su MgCl₂, pufer, Taq polimeraza i sva četiri deoksiribonukleotida nalazili su se u koncentracijama propisanim od proizvođača. U ovu otopinu dodali smo po 1µL od svake početnice (100 µM/µL) i 2 µL nadtaloga istraživanog DNK izolata. Ukupna količina reakcijske mješavine tako je iznosila 50 µL. Umnožavanje smo vršili pomoću Thermocyclera AB 2700 (Applied Biosystems) prema programu [19]:

2.) Pripadnost pojedinoj vrsti dokazivali smo specifičnim početnicama pomoću kojih se unutar insercijske sekvence IS711 umnožava slijed nukleotida osebujan za pojedinu vrstu [20, 21]. U ovoj pretrazi očekivane veličine proizvoda umnožavanja iznose: *B. ovis* 976 bp, *B. melitensis* 731 bp, *B. abortus* 498 bp, i *B. suis* 285 bp. Sastav reakcijske mješavine: Reakcijska mješavina sastojala se od 60 mM Tris-HCl pufera (pH 3), 15 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1,5 mM MgCl_2 , 250 mM svakog od četiri dNTP-a, 0,2 μM svake od 4 početnice (*B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis* i *B. ovis*) i 0,8 μM IS711 specifične početnice. Na 45 μL reakcijske mješavine dodavali smo 1 jedinicu Taq polimeraze (HotStarTaq Polymerase, Invitrogen) i 5 μL DNK uzorka. Umnožavanje je slijedilo prema referenci [20].

Proizvode umnožavanja razdvojili smo u 2 %-tnom agaroznom gelu i obojili etidijevim bromidom. Vizualizaciju proizvoda umnožavanja vršili smo pomoću UV transiluminatora i kamerom BioCapt Document Sistem (Vilbert Lourmat).

Rezultati

Rezultati bakterioloških pretraga

Bakteriološkom pretragom obradili smo uzorke organa ovaca, koza, goveda, svinja i krvi ljudi. Izdvojili smo 47 izolata *Brucella sp.* podrijetlom iz ljudi (8 izolata), ovaca (11 izolata), koza (5 izolata), goveda (11 izolata), svinja (11 izolata) i zeca (1 izolat) tj. 13 izolata *B. melitensis* (27,7%), 12 izolata *B. suis* (25,5%), 11 izolata *B. abortus* (23,4%) te 11 izolata *B. ovis* (23,4%). Na razini biovarova detektirano je 8 izolata *B. melitensis* bv. 3 te 5 izolata bv. 1; 1 izolat *B. suis* bv. 1, 9 bv. 2 i 2 bv. 3 te svih 11 izolata *B. abortus* idenificirani su kao bv. 1.

Posude s nacijepljenim materijalom promatrali smo u razmacima od 24 sata. Kolonije su bile vidljive od 2 do 7 dana inkubacije. Izdvojeni izolati iz ljudi, koza i svinja rasli su u termostatu pri normalnoj atmosferi, a izolati podrijetlom iz ovaca, ovnova i goveda uz nazočnost 10% CO_2 u atmosferi. Primijetili smo različitost u morfologiji kolonija. Narasle su kolonije izdvojene iz organa ovaca i ovnova bile hrapave (R kolonije), a ostale kolonije su bile glatke (S kolonije).

Ljudski (8 izolata oznake 1.–8.) i kozji (5 izolata oznake 31.–35.) izolati nisu rasli uz nazočnost CO_2 u atmosferi, nisu stvarali H_2S , rasli su na podlogama uz dodatak thionina, fuchsina i safranina. Na temelju tih svojstava sve navedene izolate identificirali smo kao izolate *Brucella melitensis*, a utvrđeni su biovar 1 i 3 što smo zaključili na osnovi reakcija s monospecifičnim serumima.

Izolati podrijetlom iz goveda (11 izolata oznake 36.–44.) rasli su uz nazočnost CO_2 i stvarali su H_2S , nisu rasli na podlogama s dodatkom thionina, a ovisno o biova-

ru (1 ili 3) rast je bio različit na podlogama uz dodatak fuchsina i safranina. Svi izdvojeni izolati reagirali su s monospecifičnim serumom A.

Izolati podrijetlom iz svinja (11 izolata oznake 20.–30.) rasli su u normalnoj atmosferi na 37 °C, nisu stvarali H_2S . Svi izolati su rasli na podlogama uz dodatak thionina i reagirali su s A monospecifičnim serumom. Samo neki su rasli na podlogama s fuchsinom (21. i 28.). Na temelju navedenih rezultata identificirali smo ih kao *Brucella suis* biovar 2 i 3.

Izolati podrijetlom od ovaca ili ovnova iz područja Virovitičko-podravske i Karlovačke županije su za rast trebali nazočnost 10% CO_2 , rasli su na podlogama uz dodatak thionina i svi su reagirali s R monospecifičnim serumom koji je specifičan za R kolonije. Na temelju dobivenih rezultata u svih izdvojenih izolata identificirali smo *Brucella ovis*.

Sama bakteriološka pretraga je dugotrajna i subjektivna, međutim, razlikuje pojedine vrste brucela na razini biovara. Također, potrebno je naglasiti da je nemoguće preskočiti bilo koji njezin dio jer je cjelokupnost nužna u svrhu dobivanja kvalitetnih i detaljnih rezultata koji se međusobno nadopunjavaju kako bi nastala konačna slika.

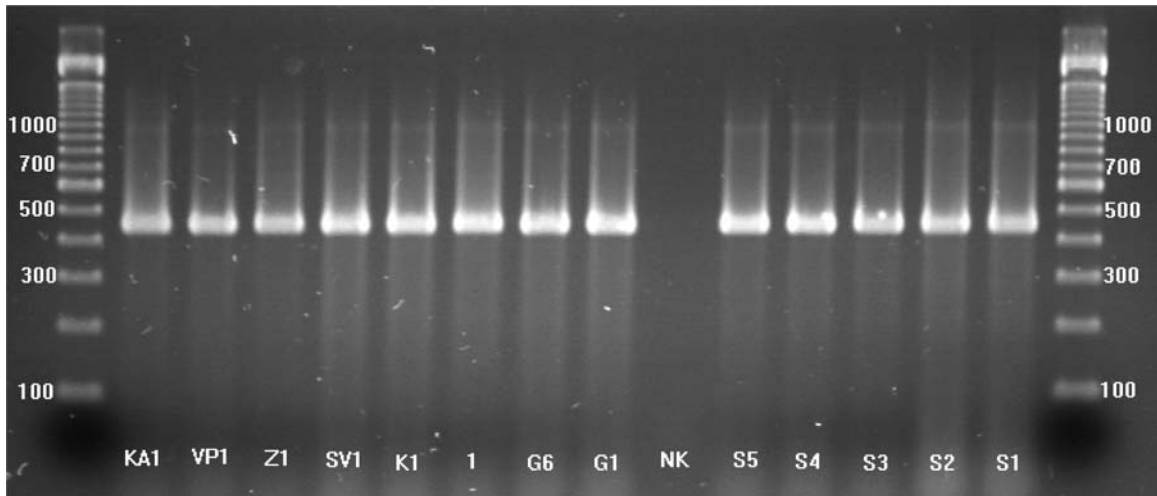
Rezultati molekularnih pretraga

Nakon izdvajanja i identifikacije *Brucella sp.* klasičnim bakteriološkim postupcima, proveli smo i identifikaciju metodom lančane reakcije polimerazom. U skladu s bakteriološkom pretragom svi izolati su potvrđeni kao pripadnici roda *Brucella* (Slika 1). Nadalje, identificirano je 13 izolata *B. melitensis* (27,7%) (Slika 3), 12 izolata *B. suis* (25,5%) (Slika 4), 11 izolata *B. abortus* (23,4%) (Slika 2) te 11 izolata *B. ovis* (23,4%) (Slika 5).

Korištene početnice omogućile su identifikaciju na razini roda i vrste, međutim, ne i na razini biovara. Naime, prema referenci [6] moguće je identificirati samo *Brucella abortus* bv. 1, 2, and 4; *Brucella melitensis*; *Brucella ovis* i *Brucella suis* bv.1. Ostale biovarove ne može se detektirati ovom skupinom početnica. Ipak, molekularna pretraga je puno brža, jednostavnija i sigurnija te osjetljivija i specifičnija jer rezultati nisu subjektivne prirode, a zahtjevaju puno manje količine materijala.

Rasprava

Od svih bolesti koje su tijekom stoljeća ugrožavale zdravlje ljudi i životinja brucelozi svakako pripada najznačajnije mjesto. Iskustva stjecana stoljećima te temeljito poznavanje odlika bolesti prouzročene brucelama nisu bila dovoljna da rat protiv ove opasne zoonoze bude završen. Bruceloza je jedna od najopasnijih zoonoza koja se još naziva mediteranska ili malteška groznica. Veterinari su u Hrvatskoj dugi niz godina sustavnim radom uspjeli gotovo

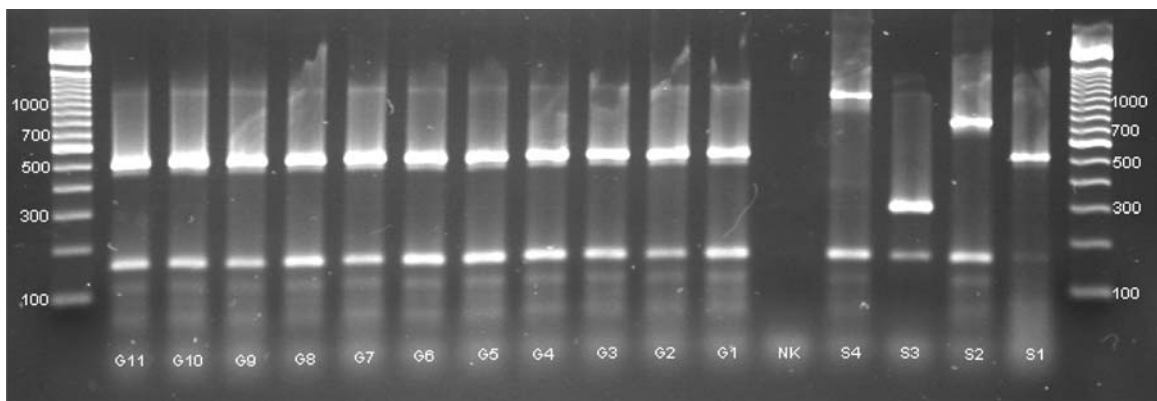


Slika 1. Dokaz pripadnosti izdvojenih izolata rodu *Brucella*
Figure 1. Evidence that isolates belong to genus *Brucella*

Legenda Slika 1 / Legend Figure 1:

- | | |
|---------------------------------------------|---------------------------------------------|
| G1 izolat iz goveda / bovine isolate | KA1 izolat iz ovce/ovna / sheep/ram isolate |
| G6 izolat iz goveda / bovine isolate | NK negativna kontrola / negative control |
| 1 izolat iz čovjeka / human isolate | S1 <i>Brucella ovis</i> 63/290 |
| K1 izolat iz koze / goat isolate | S2 <i>Brucella ovis</i> REO 198 |
| SV1 izolat iz svinje / swine isolate | S3 <i>Brucella melitensis</i> 16 M |
| Z1 izolat iz zeca / rabbit isolate | S4 <i>Brucella abortus</i> 544 |
| VP1 izolat iz ovce/ovna / sheep/ram isolate | S5 <i>Brucella suis</i> 1330 |

- 100 veličina proizvoda umnožavanja 100 baznih parova / PCR products 100 base pairs in size
 300 veličina proizvoda umnožavanja 300 baznih parova / PCR products 300 base pairs in size
 500 veličina proizvoda umnožavanja 500 baznih parova / PCR products 500 base pairs in size
 700 veličina proizvoda umnožavanja 700 baznih parova / PCR products 700 base pairs in size
 1000 veličina proizvoda umnožavanja 1000 baznih parova / PCR products 1000 base pairs in size



Slika 2. Dokaz pripadnosti izolata izdvojenih iz goveda vrsti *B. abortus*
Figure 2 Evidence that bovine isolates belong to *B. abortus*

Legenda Slika 2 / Legend Figure 2:

- | | |
|--------------------------------------------|------------------------------------|
| G1–G11 izolati iz goveda / bovine isolates | S2 <i>Brucella melitensis</i> 16 M |
| NK negativna kontrola / negative control | S3 <i>Brucella suis</i> 1330 |
| S1 <i>Brucella abortus</i> 544 | S4 <i>Brucella ovis</i> 63/290 |

- 100 veličina proizvoda umnožavanja 100 baznih parova / PCR products 100 base pairs in size
 300 veličina proizvoda umnožavanja 300 baznih parova / PCR products 300 base pairs in size
 500 veličina proizvoda umnožavanja 500 baznih parova / PCR products 500 base pairs in size
 700 veličina proizvoda umnožavanja 700 baznih parova / PCR products 700 base pairs in size
 1000 veličina proizvoda umnožavanja 1000 baznih parova / PCR products 1000 base pairs in size

suzbiti ovu bolest, ali unatoč svim naporima ona i dalje opstaje u različitim intenzitetima. Da bi se spriječila i u početku suzbile epidemije i epizootije navedenih bolesti u ljudi i životinja, potreban je stalan nadzor nad zdravljem životinja s obzirom na brucelozu jer su koze prirodni spremnik *Brucelle* (*B.*) *melitensis*, goveda *B. abortus*, svinje *B. suis* i psi *B. canis*. Najčešće od bruceloze prvo obole ljudi koji su profesionalno vezani za rad sa stokom (stočari, veterinari, farmeri), a zatim i ostali koji konzumiraju proizvode (mlijeko, sir) zaraženih životinja. Najčešće u životinja na temelju kliničke slike nije moguće utvrditi bolest osim u slučajevima sporadičnih pobačaja. Iz tog razloga su za to potrebni dobro obučeni veterinari i veterinarski inspektori koji će znati pravilno dijagnosticirati bolest te poslati odgovarajući materijal u dijagnostički laboratorij radi dokazivanja bruceloze u pojedinom stadu [22, 23].

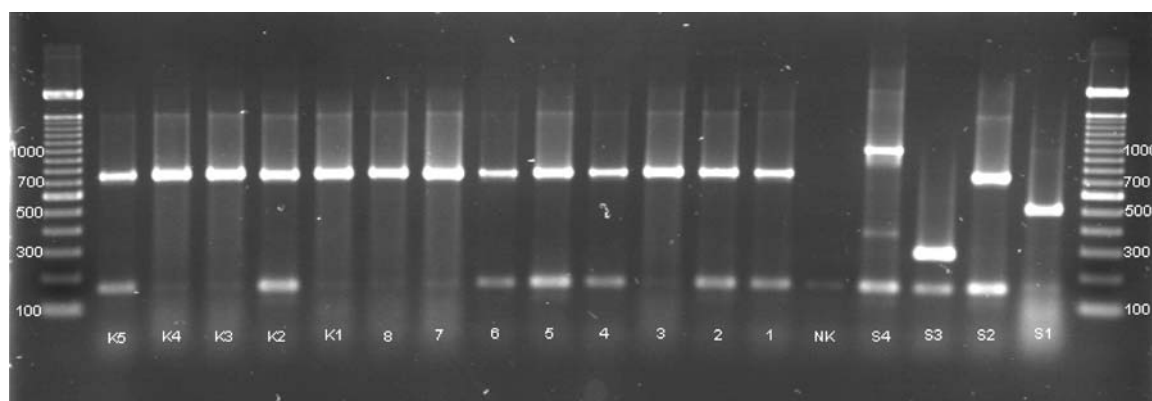
U radu smo prikazali rezultate bakteriološke i molekularne identifikacije izolata izdvojenih iz različitih vrsta životinja i ljudi tijekom 2003. i 2004. godine, a proveli smo i identifikaciju nekih izolata brucela koji su arhivirani u Laboratoriju za bakterijske zoonoze i molekularnu dijagnostiku bakterijskih bolesti Hrvatskog veterinarskog instituta Zagreb. Tijekom istraživanja obradili smo 47 izolata podrijetlom iz ljudi (8 izolata), ovaca (11 izolata), koza (5 izolata), goveda (11 izolata), svinja (11 izolata) i zeca (1 izolat).

B. melitensis smo identificirali iz izolata podrijetlom iz ljudi (8 izolata) i koza (5 izolata). Bruceloza u ovaca i koza dokazana je prvi puta u Hrvatskoj 1947. godine kamo je

dospjela 1943. godine iz Furlanije. Tamo su, naime, stočari sjevernog dijela Istre dogonili svoje ovce na ispašu i tu su ovce dolazile u dodir s ovcama iz zaraženih područja južne Italije koje su u bijegu pred savezničkim snagama dovodile njemačke jedinice [24]. Tako je prema Ceku [25] godine 1949. prijavljeno 176 oboljelih ljudi. Tada se navodi da je posljednji slučaj oboljelog čovjeka utvrđen 1954. godine, a u ovaca i koza još 1961. godine. Od tada pa do 1990. nije bila zabilježena epizootija melitokokoze, kada je ponovno dokazana u Istri, a sljedeće godine u varaždinskoj te kasnije u bjelovarskoj regiji. Tijekom našeg istraživanja, u ljeto 2004. godine, dokazana je bolest u ljudi i koza u Splitsko-dalmatinskoj županiji.

Usporedbom bakterioloških i molekularnih pretraga izolata došli smo do sljedećih zaključaka. Izolati podrijetlom iz ljudi te koza, čiji su oni vlasnici, K2 i K3 identificirali smo kao *B. melitensis* biovar 3. Izolati iz ljudi te koza oznake K1, K4 i K5 identificirali smo kao *B. melitensis* biovar 1. Navedena epizootija u Istri je uzrokovana nekontroliranim prometom koza podrijetlom iz Kosova na područje Istre, te je istovjetan biovar *B. melitensis* utvrđen u koza i ljudi u Istri. Bruceloza uzrokovana *B. melitensis* rasprostranjena je u zemljama Mediterana, te je u tim zemljama i broj ljudi oboljelih od ove bolesti znan. Jackson i sur. [26] navode prevalenciju bruceloze u 19–32 % stada na području Kosova.

Bruceloza u goveda suzbijena je 1965. godine. U istraživanju smo koristili izolati s područja Baranje i Siska (ukupno 11 izolata), a identificirali smo *Brucella abortus*

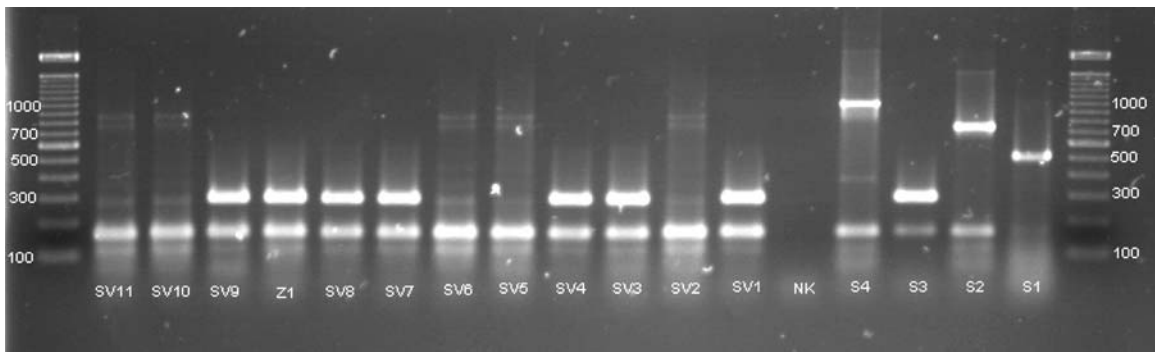


Slika 3. Dokaz pripadnosti izolata izdvojenih iz ljudi i koza vrsti *B. melitensis*
Figure 3. Evidence that human and goat isolates belong to *B. melitensis*

Legenda Slika 3 / Legend Figure 3:

1–8	izolati iz ljudi / human isolates	S2	<i>Brucella melitensis</i> 16 M
K1–K5	izolati iz koza / goat isolates	S3	<i>Brucella suis</i> 63/290
NK	negativna kontrola / negative control	S4	<i>Brucella ovis</i> 1330
S1	<i>Brucella abortus</i> 544		

100	veličina proizvoda umnožavanja 100 baznih parova / PCR products 100 base pairs in size
300	veličina proizvoda umnožavanja 300 baznih parova / PCR products 300 base pairs in size
500	veličina proizvoda umnožavanja 500 baznih parova / PCR products 500 base pairs in size
700	veličina proizvoda umnožavanja 700 baznih parova / PCR products 700 base pairs in size
1000	veličina proizvoda umnožavanja 1000 baznih parova / PCR products 1000 base pairs in size

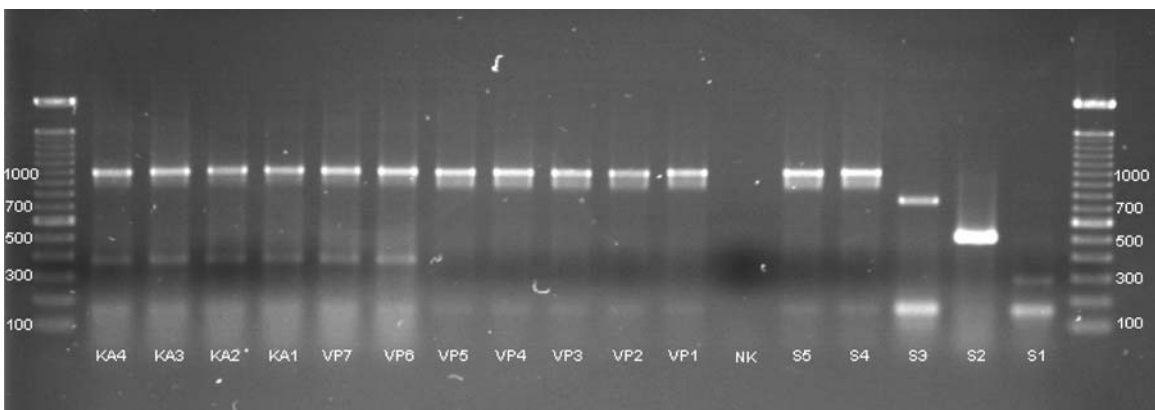


Slika 4. Dokaz pripadnosti izolata izdvojenih iz svinja i divljeg zeca vrsti *B. suis*
Figure 4. Evidence that swine and wild rabbit isolates belong to *B. suis*

Legenda Slika 4 / Legend Figure 4:

SV 1–SV 11 izolati iz svinja / swine isolates	S2 <i>Brucella melitensis</i> 16 M
Z1 izolat iz divljeg zeca / wild rabbit isolate	S3 <i>Brucella suis</i> 1330
NK negativna kontrola / negative control	S4 <i>Brucella ovis</i> 63/290
S1 <i>Brucella abortus</i> 544	

100 veličina proizvoda umnožavanja 100 baznih parova / PCR products 100 base pairs in size
 300 veličina proizvoda umnožavanja 300 baznih parova / PCR products 300 base pairs in size
 500 veličina proizvoda umnožavanja 500 baznih parova / PCR products 500 base pairs in size
 700 veličina proizvoda umnožavanja 700 baznih parova / PCR products 700 base pairs in size
 1000 veličina proizvoda umnožavanja 1000 baznih parova / PCR products 1000 base pairs in size



Slika 5. Dokaz pripadnosti izolata izdvojenih iz ovaca i ovnova vrsti *B. ovis*
Figure 5. Evidence that sheep and ram isolates belong to *B. ovis*

Legenda Slika 5 / Legend Figure 5:

VP 1–VP 7 izolati ovaca i ovnova izdvojeni u Virovitici / sheep and ram isolates from Virovitica	S1 <i>Brucella abortus</i> 544
KA 1–KA 4 izolati ovaca i ovnova izdvojeni u Karlovcu / sheep and ram isolates from Karlovac	S2 <i>Brucella melitensis</i> 16 M
NK negativna kontrola / negative control	S3 <i>Brucella suis</i> 1330
	S4 <i>Brucella ovis</i> 63/290
	S4 <i>Brucella ovis</i> REO

100 veličina proizvoda umnožavanja 100 baznih parova / PCR products 100 base pairs in size
 300 veličina proizvoda umnožavanja 300 baznih parova / PCR products 300 base pairs in size
 500 veličina proizvoda umnožavanja 500 baznih parova / PCR products 500 base pairs in size
 700 veličina proizvoda umnožavanja 700 baznih parova / PCR products 700 base pairs in size
 1000 veličina proizvoda umnožavanja 1000 baznih parova / PCR products 1000 base pairs in size

biovar 1. U razdoblju od 1990. do 2001. godine, serološki je na brucelozu pretraženo više stotina tisuća seruma goveda i rezultat je uvijek bio negativan [27].

Bruceloza u svinja je stalno prisutna bolest u Hrvatskoj [28]. Javljuju se povremene epizootije u domaćih i divljih

svinja, posebno na prostoru uz rijeku Savu. Od 11 izdvojenih izolata svinja *B. suis* biovar 2 pripadalo je 9 izolata, a biovaru 3 dva izolata. Posebno je zanimljiv nalaz i identifikacija *B. suis* biovar 3. U srednjoj i zapadnoj Europi najčešće je u svinja uzročnik bruceloze *B. suis* biovar 2 čiji su

prirodni nosioci zečevi i divlje svinje [29]. Našim istraživanjem u izolatu podrijetlom iz zeca identificirali smo *B. suis* biovar 1. U sjevernoj, južnoj Americi i Aziji javljaju se *B. suis* biovar 1 i 3 [30]. Na području Hrvatske, u regijama koje se prostiru uz Savu dokazano je postojanje bruceloze u domaćih i divljih svinja. U navedenim regijama često se rasplodne svinje drže pašno ili u šumi te je kontakt s mnoštvom drugih svinja, ali i s divljim svinjama prisutan. Najčešće je iz izdvojenih sojeva dokazana *B. suis* biovar 2 [28, 31]. Bruceloza svinja može imati i značajne implikacije i na javno zdravstvo prvenstveno zbog toga što su *B. suis* biovar 1 i 3 patogeni za ljude. Uvidjeli smo i razliku između pojedinih izolata *B. suis* biovar 2 (S5, S6, S10 i S11) i biovara 3 (S2) gdje sa specifičnim početnicama kod metode lančane reakcije polimerazom nismo uspjeli dokazati navedene biovarove. Navedene biovarove potvrdili smo bakteriološkim metodama, a rezultate je potvrdio i referentni laboratorij OIE (AFFSA Pariz – Francuska). Navedeni postupak sa sigurnošću dokazuje *B. suis* biovar 1 dok se ostali biovarovi *B. suis* (2 i 3) mogu, ali i ne moraju dokazati upotrebom ovih početnica. Na temelju ovih rezultata vidljivo je da postoji znatna razlika u nukleotidnim slijedovima istraživanog dijela DNK pojedinih istovjetnih biovarova *B. suis* [20]. Ipak, najčešći biovar *B. suis* u domaćih i divljih svinja je *B. suis* biovar 2. Divlje svinje su spremnici *B. suis* biovar 2, a na taj način i mogući izvor te bakterije u prirodi. Ozbiljan problem predstavlja nalaz *B. suis* biovara 3 (S 2 i S 9). Opisan je nalaz i *B. suis* biovara 3 u dvije kobile u Republici Hrvatskoj [32].

Brucella ovis uzrokuje kroničnu bolest ovaca za koju su karakteristične patološke promjene na testisima i epididimisu ovnova te placentitis u ovaca. Takve promjene uzrokuju slabiju plodnost u ovnova, povremene pobačaje u ovaca te pomore avitalne janjadi. Procjenjuje se da bolest može uzrokovati znatne gubitke u ovčarskoj industriji.

Infekcija u ovaca uzrokovana vrstom *Brucella ovis* (*B. ovis*) prvi je puta opisana 1952. u Novom Zelandu, a godine 1953. i u Australiji. Javlja se i u drugim zemljama u kojima se uzgajaju ovce [33].

Laboratorijska dijagnostika infekcije vrstom *B. ovis* razlikuje se od dijagnostike ostalih vrsta roda *Brucella*, a temelji se na činjenici da *B. ovis* raste samo u R obliku kolonija i u serološkoj dijagnostici se ne koristi isti antigen kao za dijagnostiku infekcija čiji su uzročnici *B. melitensis*, *B. abortus* i *B. suis*. Zbog činjenice da se visina titra protutijela za *B. ovis* u kratkom vremenu može promijeniti i bakteriološki pozitivne životinje postati serološki negativne potrebno je, uz više seroloških metoda, dijagnozu bolesti temeljiti i na kliničkom, patomorfološkom i patohistološkom nalazu, bakteriološkoj pretrazi i identifikaciji uzročnika molekularnim metodama. Našim istraživanjem *B. ovis* smo dokazali u ovnova i ovaca u dva područja (Virovitičko-podravskoj i Karlovačkoj županiji).

Na temelju dobivenih rezultata istraživanja odnosno identifikaciji vrsta brucela iz ljudi i domaćih životinja vid-

ljivo je da je bruceloza rasprostranjena u mnogim područjima u Republici Hrvatskoj. *Brucella melitensis* je najzastupljenija u ljudi te koza i ovaca u mediteranskom dijelu Hrvatske, *Brucella suis* se najčešće javlja u područjima uz rijeku Savu, a *Brucella ovis* u središnjim dijelovima Hrvatske. Bolest se najčešće širi nekontroliranim prometom životinja, a da prije nisu izvršene pretrage koje su propisane Zakonom te je suzbijanje bolesti, prilično otežano zbog nekontroliranog prometa stokom i zajedničkog držanja inficiranih i zdravih ovaca, koza i svinja. Na brucelozu uvijek treba posumnjati pri pojavi pobačaja i povećanog perinatalnog mortaliteta tek izleglih životinja. Često je prvi znak rasprostranjenosti bruceloze u životinja dokaz bolesti u ljudi, jer klinička slika bolesti u životinja prođe neapaženo. Kontrola bolesti je i dalje neophodna.

Zaključak

Našim istraživanjem smo dokazali nazočnost različitih vrsta *Brucella* sp. u domaćih i divljih životinja te ljudi u Republici Hrvatskoj. Ukupno smo izdvojili i identificirali 47 izolata podrijetlom iz ljudi (8 izolata), ovaca (11 izolata), koza (5 izolata), goveda (11 izolata), svinja (11 izolata) i zeca (1 izolat), a koji su pripadali različitim vrstama roda *Brucella*. Identificirali smo vrste *B. melitensis* (u ljudi i koza), *B. abortus* (u goveda), *B. suis* (u domaćih i divljih svinja te zeca) i *B. ovis* (u ovaca). Identifikacija različitih vrsta *Brucella* sp. mora se temeljiti na klasičnim i molekularnim metodama dijagnostike. Metodom lančane reakcije polimerazom s parovima početnica iz ovog rada može se potvrditi nazočnost bakterija roda *Brucella* i odrediti pojedina vrsta ovog roda, ali je nemoguće nedvojbeno razlučiti biovare pojedine vrste. S obzirom da smo isti biovar *Brucella melitensis* ustanovili u ljudi i koza te *Brucella suis* u domaćih i divljih svinja možemo sa sigurnošću reći da su koze bile izvor infekcije za ljude, a divlje svinje za domaće.

Literatura

- [1] Bardenstein S, Mandelboim M, Ficht TA, Baum M, Banai M. Identification of the *Brucella melitensis* vaccine strain rev. 1 in animals and humans in Israel by PCR analysis of the PstI site polymorphism of its omp2 gene. J Clin Microbiol 2002; 40 (4): 1475–80.
- [2] Cloeckaert A, Verger JM, Grayon M, Grepinet O. Restriction site polymorphism of the genes encoding the major 25 kDa and 36 kDa outer-membrane proteins of *Brucella*. Microbiol 1995; 141: 2111–21.
- [3] Jubier-Maurin V, Boigegrain R-A, Cloeckaert A, i sur. Major outer membrane protein Omp25 of *Brucella suis* is involved in inhibition of tumor necrosis factor alpha production during infection of human macrophages. Infect Immun 2001; 69 (8): 4823–30.
- [4] Moriyon I, Lopez-Goni I. Structure and properties of the outer membranes of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis*. Int Microbiol 1998; 1:19–26.

- [5] Paquet J-Y, Diaz M.A, Genevrois S, i sur. Molecular, antigenic, and functional analyses of Omp2b porin size variants of *Brucella* spp. J Bacteriol 2001; 183 (16): 4839–47.
- [6] Vizcaino N, Kittelberger R, Cloeckaert A, Marin CM, Fernandez-Lago L. Minor nucleotide substitutions in the omp31 gene of *Brucella ovis* result in antigenic differences in the major outer membrane protein that it encodes compared to those of the other *Brucella* species. Infect Immun 2001; 69 (11): 7020–8.
- [7] Vizcaino N, Verger JM, Grayon M, Zygmunt MS, Cloeckaert A. DNA polymorphism at the omp-31 locus of *Brucella* spp.: evidence for a large deletion in *Brucella abortus*, and other species-specific markers. Microbiol 1997; 143:2913–21.
- [8] Bricker BJ, Ewalt DR, Halling SM. *Brucella* »HOOF-Prints«: strain typing by multi-locus analysis of variable number tandem repeats (VNTR). BMC Microbiol 2003; 3 (1): 15.
- [9] DelVecchion VG, Kapatral V, Redkar RJ, I sur. The genome sequence of the facultative intracellular pathogen *Brucella melitensis*. PNAS 2002; 99 (1):443–48.
- [10] Gandara B, Merino AL, Rogel MA, Martinez-Romero E. Limited genetic diversity of *Brucella* spp. J Clin Microbiol 2001; 39 (1): 235–40.
- [11] Newby DT, Hadfield TL, Roberto FF. Real-time PCR detection of *Brucella abortus*: a comparative study of SYBR Green I, 5'-exonuclease, and hybridization probe assays. Appl Environ Microbiol 2003; 69 (8): 4753–59.
- [12] Paulsen IT, Seshadri R, Nelson KE, i sur. The *Brucella suis* genome reveals fundamental similarities between animal and plant pathogens and symbionts. Proc Natl Acad Sci USA 2002; 99:13148–53.
- [13] Sanchez DO. i sur. Gene discovery through genomic sequencing of *Brucella abortus*. Infect Immun 2001; 69 (2): 865–8.
- [14] Vizcaino N, Cloeckaert A, Zygmunt M, Fernandez-Lago L. Molecular characterization of a *Brucella* species large DNA fragment deleted in *Brucella abortus* strains: evidence for a locus involved in the synthesis of a polysaccharide. Infect Immun 1999; 67 (6): 2700–12.
- [15] Hunjak B, Turković B, Tunković Vraneša J. *Brucella*, *Francisella*, *Pasteurella*, *Yersinia*, *Streptobacillus*, *Spirillum* U: G Mlinarić-Galinović, M Ramljak-Šešo i suradnici. Specijalna medicinska mikrobiologija i parazitologija, Udžbenik Visoke zdravstvene škole, Zagreb, 2003: 89–102.
- [16] Alton GG, Jones LM, Angus RD, Verger JM. Techniques for the brucellosis laboratory, INRA – Paris 1988.
- [17] Corbel MJ, Gill KPW, Thomas EL. Methods for the identification of *Brucella*, Crown copywrite, England 1983.
- [18] Leal-Klevezas DS, Martinez-Vazquez IO, Lopez-Merino A, Martinez-Soriano JP. Single-step PCR for detection of *Brucella* spp. from blood and milk of infected animals. J Clin Microbiol 1995; 33 (12): 3087–90.
- [19] Serpe L, Gallo P, Fidanza N, Scaramuzza A, Fenizia D. Single-step method for rapid detection of *Brucella* spp. in soft cheese by gene-specific polymerase chain reaction. J Dairy Res 1999; 66: 313–7.
- [20] Bricker BJ, Halling SM. Differentiation of *Brucella abortus* bv. 1, 2, and 4, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis*, and *Brucella suis* bv. 1 by PCR. Journal of Clinical Microbiology 1994; 32 (11): 2660–66.
- [22] Cloackert A, Grayon M, Grepinet O. An IS711 element downstream of the bp26 gene is a specific marker of *Brucella* spp. isolated from marine mammals. Clin Diagn Lab Immunol 2000; 7 (5): 835–39.
- [22] Fališevac J. Infektivne bolesti. U: M Mimica i suradnici (ur.): Interna medicina u praksi. Školska knjiga, Zagreb, 1990: 105–7.
- [23] Karlović M. Melitokokoza u Istri (1947.–1961.): Različitosti podataka u objavljenim raspravama i neobjavljenim zapisnicima i izvještajima. Vet stanica 2001; 31 (1): 39–46.
- [24] Aleraj Z, Bastalić S, Rapić S. Melitokokoza u Istri. Acta hist med pharm vet 1968; 8: 45–8.
- [25] Cek A. Iz pismene ostavštine kolege Josipa Legca o brucelozi: Zbornik Stočarstvo i veterinarstvo Istre 1894.–1994. Veterinarska stanica d.o.o. Buje, Pazin 1995.
- [26] Jackson R, Pite L, Kennard R, i sur. Survey of the seroprevalence of brucellosis in ruminants in Kosovo. Vet Rec 2004; 154 (24): 747–51.
- [27] Cvetnić Ž. Bruceloza domaćih životinja. U: Ž. Cvetnić, M. Lojkić, Ž. Čač (ur.) Bruceloza, tuberkuloza i enzooska leukoza goveda, Hrvatski veterinarski institut, Zagreb, 2001: 1-36.
- [28] Cvetnić Ž, Mitak M, Ocepek M, i sur. Wild boars (*Sus scrofa*) as reservoirs of *Brucella suis* biovar 2 in Croatia. Acta Vet Hung 2003; 51 (4):465–73.
- [29] Kautzsch S, Seyfarth D, Schone R, Stehmann R. An outbreak of brucellosis in pigs and conclusions derived on the epidemiology of this animal disease. Berl Munch Tierarztl Wochenschr 1995; 108: 201–5.
- [30] Lord VR, Cherwonogrodzky JW, Marcano MJ, Melendez G. Serological and bacteriological study of swine brucellosis. J Clin Microbiol 1997; 35: 295–7.
- [31] Cvetnić S. Bakterijske i gljivične bolesti životinja. Medinska naklada, Zagreb 2002.
- [32] Marjanović S. Rasprostranjenost bruceloze konja u Republici Hrvatskoj. Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Biološki odsjek 2004. Diplomski rad.
- [33] Blasco JM. *Brucella ovis*. In: Animal Brucellosis, Nielsen K. & Duncan J.R., eds. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA 1990: 351–78.