

Универзитет у Београду
Факултет Ветеринарске медицине

ДВМ Младен Зеленовић

Серолошке и молекуларно-генетичке методе
доказивања присуства *Brucella ovis* код
природно инфицираних овнова и оваца и
анализа морфолошких промена у тестисима
и епидидимисима

Докторска дисертација

Београд, 2024

University of Belgrade
Faculty of veterinary medicine

DVM Mladen Zelenović

Serological and molecular-genetic methods of
proving the presence of *Brucella ovis* in
naturally infected rams and sheep and analysis
of morphological changes in the testes and
epididymis

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2024

МЕНТОР 1:

Др Соња Радојичић, редовни професор

Факултет ветеринарске медицине Универзитета у Београду

МЕНТОР 2:

Др Дарко Маринковић, редовни професор

Факултет ветеринарске медицине Универзитета у Београду

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ:

Др Наташа Стевић, доцент

Факултет ветеринарске медицине Универзитета у Београду

Др Весна Милићевић, виши научни сарадник

Научни институт за ветеринарство Србије, Београд

Др Славољуб Станојевић, научни сарадник

Дирекција за националне референтне лабораторије, Земун

Датум одбране: _____

Докторска дисертација под називом „Серолошке и молекуларно-генетичке методе доказивања присуства Brucella ovis код природно инфицираних овнова и оваца и анализа морфолошких промјена у тестисима и епидидимисима” подржана је од стране Министарства науке, технолошког развоја и иновација Републике Србије (уговор бр. 451-03-47/2023-01/200143).

Највећу захвалност за израду ове дисертације дугујем свом првом ментору проф. др Соњи Радојичић. Наравно да сам од своје менторке имао сву неопходну помоћ и подршку у току цијелог овог процеса, али чињеница да ме је професорка позвала у тренутку када сам практично дигао руке од завршетка докторских студија нешто је што никада нећу заборавити нити ћу јој се моћи одужити.

Велику захвалност дугујем и свом другом ментору проф. др Дарку Маринковићу који ми је несебично помогао око писања дијела дисертације везаног за патолошку морфологију. Хвала на уложеном труду и издвојеном времену.

Велику захвалност дугујем колегиници доценту др Наташи Стевић на конструктивним и добронамјерним сугестијама и помоћи у лабораторијском раду.

Велико хвала колеги др Славољубу Станојевићу, начелнику Лабораторије за безбедност хране и испитивање млека на помоћи око извођења и интерпретације статистичких анализа. Његови савјети, идеје и сугестије биле су ми од изузетне помоћи.

Захваљујем се др Весни Милићевић из Научног Института за Ветеринарство Србије на огромној помоћи око извођења и интерпретације резултата молекуларних испитивања.

Захваљујем се колегиници Тамари Радовановић, истраживачу приправнику са Катедре за заразне болести животиња и болести пчела на Факултету ветеринарске медицине на несебичној помоћи у лабораторијском раду.

Хвала мојим родитељима на великој подршци током цијелог мог школовања.

Хвала мојој супрузи и синовима који су остали ускраћени за моју пажњу за вријеме израде ове дисертације. Били су ми велики мотив да изгурам до краја.

СЕРОЛОШКЕ И МОЛЕКУЛАРНО-ГЕНЕТИЧКЕ МЕТОДЕ ДОКАЗИВАЊА ПРИСУСТВА *BRUCELLA OVIS* КОД ПРИРОДНО ИНФИЦИРАНИХ ОВНОВА И ОВАЦА И АНАЛИЗА МОРФОЛОШКИХ ПРОМЈЕНА У ТЕСТИСИМА И ЕПИДИДИМИСИМА

Резиме

Овце се инфицирају *Brucella ovis* при чему се развија клиничка или субклиничка болест коју карактеришу гениталне лезије и смањена плодност код овнова, плацентитис и абортус код оваца и повећан перинатални морталитет код јагњади. Поред оваца пријемчиве су и козе када се држе у кохабитацији са овцама, затим европски јелен (*Cervus elaphus*), бјелорепи јелен (*Odocoileus virginianus*) и амерички муфлон (*Ovis canadensis*). У овом раду спроведено је истраживање на једној фарми оваца у околини Београда (Србија). Фарма је некомерцијалног типа са несразмјерно великим бројем овнова у односу на овце. Добри параметри репродукције на овој фарми нису били императив те је из тог разлога болест пролазила незапажено дужи временски преиод.

Од серолошких тестова рађена је индиректна *ELISA* и укупно су тестирана 94 крвна серума, 33 од мушких и 61 од женских животиња. Добијена су 23 (69,7%) позитивна резултата код овнова и 2 (3,3%) позитивна резултата код оваца са укупном преваленцијом од 25,4% са интервалом поузданости од 95 %. Начин држања животиња на фарми на којој је спроведено истраживање указује на изузетну важност контаката између овнова у преношењу и одржавању обољења.

Код 19 серолошки позитивних овнова је након извршеног клиничког прегледа и увођења у општу анестезију извршена орхидектомија. Након анализе макроскопских промјена на тестисима и епидидимисима узети су узорци ткива тестиса и епидидимиса за молекуларно и хистопатолошко испитивање. Код 19 серолошки позитивних овнова и двије серолошки позитивне овце рађени су Bruce-ladder multiplex PCR и Real time PCR. Као испитујући материјал код овнова коришћени су по два збирна узорка ткива тестиса и епидидимиса, пуна крв и препуцијални брис док су од оваца узорковани крв и вагинални брис. За екстракцију генетског материјала *B. ovis* коришћена су два комерцијална кита. У зависности од коришћеног кита за екстракцију од укупно 38 узорака ткива тестиса и епидидимиса Bruce-ladder multiplex PCR је имао шест (15,79%) односно четири (10,53%) позитивна резултата док је на Real time PCR-у било 11 (28,95%) односно 10 (26,32%) позитивних резултата. Пуна крв и препуцијални/вагинални брис нису имали позитивних резултата ни на једном PCR протоколу.

Резултати молекуларних истраживања указују на нешто већу осјетљивост Real time PCR у односу на класични PCR у дијагностици *B. ovis* из репродуктивног ткива овнова. Разлике у осјетљивости различитих екстракционих протокола нису биле значајне са нешто лошијим степеном сагласности код Real time PCR тестова што могуће указује на потребу

дефинисања ефикаснијих протокола екстракције нуклеинске киселине. Разлике у резултатима класичне PCR методе и Real time PCR методе могу бити последица различитих амплификационих протокола који су коришћени, различитих принципа амплификације, детекције умножене ДНК и коришћених реагенаса. Највећи број овнова је имао позитиван PCR резултат код само једног збирног узорка репродуктивног ткива па би препорука била да се од сваке животиња узима неколико узорака.

Клиничким прегледом серолошки позитивних овнова палпацијом је утврђено унилатерално увећање репа епидидимиса код 63,16% (12/19) овнова, код 31,58% (6/19) увећање главе епидидимиса, док је болност констатована у 21,05% (4/19) случајева, а тестиси и епидидимиси су били покретни у скротуму код 57,89% (11/19) овнова, док је чвршћа конзистенција тестиса и епидидимиса констатована код 47,37% (9/19) овнова. Макроскопским прегледом на глави епидидимиса спермоциста је уочена код 5,26% (1/19) овнова, некротичне промјене запажене су код 15,79% (3/19), хипертрофија главе и репа епидидимиса код 31,58% (6/19) овнова, док је фиброза епидидимиса макроскопски била изражена код 15,79% (3/19) овнова. Фиброза тестиса макроскопски је запажена код 36,84% (7/19) овнова, калцификација код 15,79% (3/19), а атрофија код 21,05% (4/19) овнова. Хистопатолошке промјене су у мањем или већем обиму утврђене код свих испитиваних овнова (19/19). Укупно је код тестиса праћено пет хистопатолошких параметара: дегенерација, фиброза, минерализација/калцификација, присуство сперме и хиперемиија. Код епидидимиса је праћено осам параметара: инфилтрација ћелијама запаљења, дегенерација и вакуолизација епитела, инфламаторне ћелије у епителу, дилатација каналића, хиперемиија, едем интерстицијума, фиброза и присуство сперме. Ради лакше статистичке обраде хистопатолошки параметри приказивани су у облику ординалних категоричких варијабли са нумеричким вриједностима у распону од 0 до 4.

Анализом хистопатолошких промјена утврђено је да у тестисима овнова инфицираних *B. ovis* доминирају дегенеративне промјене праћене накнадном фиброзом, док су у епидидимисима присутне инфламаторне и дегенеративне промјене. Кластер анализа за хистопатолошке промјене на тестисима показала је одсуство формирања значајних образаца. Код кластер анализе промјена на епидидимисима дошло је до формирања два кластера при чему би критеријум раздвајања могао бити дужина трајања патолошког процеса. Макроскопске промјене на репродуктивним органима су у 63,1% случајева унилатералне. Хистопатолошке промјене су билатералне у 100% случајева, али постоји статистички значајна разлика у њиховом интензитету између парних репродуктивних органа овнова. Резултати статистичке анализе нису показали било какву повезаност интензитета хистопатолошких промјена у тестисима и епидидимисима са старошћу овна и резултатима молекуларних испитивања.

Кључне ријечи: *Brucella ovis*, ЕЛИСА, PCR, патоморфолошке промјене

Научна област: Ветеринарска медицина

Ужа научна област: Епизоотиологија, заразне болести животиња и болести пчела,
Патолошка морфологија

SEROLOGICAL AND MOLECULAR-GENETIC METHODS OF PROVING THE PRESENCE OF BRUCELLA OVIS IN NATURALLY INFECTED RAMS AND SHEEP AND ANALYSIS OF MORPHOLOGICAL CHANGES IN THE TESTES AND EPIDIDYMIS

Summary

Sheep become infected with *Brucella ovis* developing clinical or subclinical disease characterized by genital lesions and reduced fertility in rams, placentitis and abortion in ewes, and increased perinatal mortality in lambs. In addition to sheep, goats are also susceptible when kept in cohabitation with sheep, then European deer (*Cervus elaphus*), white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) and American mouflon (*Ovis canadensis*). In this paper, research was conducted on a sheep farm in the vicinity of Belgrade (Serbia). The farm is of a non-commercial type with a disproportionately large number of rams compared to sheep. Good parameters of reproduction on this farm were not imperative, and for that reason the disease went unnoticed for a long period of time.

Of the serological tests, indirect ELISA was performed and a total of 94 blood sera were tested, 33 from male and 61 from female animals. 23 (69.7%) positive results were obtained in rams and 2 (3.3%) positive results in sheep with a total prevalence of 25.4% bounded by a 95% confidence interval. The way animals are kept on the farm where the research was conducted points to the exceptional importance of ram-to-ram contacts in the transmission and maintenance of the disease.

In the case of 19 serologically positive rams, orchidectomy was performed after a clinical examination and induction into general anesthesia. After the analysis of macroscopic changes in the testicles and epididymis, tissue samples of the testicles and epididymis were taken for molecular and histopathological examination. Bruce-ladder multiplex PCR and Real time PCR were performed on 19 serologically positive rams and two serologically positive sheep. Two collective tissue samples of the testis and epididymis, whole blood and prepuce swab were used as test material in rams, while blood and vaginal swab were sampled from sheep. Two commercial kits were used for the extraction of genetic material of *B. ovis*. Depending on the kit used for the extraction of a total of 38 testis and epididymis tissue samples, Bruce-ladder multiplex PCR had six (15.79%) and four (10.53%) positive results, while Real time PCR had 11 (28.95%) and 10 (26.32%) positive results. Whole blood and preputial/vaginal swabs did not have positive results on any PCR protocol.

The results of molecular research indicate a slightly higher sensitivity of Real time PCR compared to classical PCR in the diagnosis of *B. ovis* from the reproductive tissue of rams. The differences in sensitivity between different extraction protocols were not significant with a slightly worse degree of agreement in Real time PCR tests, which possibly indicates the need to

define more efficient nucleic acid extraction protocols. The largest number of rams had a positive PCR result in only one collective sample of reproductive tissue, so it would be recommended to take several samples from each animal.

Clinical examination of serologically positive rams by palpation revealed unilateral enlargement of the tail of the epididymis in 63.16% (12/19) rams, enlargement of the head of the epididymis in 31.58% (6/19), while pain was noted in 21.05% (4/19) of cases, and the testicles and epididymis were mobile in the scrotum in 57.89% (11/19) of rams, while a firmer consistency of testicles and epididymis was noted in 47.37% (9/19) of rams. Macroscopic examination of the head of the epididymis revealed spermocysts in 5.26% (1/19) of rams, necrotic changes were observed in 15.79% (3/19), hypertrophy of the head and tail of the epididymis in 31.58% (6/19) of rams, while fibrosis of the epididymis macroscopically was expressed in 15.79% (3/19) of rams. Testicular fibrosis was macroscopically observed in 36.84% (7/19) rams, calcification in 15.79% (3/19), and atrophy in 21.05% (4/19) rams. Histopathological changes to a lesser or greater extent were found in all the tested rams (19/19). In total, five histopathological parameters were monitored in the testicles: degeneration, fibrosis, mineralization/calcification, presence of sperm and hyperemia. Eight parameters were monitored in the epididymides: infiltration by inflammatory cells, degeneration and vacuolization of the epithelium, inflammatory cells in the epithelium, ductal dilatation, hyperemia, interstitial edema, fibrosis and the presence of sperm. For easier statistical processing, histopathological parameters were presented in the form of ordinal categorical variables with numerical values ranging from 0 to 4.

Analysis of histopathological findings revealed that in the testicles of rams infected with *B. ovis*, degenerative changes predominate followed by subsequent fibrosis, while inflammatory and degenerative changes are present in the epididymis. Cluster analysis for histopathological changes in the testes showed the absence of formation of significant patterns. In the cluster analysis of changes in the epididymis, two clusters were formed, where the criterion for separation could be the duration of the pathological process. Macroscopic changes on the reproductive organs are unilateral in 63.1% of cases. Histopathological changes are bilateral in 100% of cases, but there is a statistically significant difference in their intensity between paired reproductive organs of rams. The results of the statistical analysis did not show any correlation between the intensity of histopathological changes in the testicles and epididymis with the age of the ram and the results of the molecular tests.

Key words: *Brucella ovis*, ELISA, PCR, pathomorphological changes

Major Field of Study: Veterinary medicine

Special Field of Study: Epizootiology, infectious diseases of animals and honey bee diseases, Pathological morphology

САДРЖАЈ

1. УВОД	1
2. ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ	3
2.1. Историјат.....	3
2.2. Етиологија.....	3
2.3. Морфологија и културелне карактеристике <i>B. ovis</i>	4
2.4. Раширеност	5
2.5. Остали узрочници епидидимитиса овнова	6
2.6. Економски значај бруцелозе оваца.....	7
2.7. Епизоотиологија.....	7
2.8. Патогенеза.....	10
2.9. Клиничка слика	12
2.10. Патоморфолошке промјене	13
2.10.1. Патоморфолошке промјене код оваца.....	15
2.10.2. Патоморфолошке промјене на плаценти и фетусима	15
2.11. Дијагностика.....	16
2.12. Третман	22
2.13. Превенција	22
3. ЦИЉ И ЗАДАЦИ ИСПИТИВАЊА	27
4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ.....	28
4.1. Испитивани материјал	28
4.2. Клинички преглед	28
4.3. Орхидектомија.....	28
4.5. Молекуларно-генетичка испитивања	30
4.5.1. Екстракција ДНК <i>B. ovis</i> из репродуктивних органа и крви оваца QIAamp Cadon Pathogen mini китом.....	30
4.5.2. Екстракција ДНК <i>B. ovis</i> из репродуктивних органа и крви оваца GeneJET Genomic DNA Purification китом.....	31

4.5.3. Bruce-ladder multiplex PCR	33
4.5.4. Real-time PCR.....	35
4.6. Израда хистопатолошких препарата	35
4.7. Статистичка обрада резултата	35
5. РЕЗУЛТАТИ.....	37
5.1. <i>ELISA</i>	37
5.2. Резултати добијени примјеном Bruce-ladder multiplex PCR методе	40
5.2.1. Резултати добијени након екстракције ДНК QIAamp Cadon Pathogen mini китом	40
5.2.2. Резултати добијени након екстракције ДНК Thermo GeneJET Genomic DNA Purification китом.....	40
5.3. Резултати добијени примјеном Real time PCR методе	41
5.3.1. Резултати добијени након екстракције ДНК QIAamp Cadon Pathogen mini китом	41
5.3.2. Резултати добијени након екстракције ДНК GeneJET Genomic DNA Purification китом.....	41
5.4. Упоредни резултати Bruce-ladder multiplex PCR и Real time PCR метода са различитим екстракционим протоколима	42
5.5. Упоредни резултати добијени QIAamp Cadon Pathogen mini и GeneJET Genomic DNA Purification протоколима екстракције различитим PCR методама	45
5.6. Резултати клиничких испитивања	47
5.7. Резултати макроскопских испитивања	47
5.8. Резултати хистопатолошких испитивања	52
5.9. Резултати статистичке обраде хистопатолошких података	62
5.10. Кластер анализа	64
5.11. Регресиона анализа повезаности старости овна и интензитета хистопатолошких промјена	67
5.12. Повезаност хистопатолошких промјена и PCR резултата	68
5.13. Упоредна анализа интензитета промјена на парним органима	68
5.14. Упоредна анализа интензитета промјена на тестисима и епидидимисима	70
5.14.1. Фиброза.....	70
5.14.2. Дегенерација	71
6. ДИСКУСИЈА.....	73

7. ЗАКЉУЧЦИ	87
8. ЛИТЕРАТУРА.....	89

1. УВОД

Brucella ovis (*B. ovis*), члан породице *Brucellaceae*, је грам негативна бактерија са природно храпавим (P) типом липополисахарида (ЛПС) ћелијског зида, која је узрочник обољења познатог као епидидимитис овнова. *B. ovis* је бактерија која код овнова изазива хроничну болест праћену промјенама у тестисима и епидидимисима, док се код оваца главне промјене налазе на постелици. Бруцелоза оваца је болест која, уколико се не ради на њеном сузбијању, изазива значајне економске штете. Штете настају због смањене фертилности овнова, побачаја и рађања слабих, авиталних јагањаца, због искључивања животиња из приплода и забране трговине за фарму на којој је болест присутна. У свијету се *B. ovis* сматра најзначајнијим патогеном који изазива репродуктивне проблеме код оваца. У земљама које немају развијен систем праћења болести проценат инфицираних стада је чак и до 75%. У земљама са развијеним мониторингом тај проценат знатно је нижи али је ерадикација обољења доста тешка. Контрола обољења се углавном своди на серолошко тестирање, кастрацију и економско искоришћавање инфицираних јединки.

Поред оваца, *B. ovis* може природно да инфицира и европског јелена (*Cervus elaphus*) који се у неким дјеловима свијета гаји у фармским условима. Такође, доказана је и могућност инфицирања коза ако се држе у кохабитацији са овцама. Експериментално могу да се инфицирају овце, говеда и неке врсте дивљих животиња као што су амерички муфлон (*Ovis canadensis*) и бјелорепи јелен (*Odocoileus virginianus*). Бруцелоза оваца није зооноза. Без обзира на то, бруцелоза оваца изазвана овом врстом, има све већи значај у овчарству, имајући у виду велике економске штете које наноси. Уз то, овце су поред коза, природни домаћини за изразито патогену врсту *Brucella melitensis*, која изазива тешко обољење људи. *Brucella melitensis* поседује такозвани глатки (С) тип ЛПС-а, али су код ове врсте забележене и фазне варијације, иреверзибилне (прелазак С у Р форму). Имајући то у виду, веома је значајно искључити могућност мјешовитих инфекција или грешака у дијагностици.

Бруцелоза оваца је болест превасходно овнова, док овце обично носе узрочника један до два естрална циклуса. Овце најчешће служе као механички преносиоци болести на овнове. Код gravidних оваца *B. ovis* изазива запаљење плаценте које може да доведе до побачаја или рађања авиталне јагњади. Побачај се по правилу дешава само једном након чега код оваца долази до спонтаног оздрављења. У експерименталним студијама, проценат побачаја и перинаталног морталитета варира између 0% и 8%. Такође је значајно напоменути да су јагњад рођена после побачаја у другом или трећем gravidитету 5-10 kg лакша на засушењу у односу на просјек расе.

У Србији забиљежене су спорадичне инфекције врстама бруцела за које су природни домаћини овце. Док се у серолошкој дијагностици класичне бруцелозе коју изазива *B. melitensis*, користи више различитих метода, почевши од брзог аглутинационог теста-Росе Бенгал (РБТ), различитих варијанти имуноензимских тестова (индиректна и компетитивна *ELISA*), реакција везивања комплемента (РВК) и флуоресцентна поларизација, у дијагностици бруцелозе изазване врстом *B. ovis*, могућности су скромније и углавном се користе комерцијална индиректна *ELISA*, РВК са специфичним, Р-ЛПС антигеном, а некада и агар гел имунодифузиони метод (АГИД). Изолација бактерија као рутинска дијагностичка метода због ниске осјетљивости се не примењује увјек, имајући у виду да је већина сојева *B. ovis* зависна од присуства угљен диоксида у атмосфери (5–10% CO₂) и честе, високе контаминације материјала. Током периода инкубације, дешава се да гљивице и друге бактерије прерасту постојеће бруцеле. У пракси, узорци за изолацију су најчешће високо контаминирани, што ову методу чини компликованом за рутинску дијагностику. Из тог разлога увођење и испитивање молекуларних техника у дијагностици ове болести представља значајан циљ. Са друге стране, мало је публикованих радова који дају податке о макроскопским и хистопатолошким испитивањима промјена у захваћеним органима, њиховом интензитету и упоредним анализама оваквих налаза са резултатима серолошких и молекуларних испитивања. Када говоримо о инфекцијама изазваним врстом *B. ovis*, можемо рећи да је болест присутна у већини земаља у којима се гаје овце, укључујући већину америчких и европских земаља (укључујући и Србију), као и Аустралију, Нови Зеланд и Африку.

2. ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ

2.1. Историјат

Болест изазвана бактеријом *B. ovis* први пут је описана у Аустралији и Новом Зеланду 1953. године (Buddle и Boyes, 1953; Simmons и Hall, 1953), док је неколико година касније откривена у Сједињеним америчким државама (САД) (McGovan и сар. 1956), Јужној Африци (Van Rensburg и сар., 1958), Европи (Gdovin и сар., 1955). Касније је болест потврђена у скоро свим земљама са развијеним овчарством.

Интерес за проблем побачаја код оваца и неонаталне смртности јагањаца на Новом Зеланду је интензивирао након описа специфичних промјена на феталним мембранама јагањаца чији је узрочник тада описан као дио „пситакозно-лимфогрануломатозне групе“ (Stamp и сар., 1950). McFarlane и сарадници су 1952. године, такође на Новом Зеланду описали слично обољење, а узрочника су назвали „рикецијама сличан микроорганизам“. Иста група аутора је нешто касније проучавала морфолошки идентичну бактерију коју су открили у тестисима, епидидимисима, акцесорним полним жлијездама и илијачним лимфним чворовима овнова са палпабилним промјенама на епидидимисима. Simmons и Hall су 1953. године такође изоловали сличан микроорганизам код епидидимитиса овнова у Аустралији и први су употребили термин “бруцела сличан микроорганизам”. Исте године су Buddle и Boyes вршили даљу карактеризацију овог новозеландског изолата и посумњали су да би то могао бити мутант *Brucella melitensis*. Коначно је Buddle 1956. године назвао нову бактерију *Brucella ovis* (Buddle, 1956).

2.2. Етиологија

Роду *Brucella* припадају грам негативне бактерије које су на основу осјетљивости према пептиду трифолитоксину класификоване у групу α -2 протеобактерија. Поред овог рода фамилија *Brucellaceae* обухвата још родове *Mycoplana* и *Ochrobactrum* (Moreno и сар., 1990). Врсте из рода бруцела изазивају бруцелозу, значајну зоонозу која доводи до великих економских штета, као и обољевања људи у многим земљама, нарочито оним у развоју (McDermott и сар., 2013). Тренутно род обухвата дванаест врста, а подјела је углавном извршена на основу афинитета према одређеном домаћину. Шест врста бруцела, прије називаних класичним, јесу *Brucella abortus*, која доминантно инфицира говеда, *B. melitensis* која обично инфицира овце и козе *B. suis* која инфицира свиње, зечеве, сјеверне јелене и неке врсте дивљих глодара, *Brucella canis* пронађена код паса, *B. neotomae* изолована из пустињских пацова и *B. ovis* која код оваца изазива обољење познато као епидидимитис овнова. Недавно су из морских сисара, волухарица и других дивљих кичмењака изоловане нове врсте бруцела које обухватају *B. ceti* која инфицира китове (подред *Cetacea*), *B. pinipedialis* која инфицира фоке (фам. *Phocidae*), *B. microti* која

инфицира волухарице (*Microtus arvalis*), (Scholch и сар., 2008), *B. inopinata* изолована из инфицираних имплантата дојки жена (Scholz и сар., 2009), *B. rapionis* изолована из бабуна (Whatmore и сар., 2014) и *B. vulpis* која је изолована из мандибуларних лимфних чворова црвене лисице (*Vulpes vulpes*) (Scholz и сар., 2016).

Не постоји консензус који би дефинисао род бактерија на молекуларном нивоу, па се он дефинише на основу фенотипских карактеристика (Young, 2001). Конвенционална идентификација класичних врста бруцела и њихових биоваријетета традиционално се ослања на осјетљивост према одређеним бојама, фаготипизацију, продукцију H₂S, активност уреазе, неопходност присуства 5-10% CO₂ у атмосфери (у нормалном ваздуху је 0,04%) и површинске антигене (Alton и сар., 1988). Са напретком дијагностичких могућности ове тестове су све више потиснули молекуларни тестови. Ипак, антигенска структура и CO₂-зависност су задржали практичну употребну вриједност јер директно утичу на услове примарне изолације и размножавања *in vitro*, као и на имплементацију других дијагностичких тестова. Антигенски класичне врсте бруцела се дијеле у двије групе: грубе Р-врсте (*B. canis* и *B. ovis*), које носе Р-тип липополисахарида (Р-ЛПС) (*енг.* Rough - груб) и глатке (С) бруцеле које носе С-ЛПС (*енг.* Smooth - гладак) у које спадају *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis* и *B. neotomae* (ВОАН, 2018). Све класичне врсте бруцела су факултативно интрацелуларни паразити способни да избјегну рани проинфламаторни одговор и активирају IV тип преосјетљивости у циљу интрацелуларне елиминације (Gorvel и Monero, 2002; Barquero и сар., 2007).

У природи бруцеле су патогени који се не умножавају у окружењу, карактеристично круже између домаћина и барем колико је за сада познато увјек су у моменту који претходи дисеминацији, локализоване интрацелуларно. Бруцеле припадају групи алфа протеобактерија и филогенетски су блиске са биљним патогенима и симбионтима као што су *Rhizobium* и *Agrobacterium*, затим са животињским патогенима као што су *Ochrobactrum* и *Caulobacter* (De Ley и сар., 1987; Velasco и сар., 1998).

2.3. Морфологија и културелне карактеристике *B. ovis*

B. ovis је мали кокоидни штапић величине 0.5-0.7 x 0.6-1.5 μm, обично постављен појединачно или ређе у кратким ланцима. Не ствара споре и капсуле, није покретна и не показује знаке биполарног бојења. Оптимални услови за њен раст су при температури од 37 °C а са повишеним парцијалном притиском CO₂ од 8-10%, уз додатак крви или серума (Radostits и сар., 2007). Захтјеван је микроорганизам и за његов раст је неопходно присуство аминокиселина, никотин амида, тиамина и магнезијумових јона. Не расте испод температуре од 26 °C. Не посједује класичне факторе вируленције као што су егзотоксини, егзоензими, цитолизини, фимбрије, флагеле, капсулу или индукторе апоптозе (Olsen и сар., 2004).

На чврстим хранљивим подлогама пет дана старе колоније су пречника до 2 mm, сиве, округле, испупчене, глатке и сјајне. Раст је спор уколико се подлога не обогати са додатком крви или серума (Manterola и сар., 2003). Не изазива хемолизу говеђе, овчије и коњске крви. Раст *B. ovis* инхибира метил виолет у разређењу 1/100 000, али не инхибирају тионин и базни фуксин у разређењима 1/25000.

У разређењу акрифлавина 1/1000 као и физиолошком раствору на температурама од 37 °C и 56 °C долази до аутоаглутинације *B. ovis* (Buddle и Boyes, 1953; Lawrence, 1961; Brinley-Morgan и McCullough, 1974).

Као и остале врсте из фамилије *Brucellaceae*, *B. ovis* је осјетљива на већину уобичајених дезинфекционих средстава, укључујући хипохлорите, 70% етанол, изопропанол, јодофоре, феноле, формалдехид, глутаралдехид и ксилен. Раствор 1% лимунске киселине је мање ефикасан. Бруцеле се веома брзо инактивишу кад је рН мањи од 3,5. Такође их за 15 минута уништава влажна топлота на 121 °C, сува топлота од 160-170 °C за један сат, гама зрачење и пастеризација. Кување (100 °C) у трајању од 10 минута је обично ефикасно за течности (Blasco и сар., 1990; Rovid, 2018).

2.4. Раширеност

B. ovis је присутна скоро у свим земљама са развијеном овчарском производњом: Аустралији (Hopkinson и сар., 1979), Новом Зеланду (Sergeant, 1994), САД-у (Bagley и сар., 1985), Канади (Arsenault и сар., 2004), Русији (Kalinovski и сар., 1995), Украјини (Denes и сар., 1994), Аустрији (Schoph и сар., 1997), Швајцарској (Hold и сар., 1995), Италији (Farina и сар., 1995), Румунији (Dobran и сар., 2002), Словенији (Krt, 1992), Хрватској (Špičić и сар., 2009).

На територији Србије болест је први пут серолошки потврђена у Војводини 2009. године (Grgić и сар., 2009), док је *B. ovis* први пут изолована у околини Пирота 2014. године (Petrović и сар., 2014). У овом истрживању тестирано је укупно 225 овнова који су потицали из 113 стада са укупно 4751 грла. Употребом индиректног *ELISA* теста позитиван резултат је установљен код 67 (29,8%) узорака док је сумњивих било 31 (13,8%). Као потврдни тест коришћена је реакција везивања комплемента и од 67 *ELISA* позитивних серума било је позитивних 41 (61,2%). Клинички преглед адспекцијом и палпацијом тестиса и епидидимиса урађен је код 12 овнова из 7 серопозитивних стада. Прегледом је установљена асиметрија скротума и једнострано увећање репа епидидимиса код 5 (47,1%) овнова. Патоморфолошким прегледом тестиса и епидидимиса утврђене су промјене код 7 (58,3%) од 12 овнова. Такође је утврђено присуство једностраног епидидимитиса са израженим увећањем пасјеменика. Бактериолошки преглед је био позитиван код 11 (91,7%) од 12 тестираних овнова. Добијено је укупно 20 изолата и сви су потврђени као *B. ovis* молекуларним методама.

2.5. Остали узрочници епидидимитиса овнова

Поред *B. ovis* и многи други микроорганизми могу бити изоловани код случајева епидидимитиса приплодних овнова. *Histophilus ovis*, грам негативна плеоморфна бактерија изолована је код неколико случајева епидидимитиса на Новом Зеланду (Buddle, 1955). Иако су постојали спорадични случајеви епидидимитиса повезаног са *H. ovis* и у другим дијеловима свијета ипак су они доминантно везани за Аустралију и Нови Зеланд (Al-Katib и Dennis, 2009). *Haemophilus agni* је изолован у Индији код случајева гнојног орхитиса овнова (Zeki и сар, 1981), а нешто касније *Haemophilus somnus* код случаја епидидимитиса у америчким савезним државама Ајдахо и Орегон (Bruss и сар., 1981; Bulgin и Anderson, 1983). Касније је доказана велика морфолошка, биохемијска и серолошка сличност између *Histophilus ovis*, *Haemophilus agni* и *Haemophilus somnus* па су се они од стране великог броја микробиолога сматрали једним микроорганизмом (Walker и сар., 1983; Webb, 1983; McGillivray и сар., 1986),.

Actinobacillus seminis је још једна плеоморфна грам негативна штапићаста бактерија повезана са појавом епидидимитиса овнова. Први пут је изолована у Аустралији (Dodd и Hartley 1955), а нешто касније и у САД-у (Livingston и Hardy, 1961) и Јужној Африци (Worthington и Bosman, 1968), Шпанији (De la Puente-Redondo и сар., 2000). *Actinobacillus actinomycetmecomitans*, друга бактерија из рода *Actinobacillus* изолована је у САД-у из тестиса обољелих овнова (De Long и сар., 1979).

Запажено је да постоји значајна повезаност између бактерије изоловане из лезија полних органа, старости и претходног присуства овна у приплоду (Bulgin и Anderson, 1983). *Brucella ovis* се уобичајено изолује из лезија у епидидимисима одраслих овнова у приплоду и скоро се никад не налази код јагњади и младих овнова који нису у приплоду (Bulgin и Anderson, 1983). Са друге стране, *Histophilus* и *Actinobacillus* врсте се обично изолују из лезија код младих овнова који нису у приплоду и јагњади, а изузетно ријетко код приплодних овнова. Патоморфолошке промјене код сва три узрочника: инфламација, едем, индурација и формирање ожиљног ткива у пасјеменицима су у већини случајева неразлучиве, с тим да код инфекције *B. ovis* у односу на остале бактерије ређе долази до појаве апсцеса у епидидимисима (Bulgin, 1990). Иако се *B. ovis* сматра најзначајнијим етиолошким узрочником контагиозног епидидимитиса, неке студије показују да су *A. seminis* и неки други микроорганизми итекако значајни. У студији у Јужној Африци која је обухватала 409 фарми из 29 дистриката (Van Tonder, 1979) показало се да 7,3% овнова има комплемент везујућа антитјела против *B. ovis*, а чак 15,7% је било позитивно на *A. seminis*. Велики број других микроорганизама је изолован код случајева епидидимитиса овнова: *Trueperella pyogenes* (Tzora и сар., 2002; Jost и Bilington, 2004), *Corynebacterium pseudotuberculosis* (Simmons и Hall 1953; Galloway, 1966; Ekdahl и сар, 1968), (Ivanov и Masalski, 1974; Zamora и сар, 1977; De Long и сар., 1979), *Staphylococcus spp* (Ekdahl и сар.,

1968), *Staphylococcus spp* (Ekdahl и сар., 1968; Zamora и сар., 1977; De Long и сар., 1979), *Manheimia haemolytica* (Ekdahl и сар., 1968; Garcia-Pastor и сар., 2009), *Pasteurella multocida* (Ekdahl и сар., 1968; Garcia-Pastor и сар., 2009), *Brucella abortus S19* (Ekdahl и сар., 1968), *Pseudomonas maltophilia* (De Long и сар., 1979), *Actinobacillus actinomycetmecomitans* (De long и сар., 1979), *Actinobacillus lignieresii* (Laws и Elder, 1969), *Yersinia pseudotuberculosis* (Ekdahl и сар., 1968; Zamora и сар., 1977), *Histophilus ovis* (Dodd и Hartley, 1955; Ekdahl и сар., 1968), *Biberstenia trehalosi* (Garcia-Pastor и сар., 2009), *Salmonella enterica subsp. diarizonae* (Celeghini и сар., 2013), *Brucella melitensis* биотип 3 (Buyukcangaz и сар., 2013).

2.6. Економски значај бруцелозе оваца

Бруцелоза оваца изазвана врстом *B. ovis* доводи до значајних економских губитака који се огледају како у смањењу репродуктивних параметара у инфицираном стаду, тако и у индиректним губицима насталим због забрана трговине (Blasco и сар., 1990). Најзначајнији финансијски губици настају због смањења фертилитета, те честим повађањем код инфицираних оваца. Степен репродуктивног успјеха зависи превасходно од интензитета патолошких промјена код инфицираних овнова. Наиме, ако су код неког овна патолошке промјене присутне само на једном тестису концепција оваца парених са тим овном може да буде и до 70%, док се код здравих овнова нормално очекује концепција од око 90 %. У експерименталним студијама проценат побачаја и перинаталног морталитета варира између 0% и 8%. Такође је значајно напоменути да су јагњад рођена после побачаја у другом или трећем циклусу 5-10 kg лакша на одбијању у односу на просјек. Инфекција *B. ovis* доводи и до индиректних губитака због скраћења репродуктивног живота инфицираних јединки, смањења економске вриједности овнова као и због повећања броја овнова потребних за оплодњу оваца у стаду (Burgess, 1982).

2.7. Епизоотиологија

Експериментална инфекција овнова врстом *B. ovis* може да се постигне интратестикуларном (Buddle и Boyes, 1953; Simmons и Hall, 1953; Jebson и сар., 1954) и интравенском инокулацијом бактерија (Buddle и Boyes, 1953; Jebson и сар., 1954). Администрација инфицираног сјемена или културе *B. ovis* на мукозне баријере се такође показала успјешном за пренос инфекције: пенис и препуцијум (Buddle и Boyes, 1953; Carvalho Junior и сар., 2012; Simmons и Hall, 1953; Jebson и сар., 1954; Laws и сар., 1972; Webb и сар., 1980), конјунктиве (Biberstein и сар., 1962, 1964; Brown и сар., 1973; Carvalho Junior и сар., 2012), носну и ректалну слузницу (Gorrie, 1957).

Овце су такође експериментално инфициране интравенском инокулацијом *B. ovis* (McFarlane и сар., 1952; Budlle и Boyes, 1953; Budlle, 1954; Hartley и сар., 1954; Molelo и сар., 1963; Hughes, 1972), затим конјунктивалном (McGovan и сар., 1961; Osburn и Kennedy,

1966) и инокулацијом на вагиналну слузницу (Muhammed и сар., 1975). Овакве вјештачке инфекције су резултирале спорадичним феталним угинућима од 40. дана гестације до термина јагњења, или рађањем мртве или авиталне јагњади која угине у року од 24 часа након порођаја.

Главни резервоари *B. ovis* јесу овнови, који често могу бити перзистентно инфицирани и могу излучивати бруцеле сјеменом од двије до четири године (Hartley и сар., 1955; Riddler и West, 2011). Излучивање може бити интермитентно и може, али и не мора бити праћено клиничким знацима. Овнови такође могу излучивати бруцеле урином. Најчешће се са једног на другог овна болест преноси преко оваца које служе као механички преносиоци и често се саме не инфицирају. Такве овце могу да носе *B. ovis* у вагини најмање два мјесеца. Бруцеле се такође могу преносити између овнова и са овнова на мужјаке европског јелена *Cervus elephus* (Ridler и сар., 2015). Начин преноса међу овновима није у потпуности разјашњен, али експерименти показују да су врата инфекције за овнове препуцијум, конјунктива, затим орална, назална и ректална слузница. Најчешће до инфекције долази оралним путем лизањем препуцијума и сексуалним путем када овнови засакају један другог (Hartley и сар., 1955; Bulgin, 1990; Ridler и West, 2011).

Hartley и сарадници су 1955. године успјели да докажу инфицирање овнова након парења са овцама које су за вријеме истог еструса парене са инфицираним овновима. Ипак, исти аутори нису успјели да пренесу болест овновима који су се напасали на пашњацима контаминираним плацентарним садржајем порјеклом од инфицираних оваца, иако је орални пут заражавања доказан (Buddle, 1955). Hughes је 1972. године успјео да изолује *B. ovis* из вагиналног исцјетка 10 дана након абортуса. Из тога разлога Hughes је посумњао да је један од начина инфицирања овнова парење са овцама током првог еструса који се јави након побачаја (Hughes, 1972).

Истраживања показују да је инфекција овнова који нису у приплоду итекако могућа. Трансмисија *B. ovis* међу овновима у кохабитацији је давно доказана (Brown и сар., 1973). Још раније је након опсервације фецеса у препуцијуму овнова у кохабитацији закључено да је хомосексуална активност јако битна у ширењу епидидимитиса овнова (Hartley и сар., 1955). Док је сезона парења у току, обично постоји и трансмисија венералним путем и хомосексуалним понашањем. Код овнова који нису у приплоду хомосексуална активност је најдоминантнији пут преноса болести. Слузнице пениса, препуцијума, конјунктива и вјероватно ороназална слузница су главна мјеста примарне инфекције.

Доказано је да код сваког овна инфицираног врстом *B. ovis* не долази до излучивања бактерија сјеменом. Viberstein и сар. (1964) су запазили да су 45 од 48 овнова заражених сјеменом интраконјунктивалним путем клицоноше. Користећи слузницу препуцијума и пениса инокулисану инфицираним сјеменом (Laws и сар., 1972) продуковали су патолошке промјене и екскрецију бруцела сјеменом код 6 од 25 овнова, док је серолошки

одговор без екскреције имало 11 овнова. Постоји само један публикован литературни податак ректалног пута инфицирања (Goggie, 1957) и то само као серолошки одговор без клицоноштва. Релативна фреквенција инфекција код природно инфицираних овнова код којих долази до спонтаног оздрављења није ни до данашњег дана у потпуности разјашњена.

Овце се само понекад инфицирају и могу да расијавају *B. ovis* вагиналним исцједком или млијеком. Овакве инфекције оваца су најчешће пролазне и ријетко трају дуже од једног гравидитета. Јагањци се могу инфицирати ако сисају инфицирану овцу, а конгениталне инфекције су доста ријетке. Овце се најчешће инфицирају венералним путем. Након парења са инфицираним овном развијају аглутинациона антитјела и долази до инфекције плаценте (Buddle, 1955). Након експерименталне интравагиналне инокулације код оваца које су гравидне од 5 до 40 дана могуће је изоловати *B. ovis* из вагине након 64 дана, а из крви након 98 дана (Muhammed и сар., 1975). Експериментална инфекција оваца интраконјунктивалним путем доводи до инфекције јагањаца само ако су овце изложене бактеријама од 21. до 78. дана гестације (Osburn и Kennedy, 1966). Међутим, фетуси остају пријемчиви на интраутерину инокулацију током цијелог гравидитета. Molello и сар. (1963) истичу улогу хематома који се формирају на бази котиледона као примарно мјесто иницијалне плаценталне инфекције. Хематоми се формирају око 75. дана гестације. Како су ове структуре критичне за инфекцију, хематогено плацентално излагање *B. ovis* требало би да се деси након ове фазе гестације. У једном експерименту је утврђено да од 27 инфицираних оваца код 26 постоји инфекција плаценте приликом првог јагњења, док је код четири доказана и приликом следеће гестације (Buddle, 1955). Изолација *B. ovis* из тестиса конгенитално инфициране мушке јагњаци може указивати да клицоноштво може постојати као резултат конгениталне инфекције, што је изузетно риједак случај (Hughes, 1972).

Европски јелени (*Cervus elaphus*) се такође могу заразити полним путем, затим директним контактом између инфицираних јелена и експериментално преко конјунктивалне, назалне и ректалне слузнице. Као и овнови, инфицирани јелени излучују *B. ovis* урином и сјеменом. Ипак, већина ових животиња елиминише инфекцију за мање од годину дана (Ridler и сар., 2015). Јарчеви се могу експериментално инфицирати инокулацијом бруцела на носну, конјунктивалну или препуцијалну слузницу, као и инјекционим интратестикуларним убризгавањем. Експериментално се могу инфицирати и бјелорепи јелен (*Odocoileus virginianus*) и амерички муфлон (*Ovis canadensis*). У једном од два случаја експерименталне инфекције стеоних крава забиљежено је излучивање *B. ovis* млијеком.

Контаминација пашњака не представља важан пут трансмисије болести. Овце се не могу инфицирати када се напасају на пашњацима на којима су претходно боравиле инфициране животиње или када се држе у ограђеним просторима до инфицираних животиња. Такође

се сматра да артропозе немају никакву улогу у епизоотиологији *B. ovis* (Burgess, 1982).

Преваленција епидидимитиса овнова се у запатима оваца креће од мање од 10% па до преко 50%. Иако је забиљежена инфекција овнова старости 4-6 мјесеци, ипак најчешће су инфицирани старији овнови. Није сигурно да ли козе имају неку улогу у епизоотиологији болести. У Бразилу, козе су најчешће серопозитивне ако долазе из мјешовитих стада са овцама што указује да су ипак овце главни извор инфекције, мада постоје и стада коза позитивна на присуство *B. ovis* (Costa и сар. 2016). У неким земљама као што је Француска након престанка вакцинације оваца Рев-1 вакцином против *Brucella melitensis* дошло је и до повећања инциденције епидидимитиса овнова (Rovid, 2018).

Последице инфекције *B. ovis* знатно варирају међу овновима. Код неких приплодњака инфекција има мали ефекат на квалитет сперме, али проузрокује значајно смањење покретљивости сперматозоида, док код других пак доводи до смањеног броја или промјене морфологије сперматозоида (Rovid, 2018). Мужјаци европског јелена (*Cervus elaphus*) су изгледа отпорнији на инфекцију *B. ovis* и прате је блаже промјене и краћи клинички ток (Ridler и сар., 2015). Клиничка слика је такође блага код експериментално инфицираних јарчева. Међутим, експериментална инфекција америчког муфлона (*Ovis canadensis*) доводи до формирања патолошких промјена сличних или чак интензивнијих од оних код оваца што сугерише да су ове животиње високо осјетљиве на инфекцију *B. ovis* (Mccollum, 2013). Код инфицираних оваца проценат побачаја и перинаталног морталитета варира између 1-2% док неки извори упућују да су ове појаве изузетно ријетке. Након експерименталне инфекције оваца чак до 50% њих побаци или ојагни мртве или авиталне јагање (Molello и сар., 1963). Међутим, ове овце су инфициране интравенским путем у осјетљивој фази гестације тако да ова слика не одговара оној код природне инфекције у запату оваца.

2.8. Патогенеза

Бруцеле пролазе кроз мукозне баријере, и трасмисија настаје оралним путем када ован њуши или лиже урин инфицираног овна, затим ректалном копулацијом са инфицираним овном и најзад венералним путем преко оваца које су у истом циклусу парене са зараженим овном. Код инфицираних оваца може доћи до појаве абортуса, рађања мртве или живе авиталне јагади (Meinershagen и сар., 1974; Muhammed и сар., 1975). Међутим, у више наврата је доказано да овце не носе *B. ovis* више од једног или два естрална циклуса (McFarlane и сар., 1952; Hartley и сар., 1955; Ris, 1970; Muhammed и сар., 1975), и у већини случајева нису одговорне за одржавање обољења у наредној сезони парења. Ректална копулација између овнова у периоду ван сезоне парења је по неким ауторима најзначајнија за ширење и одржавање болести из године у годину (Kimberling и сар., 1988), али је за узрочника доказано да не пролази кроз ректалну слузницу (Hartley и сар.,

1955). Врло је вјероватно да бруцеле пенетрирају кроз препуцијалну слузницу и слузницу пениса овна који заскаче убрзо након претходне депозиције инфицираног сјемена у ректум овна или вагину овце који се засакају.

B. ovis улази у крвоток инфициране животиње преко аферентних лимфних судова и регионалних лимфних чворова и разноси се по цијелом организму (Ridler и сар., 2014). Након тога, бруцеле се локализују у епидидимисима, сјеменим кесицама, булбоуретралним жлијездама, ампулама, бешици и бубрезима. Након експозиције у периоду од 21 до 45 дана у пасјеменицима могу постојати видљиве промјене, а након 60 дана бруцеле више нису присутне у јетри, слезини и лимфним чворовима (Kennedy и сар., 1956). Интересантно је да су сјемене кесице а не епидидимиси најчешћи инфицирани орган тако да је субклиничка инфекција чешћа него клинички видљив епидидимитис. У студији рађеној на 408 инфицираних овнова, само 14% је имало палпабилне лезије у епидидимисима (Kimberling и сар., 1988). Овнови који су развили видљиве гениталне промјене развијају дугогодишњу аутоимуноу реакцију која би могла бити узрок смањене плодности код таквих животиња (Paolichі и сар., 2000).

Субклинички инфицирани онови су клицоноше и практично се једино могу идентификовати бактериолошким или серолошким тестирањем. Антитјела у серуму се могу детектовати најраније двије седмице након инфицирања *B. ovis* и перзистирају мјесецима и чак годинама. Постоје међутим серолошки негативни овнови који могу бити клицоноше дужи временски период (Bagley и сар., 1989; Vulgin, 1990). Процјена је да око 3,5% инфицираних овнова може имати негативне резултате приликом серолошког тестирања (Bagley и сар., 1989).

Откривено је неколико фактора вируленције свих *Brucella* врста који су неопходни за успостављање хроничне инфекције. На пример, *virB* оперон-кодирајући Тип IV Секреторни систем (T4SS) је неопходан за мултипликацију и интрацелуларно преживљавање и игра кључну улогу приликом интрацелуларног опстанка *Brucella* врста. То је велики макромолекуларни комплекс кога чине 12 субјединица, а кодира га оперон *virB* који се састоји из 12 гена смјештених на другом хромозому *B. ovis*. Овај систем модулира матурацију вакуоле у којој се налазе бруцеле инхибирајућу њихову фузију са лизозомима, водећи патогене према вакуолама гранулисаног ендоплазматског ретикулума, интрацелуларним нишама умножавања бруцела (O'Callaghan и сар., 1999; Celli и сар., 2003; Starr и сар., 2008). На тај начин бруцеле преживљавају у фагоцитним ћелијама које их практично разносе по организму. Инактивација T4SS-а резултира значајном атенуацијом свих *Brucella* врста укључујући и *B. ovis*, било да се ради о инфицираним културама ткива *in vitro* или *in vivo* на животињским моделима (Siera и сар., 2000; Mol и сар., 2014).

Tsolis и сарадници су идентификовали острво патогености на другом хромозому *B. ovis* које је одсутно код осталих класичних врста бруцела (Tsolis и сар., 2009). Ово острво је названо „острво патогености *B. ovis* 1”, пошто кодира гене који су повезани са патогеношћу (Silva и сар., 2011). На пример, делеција два гена који кодирају компоненте ABC-везујућег транспортера (BOV_A0504-BOV_A0500, назван *abcEDCBA*) резултује значајном атенуацијом *B. ovis* код миша (Silva и сар., 2011) и овна (Silva и сар., 2013). Касније је откривено да кодирани *abcEDCBA*-кодирајући ABC транспортер интерферира са експресијом T4SS на пост-транскрипцијом нивоу (Silva и сар., 2014).

Циклични бета-1,2 глукани (CbetaG) које синтетишу бруцеле су важни за заобилажење одбрамбених механизма домаћина. Ови молекули дјелују у липидним сплавовима ћелијске мембране домаћина. Мутанти којима недостаје CbetaG не успјевају да спријече фузију фагозома и лизозома и због тога не могу да се умножавају интрацелуларно. Када им се дода пречишћени CbetaG или синтетски метил-бета-циклодекстрин, мутанти успјевају да контролишу матурацију вакуоле избјегавајући фузију фагозома и лизозома, што интрацелуларно локализованим бруцелама омогућава преживљавање и транспорт до ендоплазматског ретикулума. Фузија ендоплазматског ретикулума и вакуоле која садржи бруцеле зависи од T4SS али не од CbetaG. Бруцеларни CbetaG је према томе фактор вируленције који интерагује са липидним сплавовима ћелијске мембране домаћина доприносећи тако преживљавању патогена (Arellano-Reyonsa и сар., 2005)

2.9. Клиничка слика

Код експериментлно инфицираних овнова клинички манифестне промјене се уочавају 3 до 17 недеља након инокулације *B. ovis*. Промјене у квалитету сјемена пак настану једну недељу након инфицирања (Biberstein и сар., 1964; Burges, 1982).

B. ovis код овнова доводи до појаве епидидитимиса, орхитиса и смањене плодности. Лош квалитет сјемена са повишеним бројем леукоцита може на почетку инфекције да буде једини симптом обољења. Концентрација и покретљивост сперматозоида су обично смањени са честим налазом морфолошки абнормалних сперматозоида. Палпабилне промјене у епидидимисима и тестисима се налазе код отприлике 30-50 % животиња. Лезије могу бити унилатералне и билатералне с тим да су унилатералне чешће. Епидидимитис се одликује повећањем епидидимиса, нарочито репа, док се код неких овнова може константовати бол или нелагодност приликом палпације. Такође се често може констатовати присуство нодула и других абнормалности у морфологији тестиса, а у хроничним случајевима тестиси су понекад атрофирани. Код већине овнова палпабилне промјене на спољашњим гениталијама су перманентне (Ridler и сар., 2006, 2014).

Инфицирани овнови имају очуван либидо, док је квалитет сјемена екстремно варијабилан (Bulgin, 1990; Foster и Ladds, 2007). Ипак, обично је концентрација и покретљивост

сперматозоида смањена, повећано је присуство дефектних сперматозоида (нарочито репа) са одвојеним главама уз скоро обавезно присуство полиморфонуклеарних леукоцита. Код инфицираних овнова је понекад тешко постићи ејакулацију коришћењем електроејакулатора. Ако су промјенама захваћена оба епидидимиса за очекивати је потпуно одсуство сперматозоида у ејакулату.

Код оваца *B. ovis* доводи до побачаја, рађања мртве и авиталне јагњаци и повишења стопе перинаталног морталитета, а неке инфициране овце дају слабе или неуобичајено мале јагањце. Међутим, такве репродуктивне сметње су доста ријетке код оваца. Системски знаци инфекције су ријетки код одраслих оваца и овнова (Burgess, 1982).

Слични клинички знаци који укључују епидидимитис и смањен квалитет сјемена су присутни код европског јелена (*Cervus elaphus*) као и код експериментално инфицираних јарчева, бјелорепих јелена (*Odocoileus virginianus*) и америчких муфлона (*Ovis canadensis*). У односу на овнове европски јелени имају ређе палпабилне промјене у тестисима (Ridler и сар., 2006). Код европских кошута (*Cervus elaphus*) није уочена појава побачаја нити повишење перинаталне смртности, али су побачаји експериментално изазвани код америчких муфлона (*Ovis canadensis*) (McCullum и сар., 2013).

2.10. Патоморфолошке промјене

Најзначајније лезије се налазе на епидидимисима, затим на *tunica vaginalis* и тестисима овнова. Промјене могу захватити један или оба епидидимиса с тим да су промјене чешће у репу него у глави и тијелу. Сперматокела са парцијално згуснутом сперматичном течношћу се може уочити код неких овнова. *Tunica vaginalis* је често задебљала са развијеним фиброзним промјенама (САВ, 2021). Понекад је у тестисима присутна атрофија. Микроскопске промјене се могу наћи и у другим дјеловима репродуктивног система, укључујући ампулу *ductus deferens* и сјемене кесице. Сличне патоморфолошке промјене се уочавају код европског јелена (*Cervus elaphus*) (Ridler и сар., 2006) и експериментално инфицираних бјелорепих јелена (*Odocoileus virginianus*) и овнова америчког муфлона (*Ovis Canadensis*) (McCullum и сар., 2013).

Прве микроскопске промјене се уочавају на репу епидидимиса и тек касније се могу проширити на тијело и главу овог органа. Промјене на тестисима су блаже и углавном се ради о неспецифичној дегенерацији, са паралелним промјенама на пасјеменицима (Biberstein и сар., 1964). Патолошке промјене изостају на *rete testis* и *ductuli efferentes*. Хиперплазија и метаплазија епитела епидидимиса су промјене карактеристичне за бруцелозу овнова (Kennedy и сар., 1956). Ове промјене су често сегменталне и обично почињу и најинтензивније су у дисталном дијелу репа епидидимиса. Хиперплазија епитела последично води до задебљања и на крају се формирају карактеристичне интраепителне цисте. У овим цистама могу понекад да се акумулирају неутрофилни

гранулоцити а могу и да се уоче како мигрирају кроз епител. Оваква миграција је понекада тако интензивна да се у лумену накупља гној. Формирање цисти је удружено са метапластичним промјенама код којих је регуларни базални распоред ћелијских једара изгубљен и присутна је њихова насумична оријентација. Оваквим промјенама у епителу обично су придружене неспецифичне инфламаторне промјене у интерстицијуму. Ово су углавном у потпуности хроничне реакције са плазмацитима као предоминантним ћелијским типом. Плазмацити су заједно са другим мононуклеарним ћелијама дифузно распоређени око крвних судова. Иако тачан механизам није познат сматра се да промјене на епителу доводе до изласка сперме из каналића епидидимиса што последично води још озбиљнијим лезијама. У одсуству изласка сперме из каналића епидидимиса промјене су благе и често инапаратне. Јасно је да сперматозоиди слободни у интерстицијалном ткиву провоцирају озбиљнију акутну и хроничну инфламаторну реакцију. Важно обиљежје хроничних лезија јесте дифузна фиброза (Kennedy и сар., 1956).

У случајевима гдје постоје екстензивне прираслице долази до појаве атрофије тестиса (Kennedy и сар., 1956). Тада су обично присутни фокуси стазе сперме, интратубуларни грануломи и калцификација са околном зоном фиброзе. Viberstein и сарадници ипак закључују да су промјене у тестисима мање значајне и састоје се углавном од неспецифичне дегенерације (Viberstein и сар., 1964). Међутим, Hall сматра да су фокална стаза сперме и тубуларна дегенерација у тестисима чешће примарне него секундарне због оклузије епидидимиса (Hall, 1955).

Промјене у *ductus deferens*-у су сличне онима у епидидимисима. Изражена је хиперплазија епитела са задебљањем зида, док је *lamina propria* густо инфилтрирана лимфоцитима, плазмоцитима и хистиоцитима. Ове промјене не доводе до стазе или изласка сјемена ван каналића епидидимиса. На нивоу ампула и сјемених кесица хиперплазија епитела је одсутна. Присутне су хроничне инфламаторне промјене у *lamina propria*-и са или без акумулације полиморфонуклеарног ексудата у лумену (Viberstein и сар., 1964).

Примјећено је да се сперматични грануломи скоро увјек јављају у епидидимисима (Kennedy и сар., 1956). Грануломатозна реакција замјењује интратубуларну неутрофилну реакцију. У проксималним дијеловима епидидимиса, стаза сперме и њен накнадни излазак из каналића епидидимиса резултује стварањем гранулома. У оним тубулима у којим је дошло до фокалног изласка сперме из каналића епидидимиса, повремено долази до сквамозне метаплазије епитела.

У студији рађеној на овновима инфицираним *B. ovis* описане су ултраструктуралне лезије у тестисима и епидидимисима (Bakurjiev и Krustev, 1978). Присутне су вакуолизација једра и цитоплазме сперматогонија и сперматоцита са прекидом континуитета једарне и плазма мембране. Примјећена је и декапитација сперматиде и сперматозоида. Промјене на

эпидидимисима обухватале су дегенерацију базалне мембране тубула эпидидимиса и кривљења. У лумену тубула уочавају се леукоцити, као и бруцеле.

На глави сперматозоида су углавном присутне ултраструктуралне промјене (Вакурјев и Крустев, 1977). У ове промјене спадају одвајање и руптура плазмалеме, сепарација акрозома и *galea capitis*, бубрење нуклеарне мембране, гранулација и дезинтеграција једарних структура. Такође су запажене промјене на врату сперматозоида које последично доводе до одвајања главе од остатка сперматозоида. Леукоцити у сперми указују на постојање фагоцитне активности усмјерене према сперматозоидима (Вакурјев и Крустев, 1976).

Код овнова са инфективним эпидидимитисом је доказана ниска холинестеразна активност у сјемени (Вакурјев и Стојанов, 1977). Нивои активности су око четвртине вриједности у нормалном сјемени овнова и повезани су са високим процентом абнормалних сперматозоида и повећањем рН вриједности са 6,81 на 7,83.

2.10.1. Патоморфолошке промјене код оваца

Велики број раних студија бруцелозе оваца фокусирао се на могућност *B. ovis* да изазове побачај код ове врсте. Molello и сарадници (1963) су примјетили да након интравенске апликације *B. ovis* постоји бактеријемиа коју прати локализација бруцела на хиларној страни плацентома. Код десет од четрнаест утеруса био је присутан glandуларни и перигландуларни ендометритис. Komissarova (1975) закључује да се лезије код оваца карактеришу дегенерацијом и инфламацијом ендометријума са фокалном или дифузном лимфоидном инфилтрацијом. У тежим случајевима се развија пурулентни некротични ендометритис.

2.10.2. Патоморфолошке промјене на плаценти и фетусима

Типичне лезије у плаценти оваца су жуто-сиви плакови који се често спајају у интеркотиледонарном простору. Котиледони могу бити некротични. У озбиљнијим случајевима у хориоалантоису је присутан желатинозни едем. У плућима фетуса понекад могу бити присутне пнеумотичне промјене. Након експерименталне инфекције гравидних оваца *B. ovis* највише су посматране промјене феталне плаценте. Карактеристичне промјене су у интеркотиледонарној регији и састоје се из великог броја сиво-жутих плакова (Osburn и Kennedy, 1966). У неким случајевима хориоалантоис је приљубљен уз амнион или је присутан вискозни желатинозни едем дебљине од 1 до 5 cm. Неки котиледони имају дифузне жуто-сиве регије дисколоризације и чвршћи су у односу на нормалну конзистенцију. Плацента може бити парцијално одвојена од утеруса и само причвршћена за ограничен број карункула (Molello и сар., 1963).

Хистопатолошке промјене интеркотиледонарног простора се јављају у виду некрозе трофобласта који садржи бруцеле и окружен је великим бројем неутрофила и макрофага. У неким случајевима некроза се продубљује даље у мезенхим (Osburn и Kennedy, 1966). Васкуларне промјене су уобичајене и значајна су одлика инфициране плаценте. Јављају се тромбозе са едемом ендотелијалних ћелија и пролиферативним промјенама у ендотелу и интими. Неутрофилни и моноклеарни леукоцити инфилтрују медију и адвентицију многих крвних судова. У котиледонима је присутна некроза ресица са акумулацијом неутрофила. У котиледонима је присутан и велики број бруцела.

Hughes (1972) закључује да је главни исход инфекције гравидних оваца *B. ovis* плацентитис што највјероватније доводи до слабљења исхране фетуса и последичног рађања јагњади мање тежине. У другој студији (Osburn и Kennedy, 1966) примјећено је да су промјене код јагањаца зависне од стадијума гестације. Јагњад побачена у раном периоду гестације угину *in utero* и бивају аутолизована. Јагњад побачена близу термина су жива, мала за њихову старост и са сметњама у дисању.

Хистопатолошке промјене на фетусима састоје се из перибронхијалне лимфоидне хиперплазије, алвеоларног септалног едема и моноклеарне инфилтрације. Алвеоларне септалне ћелије заједно са малим бројем неутрофила и гранулираним еозинофилним материјалом заузимају спљоштени алвеоларни простор, алвеоле и терминалне бронхиоле. У трахеобронхалним и медијастиналним лимфним чворовима присутан је лимфаденитис. Сличне промјене се уочавају у слезини (Osburn и Kennedy, 1966). Промјене на бубрезима се састоје из дифузне неутрофилне инфилтрације на кортикомедуларној граници. Код неких јагањаца у порталном систему присутни су неутрофили и моноклеари.

2.11. Дијагностика

Клинички преглед спољашњих гениталија код овнова је прва и основна метода за откривање неплодних грла и са одличним резултатима су је користили Osbourne (1955), Miller (1967), Gouletsou и Fthenakis (2010). Клинички преглед спољашњих гениталија је лако и брзо изводљив и резултати су практично одмах доступни. Употреба ултразвука може знатно побољшати квалитет клиничког прегледа. Међутим, клинички преглед је непоуздан код хронично инфицираних овнова код којих патолошке промјене на гениталијама могу да регресирају до стадијума у коме више нису палпабилне. Овнови са оваквим промјенама излучују *B. ovis* иако су клинички потпуно здрави (Webb и сар, 1980). Други, ништа мање значајан недостатак ове дијагностичке процедуре јесте што она не разликује епидидимитис изазван *B. ovis* од оних изазваних другим узрочницима (Hughes и Claxton, 1968; Ekdahl и сар., 1968). Присуство палпабилних лезија епидидимиса је изузетно варијабилан индикатор инфекције *B. ovis* (Hughes и Claxton, 1968). Палпабилне лезије су присутне код отприлике половине овнова који имају позитивне РВК титре (Smith, 1962; Gradwell и Van Zyl, 1975; Van Tonder, 1979; Bulgin, 1990). Када је пак

присутан, палпабилни епидидимитис се може детектовати отприлике двије недеље након појављивања бруцела у сјемену (Claxton, 1968; Cameron и Laureman, 1976).

Доказивање *B. ovis* у сјемену инфицираних овнова директним размазом и бактериолошки је најспецифичнија метода за постављање дијагнозе. Бактериолошки преглед је најпоузданији пете недеље од инфицирања (Webb и сар., 1980; Radostits и сар., 2007). Неки аутори су дошли до закључка да бактериолошки преглед није поуздан јер је дисеминација бруцела код инфицираних овнова интермитентна (Edgar, 1959; Hughes и Claxton, 1968). Такође смањењу успјешности доприноси и инактивација бруцела за вријеме транспорта до лабораторије нарочито ако је њихов број у узорку мали. Webb и сарадници (1980) су чак показали да је за успјешан бактериолошки преглед битније адекватно узорковање и брз транспорт до референтне лабораторије од коришћења одговарајућих селективних подлога за изолацију бруцела (Webb и сар., 1980). Ако пак ови иницијални услови нису испуњени, модификована Тајер-Мартинова подлога са фурадантином се показала најефикаснијом (Jones и сар., 1975). Што се тиче прављења директног размаза он има одређене недостатке. Највећи проблем јесте немогућност разликовања *B. ovis* од других бактерија било да су оне контаминенти или воде поријекло из узорка. Такође, код узрапредовалих случајева обољења сјеме је сувише “воденасто” што отежава прављење размаза за преглед. Мали број бруцела у узорку је још једна отежавајућа околност за успјешно дијагностиковање.

Постоји могућност прегледа размаза сјемена на присуство инфламаторних ћелија што је најранија индикација инфекције. Позитиван налаз може да се добије већ двије недеље након инфицирања док су шест недеља након инфицирања практично сви овнови позитивни (Webb и сар, 1980). Оно што је такође битно јесте да су, за разлику од бруцела, инфламаторне ћелије у сјемену присутне практично увјек без обзира на клиничку фазу болести. Мана оваквог прегледа јесте што налаз није специфичан само за *B. ovis*, него се среће и код других обољења и што изискује пуно времена за дијагностику.

У прошлости је било доста покушаја инфекције лабораторијских животиња *B. ovis*. Епидидимитис сличан ономе код овнова је запажен код монголског скочимиша (*Meriones unguiculatus*) (Cuba-Caparo и Myers, 1973) и пацова (*Rattus norvegicus*) (Kennedy и сар., 1956). Код пацова је у лезијама био присутан велики број бруцела. Највећи серолошки титар је запажен код монголског скочимиша (*Meriones unguiculatus*), заморца (*Cavia porcellus*) и пацова (*Rattus norvegicus*) (Cuba-Caparo и Myers, 1973; Kennedy и сар., 1956; Rudenko, 1976). Cuba-Caparo и Myers (1973) су закључили да су монголски скочимиши (*Meriones unguiculatus*) најприкладније лабораторијске животиње за проучавање епидидимитиса овнова. У новије вријеме се због добробити животиња пракса доказивања присуства узрочника инфективних болести на лабораторијским животињама избјегава.

Реакција везивања комплемента (РВК) је дуго времена била најчешће коришћена техника (Jones и сар., 1975; Ridler и сар., 2014) за постављање дијагнозе бруцелозе оваца изазване врстом *Brucella ovis*, али и овдје су пријављивани лажно позитивни (Ryan, 1964) и лажно негативни (Hughes и Claxton, 1968; Menzies, 2012) резултати. Реакција везивања комплемента се користи за детекцију позитивних јединки двије недеље након инфицирања. Већина животиња има титар антитјела 4-5 недеља након заражавања, док се максималан титар достиже са око 9 недеља (Biberstein и сар., 1964; Jones и сар., 1975; Webb и сар., 1980). Осамдесетих година прошлог вијека РВК је коришћена као дијагностичка метода у неким ерадикационим програмима (Hicks и сар., 1978). У овим студијама сви инфицирани овнови су развили значајне титре антитјела од 2 до 9 недеља након настанка инфекције. Међутим, 6 од 10 овнова су остали РВК позитивни 10 мјесеци након инфицирања. Остали овнови су имали непоуздане титре па је за постављање коначне дијагнозе било потребно урадити још два или више тестирања, при чему интервал између тестирања није играо значајну улогу. Овакво флукутирање у висини титра сигурно инфицираних овнова је било значајна препрека коришћењу РВК у условима гдје је “судбину” овна одлучивао исход теста. Додатна мана РВК је била што је замрзавање узорака серума доводило до смањивања титра. Наиме, Hicks и сар. су утврдили да замрзавање узорака до 51 недеље доводи до двоструког смањења титра код 22 % јединки, чиме се наглашава неопходност да се серуми испитају одмах након пријема у лабораторију.

Након експерименталне инфекције оваца (Hughes, 1972) утврђено је да су РВК титри највиши 1 до 6 седмица прије јагњења. Титар антитјела рапидно пада код оваца након партуса као и код оваца код којих инфекција није успјела да захвати плаценту и фетус.

Због комплексности РВК и антикомплементарне природе великог броја серума оваца (Clapp, 1961) истраживана је могућност употребе неколико алтернативних серолошких тестова за детекцију антитјела против *B. ovis*. Тестови који су се користили су микротитрациона РВК (Sanchis и сар., 1976), имунодифузија (Mathews и Trueblood, 1967), (Mayers и Siniuk, 1970) и имунофлуоресценција (Cox и сар., 1977). Реакција индиректне хемаглутинације (ИХА) у којој су испрани еритроцити сензитивисани са означеним антигеном *B. ovis* показала се као поуздана алтернатива због своје релативне једноставности (Ris и Te Punga, 1963). Ипак, при високим концентрацијама антигена долази до неспецифичне аглутинације еритроцита (Ris и Te Punga, 1963), што се донекле може ублажити употребом антигена екстрахованог топлотом. Разлике у резултатима РВК и инхибиције хемаглутинације (ИХА) настају због чињенице да ови тестови детектују различите класе антитјела. Наиме, код оваца IgG₁ је преобладајући комплемент везујуће антитјело, док у реакцијама аглутинације учествују антитјела IgG и IgM класе (Beh, 1973). Такође, топлотна инактивација серума неопходна за извођење РВК може довести до

инактивције једног дјела антитјела (Alton, 1978). Тест индиректне имунофлуоресценције је показао осјетљивост сличну оној код РВК (Сох и сар., 1977).

Тест имунодифузије који детектује преципитујућа антитјела је описан од стране више аутора (Matthews и Trueblood, 1967; Jones и сар., 1975; Сох и сар., 1977; Fісарal и сар., 1995). Осјетљивост овог теста је слична као и код РВК. Њена једноставност је велика предност, док се њена осјетљивост може повећати употебом имуноелектрофорезе (Myers и Varela-Diaz, 1979).

Алергијски тест са интрапалпебралном инокулацијом антигена је у прошлости био коришћен за откривање животиња инфицираних *B. ovis* (Hall, 1955; Ionescu и сар., 1973; Jones и сар., 1975; Dіrenko и Rudenko, 1976; Polydorou, 1979). Закључак је био да би овај тест могао имати употребну вриједност за тријажу стада, али он у пракси није заживио.

Тест брзе аглутинације са Rose Bengal-обојеним *B. ovis* антигеном коришћен је за детекцију антитјела против *Brucella canis* (George и Carmichael, 1978). Моларитет пуферског раствора, као и рН вриједност су били важни фактори за стабилност антигена.

Индиректна *ELISA* се у новије вријеме све чешће користи као први тест у откривању епидидимитиса овнова. У поређењу са РВК, која је метода избора индиректна *ELISA* је више осјетљива, али мање специфична (Praud и сар. 2012). Ипак, индиректна *ELISA* има одређене предности у односу на РВК. Иако има добру осјетљивост и специфичност, РВК има и одређене недостатке као што су антикомплементарна активност (Searson, 1982), прозон ефекат (Marin и сар., 1989), немогућност коришћења хемолизованих серума (Worthington и сар., 1985), неопходна инактивација серума (Marin и сар., 1989) и релативна комплексност извођења (Gail и сар., 2003). Предности индиректне *ELISA* су једноставност извођења, као и да се може користити за тестирање хемолизованих или антикомплементарних серума (Gail и сар., 2003; Ridler и сар., 2014).

Микроскопски преглед сјемена, вагиналног бриса или млијека уз коришћење модификованог бојења по Ziehl-Neelsen-у (Stamp) може се користити за постављање прелиминарне дијагнозе. Бруцеле се у сјемени појављују 5 до 7 недеља након инфекције (Edgar, 1959; Claxton, 1968; Jones и сар., 1975; Cameron и Laureman, 1968, 1976; Webb и сар., 1980). На микроскопском препарату се појављују као кокобацили или кратки штапићи, обично појединачно али понекад могу да буду у паровима или мањим групама. Микроскопски изглед *B. ovis* је идентичан *B. melitensis*, а такође су сличне неким другим бактеријама као што су *Chlamydia abortus* и *Coxiella burneti*. Ако је доступан тест имунофлуоресценције може олакшати идентификацију (Ajai и сар., 1980). Дефинитивна дијагноза захтјева културелно доказивање и/или доказивање нуклеинске киселине PCR тестовима или неком другом молекуларно-генетичком техником.

B. ovis може се изоловати из узорака сјемена овнова, вагиналног бриса или млијека оваца, такође из плаценте или фетуса након побачаја. Сумњиви овнови могу се тестирати тако што се од здравих оваца након парења узимају вагинални брисеви. Код испитивања сјемена овнова неопходно је понављати узорковање пошто постоји могућност интермитентног излучивања бактерија. Циљни органи овнова за дијагностику бруцела су епидидимиси, сјемене кесице, ампуле и ингвинални лимфни чворови, док се од оваца узимају материца, илијачни и супрамамарни лимфни чворови. Узорковање неких других лимфних чворова као што су кранијални, скапуларни, префеморални и тестикуларни може повећати вјероватноћу изолације код оба пола. Бруцеле се такође могу изоловати из плаценте, као и из побачених плодова, најчешће плућа, слезине и садржаја сиришта (Buddle и Boyes, 1953; Osburn и Kennedy, 1966).

B. ovis се може изоловати на великом броју неселективних подлога, али и на селективним подлогама као што су модификована Тајер-Мартин (Marin и сар., 1996) или ЦИТА подлога (De Miguel и сар., 2011). Фарелова подлога се често користи за изолацију других врста бруцела, али она због присуства бацитрацина и налидиксинске киселине инхибира раст *B. ovis* (Farrell, 1974). Тајер-Мартинова подлога је развијена 1964. године (Thayer и Martin, 1964), а модификована је двије године касније избацивањем ристотецина који је коришћен за инхибицију раста грам-позитивних бактерија (Thayer и Martin, 1966). Значајна мана Тајер-Мартинове подлоге је слабији инхибиторни ефекат на раст контаминената у односу на Фарелову подлогу. Такође, за разлику од Фарелове подлоге модификована Тајер-Мартинова подлога због присуства хемоглобина у свом саставу није прозирна што онемогућава директну визуелизацију морфологије колонија. Због недостатака Тајер-Мартинове и Фарелове подлоге развијена је нова селективна подлога названа ЦИТА медијум (De Miguel и сар., 2011) која у свом саставу садржи ванкомицин, колистин, нистатин, нитрофурантион и амфотерицин Б. Ова подлога инхибира раст огромне већине микроорганизама контаминената а истовремено подржава раст свих врста *Brucella*. У односу на Фарелов и модификовани Тајер-Матинов медијум ЦИТА медијум се показао осјетљивијим за изолацију бруцела из теренских узорака. Такође се могу користити технике обогаћења. Поједини изолати *B. ovis* не могу да расту на одређеној подлози па је приликом изолације пожељно користити неколико различитих подлога. Третман антибиотицима или прерастање подлоге микроорганизмима контаминентима такође може ометати изолацију.

B. ovis се до нивоа врсте може идентификовати фенотипским методама (фаготипизација, бактериолошке, биохемијске и серолошке карактеристике) или молекуларно-генетичким методама. Дијагностичке лабораторије могу идентификовати већину изолата, али је дефинитивну идентификацију потребно обавити у референтним лабораторијама које имају искуство, ресурсе и методе за међусобно разликовање врста бруцела. Већина старијих PCR тестова идентификује бруцеле само до нивоа рода, али је у новије вријеме објављено

постојање *B. ovis* специфичних PCR тестова (Manterola и сар., 2003). Често су у употреби комплексни PCR тестови као што су AMOS тест и Bruce-ladder тест који разликују све врсте бруцела укључујући и вакциналне сојеве.

Један од најпопуларнијих PCR тестова за идентификацију *Brucella* врста AMOS PCR (Bricker и Halling, 1994) базиран је на полиморфизму који настаје из специјес-специфичне локализације уметнуте секвенце IS711 у хромозому *Brucella* и може да разликује *B. abortus* (Биотип 1, 2 и 4), *B. melitensis* (Биотип 1, 2 и 3), *B. ovis* и *B. suis* (Биотип 1). Током година увођене су модификације теста са циљем побољшања перформанси, те су додатни сој-специфични прајмери инкорпорирани за идентификацију *B. abortus* S19 и RB51 вакциналних сојева (Bricker и Halling, 1995; Bricker и сар., 2003). Ипак, AMOS PCR не може да детектује остале врсте и биотипове бруцела.

Недостатке AMOS теста надокнадио је Bruce-ladder multiplex PCR тест (Garcia-Yoldi и сар., 2006). Селекција ДНК секвенци за израду PCR прајмера базирана је на специјес-специфичним или сој-специфичним генетичким разликама. Идентификација је базирана на броју и величини седам продуката умножених PCR методом. За *B. ovis* је карактеристична појава 5 ампликона 1071, 794, 587, 450 и 152 базних парова. Највећа предност Bruce-ladder PCR теста над AMOS PCR тестом је што он може идентификовати и диференцирати све *Brucella* врсте укључујући и вакциналне сојеве у оквиру само једног теста. Овај тест има могућност детекције и *B. canis*, *B. neotomae*, *Brucella* врста морских сисара, *B. abortus* (Биотип 3, 5, 6, 7 и 9), *B. suis* (Биотип 2, 3, 4, и 5). Остале предности су брзина извођења (PCR се може завршити у року од 24 сата), потребна минимална припремљеност узорка (ради и са лизатом читавих ћелија) и минимални ризик по особље (може се изводити са инактивисаним колонијама бруцела, лимитирајући тако контакт са живим бактеријама).

Постоје и други тестови који се могу искористити у идентификацији врсте бруцела: SNP тест (Single Nucleotide Polymorphism), MALDI-TOF MS тест (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry). Технике као што је MLVA (Multiple-Locus Variable number tandem repeat Analysis) могу бити од користи у епизоотиолошком истраживању извора заразе. Док се PCR тестови углавном користе за идентификацију врста бруцела из културе, поједине лабораторије користе ове тестове за директно доказивање из клиничких узорака.

Имуноензимски тест (ELISA), агар гел имунодифузија (АГИД) и реакција везивања комплемента (РВК) се најчешће користе за детекцију антитјела против *B. ovis*. Овнове са сумњивим резултатима треба одвојити и ретестирати након 2-4 недеље. Антитјела против *Dichelobacter nodosus*, узрочника заразне шепавости оваца могу у неким случајевима да реагују са антигенима *B. ovis* приликом тестирања доводећи до лажно позитивних резултата. *B. ovis* има “груби” липополисахрид (ЛПС) у свом ћелиском зиду, па

серолошки тестови за детекцију ове врсте не реагују унакрсно са осталим врстама бруцела које имају “глатки” ЛПС.

Manterola и сарадници су поредили осјетљивост и специфичност PCR тестова са резултатима бактериолошког испитивања и серолошких тестова за дијагностику *B. ovis* код инфицираних овнова (Manterola и сар., 2002). У овом испитивању за PCR тест коришћени су прајмери поријеклом из инсертоване секвенце IS6501. Није забиљежена амплификација ДНК бактерија које су филогенетски блиске бруцелама као и код седам врста бактерија које се сматрају главним узрочницима епидидимитиса код овнова. Утврђено је да је специфичност PCR теста 100% када су тестирани узорци сјемена здравих овнова. Поређење PCR и културелног испитивања код 192 узорка сјемена показало је пропорцију слагања од 0,91. Такође, показало се да PCR тест има осјетљивост сличну оној код бактериолошке дијагностике па са правом може да буде комплементарни тест за директну дијагностику *B. ovis* из узорака сперме овнова.

2.12. Третман

Високовриједни овнови се могу успјешно лијечити антибиотцима, али излијечене животиње могу имати смањену плодност, па лијечење за већину овнова није економски оправдано. Препоручује се да се лијечени овнови држе одвојено од здравих, те да се њихово сјеме бактериолошки прегледа да би се утврдило да ли су клицоноше.

Иако се третман не препоручује, студије су показале да два од три овна клицоноше без клиничких симптома могу успјешно бити излијечени употребом антибиотика (Dargatz и сар., 1966). Лијеком избора се сматрају тетрациклини, сами или у комбинацији са другим антибиотцима као што је стрептомицин (Hajtos и сар., 1994; Ridler и West, 2011). У већини случајева цијена дијагностике, третмана, изолације и накнадног тестирања ради потврде излијечења превазилази цијену замјене инфицираног здравим овном. Третман овнова са клиничким симптомима није ефикасан. Хируршко одстрањивање обољелих тестиса и епидидимиса (кастрација) није решење јер су акцесорне полне жлијезде обично инфициране и дисеминација бруцела урином и ејакулатом може да се настави. Из истог разлога се не препоручује и вазектомија инфицираних овнова и њихово коришћење као пробача (Ridler и West, 2011).

2.13. Превенција

У многим дијеловима свијета тренутно нема обавезног мониторинга бруцелозе оваца. Да би се спријечио пренос болести у незаражене регије или стада и у међународним и локалном транспорту обавезно је серолошко тестирање овнова (European Union. Council Directive, 1991). Недавно је бруцелоза оваца изазвана *B. ovis* процјењивана према критеријумима закона о здрављу животиња (енг. Animal Health Law- AHL), Регулативи

(EU) бр. 2016/429 и донијет је закључак да је квалификована за увршћивање на листу за спровођење обавезних контролних мјера (Commission Delegated Regulation (EU) 2018/1629). Ово обољење је пријављивано широм свијета али до данас стварна дистрибуција бруцелозе оваца остаје углавном непозната. Ерадикациони програми нису обавезни а успјешана ерадикација је углавном доста тешка (Blasco, 2010; Picard-Hagen и сар., 2015). Овнови се такође обавезно тестирају прије уласка у програм узимања сјемена за вјештачко осјемењавање. На фармама се дијагноза углавном поставља на основу клиничког прегледа, а серолошко тестирање се углавном ради ако се палпацијом тестиса установе промјене или ако у стаду постоји проблем неплодности.

Први преглед стада на присуство *B. ovis* обавља се палпацијом тестиса овнова, које прати лабораторијско тестирање свих животиња са испољеним аномалијама, као и извјестан проценат клинички здравих овнова. Употреба ултразвука може допринијети квалитету клиничког прегледа. Због чињенице да значајан број инфицираних овнова нема клинички детектабилне лезије, ефикасност палпације скротума као тријажне методе много зависи од броја овнова у стаду. Ако се пак епидидимитис овнова дијагностикује, сви овнови се могу кастрирати или се може примјенити програм тестирања свих овнова и клања позитивних јединки. Раздвајање овнова на фарми у мање групе може помоћи у смањењу трансмисије док се не заврши процес ерадикације. Инфекција код оваца генерално се превенира контролом болести код овнова.

Задатак превенције је континуирани надзор могућности уноса инфицираног овна у здраво стадо. Контола бруцелозе оваца се пак ослања на идентификацију и уклањање инфицираних јединки и мониторинг којим се спречава унос инфицираних животиња у запат. Следећа процедура се препоручује за успостављање здравог стада (Bulgin, 1990):

1. Куповати само младе овнове који нису претходно коришћени за приплод од провјерених узгајивача, по могућности серолошки тестиране и негативне на *B. ovis*;
2. Држати новообављене овнове одвојено од других овнова док се не докаже да нису заражени *B. ovis*;
3. Палпирати спољашње гениталије свих овнова један мјесец прије сезоне парења и кастрирати све овнове са клиничким епидидимитисом;
4. Перманентно идентификовати и узимати узорке крви од преосталих овнова за *ELISA* тестирање;
5. Кастрирати све овнове са позитивним или сумњивим резултатима *ELISA* теста;
6. Ако се установи макар један *ELISA* позитиван ован, сви преостали овнови треба да се ретестирају 60 дана након што су позитивни овнови уклоњени из запата;

7. Неколико година након што сви овнови показују негативне резултате овнове би требало серолошки тестирати једном годишње, а после тога периодично;

8. Ако приказана процедура не редукује инциденцију позитивних *ELISA* резултата испод 0,5% на крају сезоне парења друге године, врло је вјероватно да у стаду постоји серолошки негативан инфицирани ован. Сви овнови би требало да имају преглед репродуктивне способности и такође бактериолошки преглед сјемена на присуство *B. ovis*. Препоручује се замрзавње сјемена или ткива тестиса приликом транспорта у лабораторију на бактериолошки преглед.

B. ovis се у запат најчешће уноси инфицираним животињама или сјеменом. Стада слободна од *B. ovis* не би зато смјела долазити у контакт са потенцијално инфицираним животињама. Нарочито не би требало држати здраве овнове са овновима непознатог статуса нити би требало дозволити да се они паре са овцама које су се недавно париле са таквим овновима. Такође, овнови могу пријенети бруцеле европском јелену (*Cervus elaphus*) и другим осјетљивим цервидима или малим преживарима ако се држе у заједничком окружењу (McCullum и сар., 2013; Ridler и сар., 2015). У неким земљама, овце се тестирају на *B. ovis* прије вјештачког осјемењавања, или прије пресељења у неку другу државу па чак и другу фарму. Постоје стада слободна од *B. ovis* па је нарочито значајно тестирање свих животиња које улазе у такве запате.

У земљама које имају ниску или средњу преваленцију бруцелозе оваца, ерадикација болести је могућа моделом тестирања и клања позитивних јединки (Clarr и сар., 1962; Ridler и West, 2011). Пожељно би било коришћење више тестова да би се повећала свеукупна осјетљивост и смањила вјероватноћа појаве лажно негативних резултата (Blasco, 1990; Ridler и West, 2011; Praud и сар., 2012). Такав приступ би укључивао комбинацију серолошких (индиректна *ELISA* и РБК) и помоћних метода (клинички преглед и бактериолошко испитивање). Овакав приступ, који би морао да се примјењује прије сваке сезоне парења, као и приликом интродукције овнова у здрава стада могао би довести до брже идентификације и уклањања хронично инфицираних јединки. Међутим, у земљама или регијама гдје је преваленција болести висока, оваква стратегија би била економски неодржива. Иако је у новије вријеме направљен велики помак у изради различитих вакцина против *B. ovis*, Рев 1 вакцина остаје једина доказано ефикасна вакцина која спречава инфекцију код овнова. Због тога је у високо зараженим подручјима вакцинација Рев 1 вакцином економски и практично најприхватљивији начин контроле болести (Blasco, 1990), нарочито у земљама гдје извоз приплодних овнова и сјемена није економски приоритет и гдје искорјењивање болести није краткочни циљ.

Ако ерадикација није изводљива, овнови се могу клинички прегледати прије сезоне парења и сви овнови са палпабилним промјенама се стерилишу. Међутим, овакав приступ само елиминише овнове са клиничким промјенама док знатан проценат инфицираних

јединки које немају клиничке симптоме остаје у запату. На фармама гдје се из било ког разлога не може извршити ерадикација болести може се спровести вакцинација. Најчешће се користи Рев 1 вакцина против *B. melitensis* (Van Tonder и сар., 1972; Worthington и сар., 1973; Gradwel и Van Zyl, 1975; Radostits и сар., 2007). Ова вакцина интерферира са мониторингом на *B. melitensis* па је у многим земљама забрањена (Radostits и сар., 2007; Blasco и сар., 2011). Такође ова вакцина је задржала резидуалну вируленцију за људе, доводи до побачаја ако се користи код гравидних животиња и резистентна је на стрептомицин који је лијек избора код лијечења бруцелозе (Ariza и сар., 2007). Постојала је комерцијална вакцина са инактивисаном *B. ovis* која се једно вријеме користила на Новом Зеланду, али је убрзо напуштена због некомплетног имунитета и реакција на мјесту апликације вакцине. Неки истраживачи су покушали да направе субцелуларну вакцину која носи фракције богате садржајем омотача *B. ovis* у липид-мурамил-дипептидном или нанопартикуларном адјувансу (Blasco и сар., 1993; De Costa Martins и сар., 2010). И ове, експерименталне вакцине су или пружале недовољну заштиту или биле прескупе за комерцијалну употребу. Такође са обећавајућим резултатима је експериментисано са *B. ovis* која има мутирани ген за синтезу липополисахарида (ЛПС) (Soler-Liorenс и сар., 2014). Слично томе, *B. ovis* са мутираним АВС транспортером инкапсулираним у алгинат је предложена као потенцијална вакцина (Silva и сар., 2015). Ипак, комерцијална употреба ове вакцине би захтјевала рјешавање проблема CO_2 зависности *B. ovis* (Perez-Etayo и сар., 2018) са накнадним преиспитивањем њених могућности. Даље је отежавајућа чињеница да овакви АВС транспортер-мутанти захтјевају инкапсулацију (Silva и сар., 2015). Лакше би било произвести Р мутанте С врста бруцела (такозване Р вакцине) а пошто би њима недостајао полисахарид О могао би се ријешити проблем разликовања вакцинисаних од природно инфицираних јединки присутан код Рев 1 вакцине. Ипак, овакве Р вакцине би ипак интерферирале приликом извођења *ELISA* које се користе за откривање класичних С врста бруцела (Barrio и сар., 2009; Ducrotoy и сар., 2016) због унакрсне реактивности са епитопима који су заједнички за С и Р- ЛПС или са *wzm/wzt* и сличним *B. melitensis* 115 спонтаним Р мутантима због присуства О-полисахарид прекурзора у цитоплазми (Godfroid и сар., 2000; Gonzales и сар., 2008; Perez-Sancho и сар., 2014). Постојао је и приступ при којем би се уклонио протеин БП26. Овај протеин код бруцела омогућује адхезију за ћелију домаћина интерагујући са протеинима екстрацелуларног матрикса. Нажалост, иако БП26-недостајућа Рев 1 вакцина пружа адекватну заштиту против *B. ovis*, БП26 *ELISA* тест нема адекватну дијагностичку осјетљивост (Munoz и сар., 2005; Grillo и сар., 2009). Недавно је тестирана Рев 1 вакцина која врши експресију зеленог флуоресцентног протеина ГФП (енг. **Green Fluorescent Protein**) као означеног антигена. Недостатак оваквог приступа је неопходност истовремене инјекције рекомбинантног ГФП-а као и бустер инјекције да би се код оваца добио дуготрајан имунолошки одговор (преко 9 мјесеци) који се региструје ЕЛИСА-ГФП ДИВА (енг. **Differentiating Infected from Vaccinated Animals**) тестом (Zabalza-Barangua и сар., 2019). Најновија истраживања рађена на мишевима гдје је коришћена Рев

1 вакцина са делецијом *wbkC* (*Brucella* липополисахарид ацетил- трансфераза), а којој је интродукована *wbdR* (*E. coli* ацетил-трансфераза) довела је код миша до стварања антитјела која је могуће разликовати од оних насталих природном инфекцијом дивљим сојевима. Код овог приступа се модификује структура епитопа С-ЛПС бруцела замјеном Н-формил перозамина О-ЛПС-а Н-ацетил перозамином. Овако конструисана РЕВ-1 вакцина компаративно је атенуирана и пружала је заштиту против *B. ovis*, па би у будућности могла бити кандидат за вакцинацију против епидидимитиса овнова (Aragon-Aranda и сар., 2019).

3. ЦИЉ И ЗАДАЦИ ИСПИТИВАЊА

Циљ ове докторске дисертације је утврђивање присуства *B. ovis*, постојање серолошког одговора природно инфицираних оваца и овнова, као и утврђивање присуства морфолошких промјена на тестисима и епидидимисима природно инфицираних овнова.

За остваривање постављених циљева дефинисани су задаци истраживања:

1. Утврђивање серопреваленције бруцелозе у некомерцијалном стаду оваца изазване врстом *B. ovis* примјеном индиректне *ELISA* методе
2. Утврђивање присуства ДНК *B. ovis* у узорцима хомогенизованих тестиса и епидидимиса примјеном Bruce-ladder multiplex PCR методе
3. Утврђивање присуства ДНК *B. ovis* у узорцима хомогенизованих тестиса и епидидимиса примјеном Real time PCR методе
4. Упоредна анализа резултата Bruce-ladder multiplex PCR и Real time PCR метода са различитим екстракционим протоколима
5. Упоредна анализа резултата молекуларних тестова са индиректним ЕЛИСА тестом
6. Утврђивање клиничких манифестација код овнова инфицираних *B. ovis*
7. Утврђивање макроскопских промјена на тестисима и епидидимисима овнова инфицираних *B. ovis*
8. Утврђивање микроскопских промјена на тестисима и епидидимисима овнова инфицираних *B. ovis*
9. Статистичка обрада резултата и процјена добијених резултата, на основу којих ће се одредити поузданост различитих метода за дијагностику инфекције оваца бактеријом *B. ovis*.

4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

4.1. Испитивани материјал

Истраживање је спроведено на фарми оваца расе *Ile de france* у близини Београда (Србија). Фарма је некомерцијалног типа, мужјаци су се држали одвојено од женки са изузетком неколико овнова у току сезоне парења. Сакупљен је материјал од 94 животиње, 33 мужјака и 61 женке. За серолошка испитивања, узорци крви животиња добијени су пункцијом *Venae jugularis*. Уз поштовање принципа асепсе крв је узимана у стерилне стаклене епрувете у количини од око 6 ml. Након спонтане коагулације, крв је центрифугирана на 2000 xg током 15 минута. Крвни серуми су затим одвајани у Eppendorf микротубе и до даље обраде чувани на температури од -20 °C.

4.2. Клинички преглед

За потребе израде ове докторске дисертације извршено је клиничко испитивање 19 одраслих овнова (*Ovis aries*), расе *Ile de france* који су били серолошки позитивни на присуство антитјела против *B. ovis*. Овнови који су били серолошки позитивни на присуство специфичних антитјела против *B. ovis* су клинички прегледани и том приликом палпацијом је утврђивано евентуално повећање обима тестиса и епидидимиса, њихова симетрија, конзистенција, покретљивост у скротуму, болност и темперираност.

4.3. Орхидектомија

После преоперативне припреме овнови су увођени у општу анестезију (Ксилазин 1-2 mg/kg i.m.). После увођења у општу анестезију и припреме оперативног поља, у линију реза сваког тестиса апликовано је 1 ml лидокаина, а након тога је извршена орхидектомија. После орхидектомије извршен је макроскопски преглед тестиса и епидидимиса. После макроскопског прегледа узорковано је ткиво тестиса и епидидимиса за хистопатолошка и молекуларно-генетичка испитивања. Постоперативно, као и следећег дана, животињама је апликован карпрофен у дози од 3 mg/kg s.c. за терапију бола.

Поред орхидектомије, узимани су препуцијални и вагинални брисеви серолошки позитивних животиња. Препуцијалним и вагиналним брисевима додат је фосфатни слани раствор PBS (Thermo Fisher Scientific, USA). Узорци су након тога замрзнути и чувани на температури од -20 °C до употребе. За спровођење ове студије добијено је одобрење од Етичког одбора за заштиту и добробит лабораторијских животиња при Факултету ветеринарске медицине Универзитета у Београду (Одобрење бр. 01-522 од 29.05. 2023).

4.4. ELISA

За извођење ове дијагностичке процедуре коришћен је индиректни *ELISA* комерцијални кит Ingezim Brucella ovis (Ingenaza, Spain). Антиген је фиксиран на чврстој подлози (полистиренска плоча). Коришћени антиген је пречишћени екстракт липополисахарида *B. ovis*. Узорци серума се додају у сваки базенчић. Након инкубације и испирања додаје се обиљежено моноклонско антитјело (конјуговано пероксидазом) специфично за имуноглобулине преживара. Уколико у испитиваном серуму постоје антитјела против бруцела, конјугат ће се везати за антитјело и обрнуто, ако антитјела нису присутна неће доћи до везивања. Након испирања плоче и елиминације невезаног материјала, детектује се присуство или одсуство обиљеженог конјугата додавањем супстрата који у присуству пероксидазе развија колориметријску реакцију.

Узорци серума су разређени у концентрацији 1/100. Раствор за испирање је прављен додавањем 40 ml концентрованог раствора у 960 ml дестиловане воде. Позитивна и негативна контрола су спремне за употребу и није их било потребно разређивати. Раствор конјугата је прављен непосредно прије употребе разређивањем са растварачем 1x у односу 1/100.

1. Сви реагенси (изузев конјугата) су прије употребе загријани на собној температури.
2. Додато је 100 µl позитивног и негативног контролног серума у за њих означене базенчиће. Затим су додати узорци (претходно разређени 1/100) у преостале базенчиће на плочи. Плоча је инкубирана један сат на 37 °C.
3. Плоча је затим испирана 4 пута прописаном процедуром.
4. Након тога додато је 100 µl конјугата (претходно разређеног 1/100) у сваки базенчић. Плоча је после тога инкубирана 30 минута на 37 °C.
5. Плоче су затим испиране 6 пута по прописаној процедури.
6. У следећем кораку додато је 100 µl супстрата у сваки базенчић. Плоча је инкубирана у мраку 10 минута на собној температури.
7. У следећем кораку у сваки базенчић додато је 100 µl стоп раствора.
8. Након 5 минута од додавања стоп раствора очитавана је оптичка густина свих базенчића помоћу спектрофотометра (Thermo Fisher Scientific, USA) на 450 nm .

Тест је сматран валидним ако је OD позитивне контроле већа од 0,7, а OD негативне контроле мања од 0,25.

Гранична вриједност за сврставање узорака у позитивне или негативне рачуната је по формули = OD позитивне контроле x 0,38

OD- оптичка густина (енг. **Optic Density**)

Сви узорци који су имали OD вриједности веће од граничне сматрани су позитивним, док су сви серуми са OD вриједностима мањим од граничне сматрани негативним. Према произвођачу, вриједности дијагностичке осјетљивости и специфичности коришћеног *ELISA* кита биле су 99% и 98%.

4.5. Молекуларно-генетичка испитивања

Репродуктивни органи (тестиси и епидидимиси) су иницијално уситњени уз помоћ стерилних маказица и пинцете а након тога су обрађивани у стомахеру. Органи су хомогенизовани у апарату Bag Mixer 400 P (Interscience, France), јачине 8 удараца/секунди. Коришћена су разређења органа са физиолошким раствором у размјери 1:2. Узорци су хомогенизовани у кесама са филтером порозности < 250 µm (Bag Filter P) запремине 400 ml (Interscience, France). Тако хомогенизован материјал је пакован у Eppendorf микротубе и чуван на температури од -20 °C до употребе.

4.5.1. Екстракција ДНК *B. ovis* из репродуктивних органа и крви оваца QIAamp Cador Pathogen mini китом

ДНК из хомогенизованих органа екстрахована је помоћу комерцијалног кита за екстракцију QIAamp Cador Pathogen mini kit (Qiagen, Germany) по упутству произвођача. Екстрахована ДНК је пакована у Eppendorf микротубе и чувана на -20 °C до употребе. Укупно је овим китом обрађено 80 узорака: 38 узорака хомогенизованих тестиса и епидидимиса поријеклом од 19 *ELISA* позитивних овнова, 19 узорака пуне крви *ELISA* позитивних овнова, 19 препуцијалних брисева *ELISA* позитивних овнова, два узорка пуне крви *ELISA* позитивних женских животиња и два узорка вагиналног бриса тих истих *ELISA* позитивних женских животиња.

Поступак екстракције ДНК из хомогенизованих органа:

1. У микроепрувету запремине 1,5 ml сипано је 20 µl протеиназе К.
2. Затим је додато 200 µl хомогенизованих узорака.
3. У следећем кораку је додато 100 µl Buffer VXL-а. Затворен је поклопац и садржај је измијешан на вибрационој мјешалици.
4. Садржај је затим инкубиран 15 минута на собној температури.

5. После је садржај кратко центрифугован да би се одстраниле капљице из унутрашњости поклопца.
6. Затим је додато 350 μ l Buffer ACB-a, затворен је поклопац и садржај је измјешан на вибрационој мјешалици.
7. Садржај је поново накратко центрифугован да би се одстраниле капљице из унутрашњости поклопца.
8. У следећем кораку лизат је пребачен у QIAamp мини тубу смјештену у тубу за колекцију запремине 2 ml. Затворен је поклопац и садржај је центрифугован на 6000 xg 1 минут. Затим је QIAamp мини туба пребачена у чисту тубу за колекцију запремине 2 ml, а одбачена је претходна колекцијска мини туба са филтратом.
9. У следећем кораку у QIAamp мини тубу додато је 600 μ l Buffer-a AW1 без влажења обода. Затворен је поклопац и садржај је центрифугован на 6000 xg 1 минут. Затим је QIAamp мини туба пребачена у чисту тубу за колекцију запремине 2 ml, а одбачена је претходна колекцијска мини туба са филтратом .
10. Затим је у QIAamp мини тубу додато 600 μ l Buffer-a AW2 без влажења обода. Затворен је поклопац и садржај је центрифугован на 6000 xg 1 минут. Затим је QIAamp мини туба пребачена у чисту тубу за колекцију запремине 2 ml, а одбачена је претходна колекцијска мини туба са филтратом.
11. Садржај је затим центрифугован при максималној брзини од 13000 xg два минута да би се осушила мембрана.
12. У следећем кораку QIAamp мини туба је пребачена у чисту Eppendorf мини тубу запремине 1,5 ml а одбачена је колекцијска мини туба са филтратом. Затим је додато 150 μ l Buffer-a AVE у центар мембране. Након затварања поклопца садржај је инкубиран на собној температури 1 минут. Садржај је у завршном кораку центрифугован 1 минут при максималној брзини од 13000 xg,
13. QIAamp мини тубе су одбачене, а екстрахована ДНК у Eppendorf мини тубама је замрзнута на -20 °C и чувана до употребе.

4.5.2. Екстракција ДНК *B. ovis* из репродуктивних органа и крви оваца GeneJET Genomic DNA Purification китом

ДНК из хомогенизованих органа екстрахована је помоћу комерцијалног кита за екстракцију GeneJET Genomic DNA Purification kit (Thermo Fisher Scientific, USA) по

упутству произвођача. Екстрахована ДНК је пакована у Eppendorf микротубе и чувана на -20 °C до употребе. Укупно је овим китом обрађено 50 узорака: 38 узорака хомогенизованих тестиса и епидидимиса поријеклом од 19 *ELISA* позитивних овнова, 6 узорака пуне крви *ELISA* позитивних животиња (4 мужјака и двије женке) и 6 узорака препуцијалног/вагиналног бриса тих истих *ELISA* позитивних животиња (4 мужјака и двије женке).

Поступак екстракције ДНК из хомогенизованих органа:

1. У микроепрувету запремине 1,5 ml сипано је 200 μ l претходно хомогенизованог ткива репродуктивних органа овнова и ресуспендовано у 180 μ l раствора за дигестију. Додато је 20 μ l протеиназе К и добро измјешано на вибрационој мјешалици (Thermo Fisher Scientific, USA).
2. Мјешавина је инкубирана током 3h на 56 °C уз мјешање, односно до потпуног нестанка партикула. Инкубација је изведена у апарату ThermoShaker TS-100 (Biosan, Latvia).
3. Додато је 20 μ l РНК-азе, промјешано на вибрационој мјешалици, и инкубирано 10 минута на собној температури.
4. У мјешавину је додато 200 μ l лизирајућег раствора, а потом добро измјешано на вибрационој мјешалици током 15 секунди до потпуне хомогенизације мјешавине.
5. Затим је додато 400 μ l 50% етил-алкохола и хомогенизовано.
6. У следећем кораку мјешавина је пренијета у GeneJET Genomic DNA Purification колону (Thermo Fisher Scientific, USA) постављену у сабирну тубу. Колона је центрифугирана 1 минут на 6000 xg. Сабирна туба са садржајем је одбачена, а колона постављена у нову сабирну тубу запремине 2 ml.
7. Додато је 500 μ l пуфера за испирање са додатим етил-алкохолом и центрифугирано 1 минут на 8000 xg. Филтрат је одбачен, а колона враћена у исту сабирну тубу.
8. Додато је 500 μ l пуфера за испирање II са додатим етил-алкохолом и центрифугирано 3 минута на 13000 xg. Сабирна туба са садржајем је одбачена, а колона пренијета у стерилну микротубу запремине 1,5 ml.
9. У завршном кораку у центар колоне је додато 200 μ l пуфера за елуцију и након 2 минута инкубације на собној температури центрифугирана је 1 минут на 8000 xg.
10. Колоне су одбачене, а екстрахована ДНК замрзнута на -20 °C и чувана до употребе.

4.5.3. Bruce-ladder multiplex PCR

Узорци екстраховане ДНК из хомогенизованих органа су тестирани Bruce-ladder multiplex PCR методом коју су описали García-Yoldi и сар., 2006. године. Након прелиминарних испитивања, протокол је модификован (Stević и сар. 2017) тако што је у PCR мјешавину уместо 1 μ l ДНК додавано 10 μ l екстраховане ДНК, а количина укупне PCR мјешавине је износила 50 μ l. Прајмери су коришћени у коначној концентрацији у PCR смјеси од 0,25 pmol/ μ l. Коначна концентрација dNTP (Thermo Fisher Scientific, USA) износила је 0,4 mM. Таq полимераза (Thermo Fisher Scientific, USA) је додавана у количини од 0,5 μ l. Програм на ком је извођена PCR реакција је обухватао: иницијалну денатурацију на температури од 95 °C, 7 минута праћену са 25 циклуса денатурације ДНК на температури 95 °C, 35 секунди, хибридизацију прајмера на 64 °C, 45 секунди и елонгацију ДНК ланаца на 72 °C, 180 секунди, а затим финална елонгација на 72 °C, 6 минута. Визуелизација добијених PCR продуката, вршена је примјеном методе хоризонталне електрофорезе у агарозном гелу концентрације 1% (Serva, Germany) са додатком боје GreenSafe Premium (NZYtech, Portugal) у финалној концентрацији од 1%. Визуелизација трака вршена је на апарату са УВ свјетлом и одређена је дужина умножених секвенци, на основу пређеног пута између две електроде. Коришћени су следећи прајмери: ВМЕI0998f, ВМЕI0997r, ВМЕI0535f, ВМЕI0536r, ВМЕII0843f, ВМЕII0844r, ВМЕI1436f, ВМЕI1435r, ВМЕII0428f, ВМЕII0428r, BR0953f, BR0953r, ВМЕI0752f, ВМЕI0752r, ВМЕII0987f, ВМЕII0987r (Табела 1).

Као позитивна контрола коришћена је ДНК раније изоловане и потврђене *Brucella melitensis* и *Brucella ovis* Reo 198 (CO₂ независни сој) из колекције Катедре за заразне болести животиња и болести пчела, а као ДНК маркер примјењиван је Mass ruler ДНК 100 bp ladder (Thermo Fisher Scientific, USA). Позитивним је сматрана појава пет (одсуство трака дужине 1682 бп и 272 бп) трака следећих дужина: 1071, 794, 587, 450 и 152 бп.

Tabela 1 . Прајмери коришћени у Bruce-ladder multipleks PCR методи.

Прајмери	Секвенца 5' – 3'	Циљни ген ДНК
ВМЕI0998f	ATC STA TTG CCC CGA TAA GG	Гликозилтрансфераза
ВМЕI0997r	GCT TCG CAT TTT CAC TGT AGC	Ген wbo A
ВМЕI0535f	GCG CAT TCT TCG GTT ATG AA	Имунодоминантни антиген
ВМЕI0536r	CGC AGG CGA AAA CAG	Ген bp26

	CTA TAA	
ВМЕП0843f	TTT ACA CAG GCA ATC CAG CA	Протеин спољашње мембране
ВМЕП0844r	GCG TCC AGT TGT TGT TGA TG	Ген omp31
ВМЕП1436f	ACG CAG ACG ACC TTC GGT AT	Полисахаридна деацетилаза
ВМЕП1435r	TTT ATC CAT CGC CCT GTC AC	Полисахаридна деацетилаза
ВМЕП0428f	GCC GCT ATT ATG TGG ACT GG	Ген за катаболизам еритритола
ВМЕП0428r	AAT GAC TTC ACG GTC GTT CG	Ген ery C (деритрулоза-1- фосфодехидрогеназа)
BR0953f	GGA ACA CTA CGC CAC CTT GT	Протеин који се везује за ABC носач
BR0953r	GAT GGA GCA AAC GCT GAA G	Протеин који се везује за ABC носач
ВМЕП0752f	CAG GCA AAC CCT CAG AAG C	Рибозомални протеин S12
ВМЕП0752r	GAT GTG GTA ACG CAC ACC AA	Ген rps L
ВМЕП0987f	CGC AGA CAG TGA CCA TCA AA	Регулатор транскрипције
ВМЕП0987r	GTA TTC AGC CCC CGT TAC CT	CRP фамилија

4.5. 4. Real-time PCR

Real-time PCR метода је рађена на истим екстрахованим нуклеинским киселинама као и Bruce-ladder multiplex PCR. Метода је рађена коришћењем комерцијалног кита Luna® Universal qPCR Master Mix (NEB, USA). Реакциона смјеша се састојала од 2,5 µl изоловане ДНК, 5,5 µl Master Mix-а, по 0,44 µl прајмера (10 µM), 0,22 µl пробе (10 µM) и 3,4 µl RNase free воде за PCR, по протоколу који су описали Hinić и сар. 2008. Циљана секвенца је IS711 а коришћени су прајмери: forward 5'-GCTTGAAGCTTGCGGACAGT-3', reverse 5'-GGCCTACCGCTGCGAAT-3', Probe 5'-FAM-AAGCCAACACCCGGCCATTATGGT-TAMRA - 3'. Амплификација IS711 дјела генома вршена је коришћењем Quant Studio 3, Applied Biosystems (USA) са следећим температурним профилем: почетна денатурација на 95 °C 1 минут, 40 циклуса денатурације на 95 °C током 15 секунди и хибридизације/елонгације на 60 °C током 30 секунди. Сви узорци са Ct вредношћу од 35 и нижом сматрани су позитивним.

4.6. Израда хистопатолошких препарата

За хистопатолошки преглед узорци ткива су након узорковања фиксирани у неутралном пуферизованом 10% формалину у трајању од 72 сата, у односу фиксатива и ткива од минимум 10:1. После фиксације, узорци су обрађени у аутоматском ткивном процесору KD-TS3D (Kedee, PR China) (дехидратација кроз серију алкохола, просветљавање у ксилолу, импрегнација парафином) и укалупљени у парафинске блокове. Парафински калупи су на микротому Leica RM 2235 (Leica Biosystems, USA) сјечени на исјечке дебљине 3-5 µm, монтирани на предметна стакла и осушени на 56°C током 24 сата у термостату Binder E/B28 (Binder, Germany).

После депарафинисања у ксилолу и рехидрације кроз серију алкохола (апсолутни алкохол, 96%, 70%) ткивни исјечци су бојени хематоксилином и еозином. Ткивни исјечци тестиса и епидидимиса су након депарафинизације и рехидрације бојени у хематоксилину у трајању од 5 минута. Након диференцирања у киселом алкохолу бојени су у еозину током 3 минута. Између ових бојења и диференцирања, исјечци су испирани у води. По дехидрацији у серији алкохола растуће концентрације и третмана ксилолом, ткивни исјечци су монтирани и покривени стакленим љуспицама и затим анализирани. Резултати хистохемијских бојења су анализирани на светлосном микроскопу BX51 (Olympus Optical, Japan) и фотографисани дигиталном камером Olympus Color View III®.

4.7. Статистичка обрада резултата

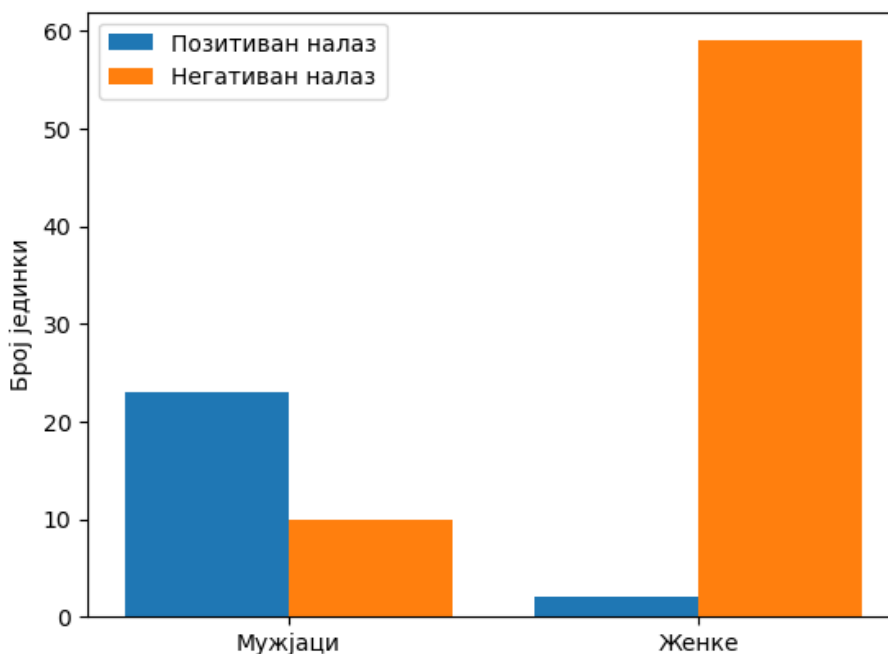
Статистичке анализе су рађене коришћењем статистичког софтверског пакета Microsoft Office Excel 2016 (XLSTA за Excel). Добијени резултати су оцјењивани од стране батерија статистичких тестова, односно хи-квадратног теста (χ^2 -тест) и Фишеровог егзактног теста,

као и Cohen's kappa коефицијента асоцијације. За *ELISA* тест израчунате су вриједности коефицијента асоцијације као и позитивне и негативне предиктивне вриједности теста, затим односи вјероватноћа добијања позитивних и негативних резултата, одређене су стопе лажно позитивних и лажно негативних резултата. Анализе хистопатолошких промјена рађене су у програмском језику Python, примјеном метода кластер анализе (мултикритеријална агломеративна хијерархијска метода и нехијерархијска метода рашчлањивања кластера). Процјена повезаности фактора ризика као што су старост и пол животиња са епизоотиолошким индикаторима урађена је примјеном параметријских и непараметријских тестова као што су Man-Whitney U, Shapiro-Wilk тест, Wilcoxon-ов тест и ANOVA тест. Независни и зависни т-тест рађени су у Python `scipy.stats` библиотеци. Tukey тест је рађен у Python `statsmodels.stats.multicomp` библиотеци. Модели машинског учења логистичка регресија, *Random Forest* класификатор и кластеровање рађени су у Python `scikit-learn` библиотеци.

5. РЕЗУЛТАТИ

5.1. ELISA

Индиректним *ELISA* тестом Ingezim *Brucella ovis* испитана су укупно 94 узорка серума, 33 од мужјака и 61 од женки. Од 33 узорка серума овнова, 23 су била позитивна (69,7%). Од 61 узорка серума оваца, 2 (3,3%) су била позитивна. Резултати ЕЛИСА теста приказани су у графикону бр 1.



Графикон 1. Графички приказ резултата добијених индиректним ЕЛИСА тестом

Укупна привидна серопреваленција *Brucella* инфекције била је 26,6% ограничена са интервалом поузданости 95% (CI) од 17,7% и 35,5%, а права преваленција 25,4% ограничена са 95% (CI) од 16,6% и 34,2%. Статистичком анализом утврђена је позитивна предиктивна вриједност теста која је износила 95,83%, док је вриједност негативне предиктивне вриједности износила 98,57%. Вриједности односа позитивне вјероватноће и односа негативне вјероватноће износили су 49,50 и 0,01. Карактеристике индиректног *ELISA* кита приказане су у табели 2.

Табела 2. Карактеристике Ingezim Brucella ovis *ELISA* теста

Статистика	Вриједност	Доња граница (95%)	Горња граница (95%)
Тачна класификација	98,25%	95,61%	100,00%
Погрешна класификација	1,75%	0,000%	4,39%
Осјетљивост	99,00%	96,99%	1,00%
Специфичност	98,00%	95,17%	1,00%
Стварно +	23		
Лажно +	1		
Стварно -	69		
Лажно -	1		
Инфицирани	23		
Стопа лажно позитивних	2,00%	0,00%	4,83%
Стопа лажно негативних	1,00%	0,00%	48,87%
Привидна преваленција	26,60%	17,66%	35,53%
Права преваленција	25,36%	16,56%	34,15%
PPV (Позитивна предиктивна вриједност)	95,83%	91,79%	100,00%
NPV (Негативна предиктивна вриједност)	98,57%	96,17%	100,00%
LR+ (Однос позитивне вјероватноће)	49,50	4,63	528,96%
LR- (Однос негативне вјероватноће)	0,01	-0,01	0,03
Релативни ризик	67,08	61,43	73,26
Однос вјероватноћа	1587,00	95,38	26.405,94

На основу статистичке анализе података добијена је таблица контингенције *ELISA* теста приказана у табели 3.

Табела 3. Таблица контингенције Ingezim Brucella ovis *ELISA* теста

	ELISA +	ELISA -
Стварно +	23	1
Стварно -	1	69

Статистичка обрада добијених резултата показала је да мужјаци имају 138 пута већу шансу да оболе у односу на женке (Odds ratio = 138) уз релативни ризик од 42,52 (табела 4).

Табела 4. Резултати статистичке обраде Ingezim Brucella ovis *ELISA* теста.

	D+	D-
М	23,00	10,00
Ж	1,000	60,000
Однос вјероватноће (odds ratio)	138,00	
95% CI	16,71	1139,53
z статистика	4,57	
p- vrijednost	< 0,001	
SE	1,08	
OP	42,52	
* $\chi^2 =$	52,17	
DF =	1	
Ниво значајности p =	< 0,0001	
Коефицијент контингенције	0,60	
Коефицијент контингенције C_{max}	0,71	
Коефицијент континенције C_{adj}	0,84	
w индекс	0,74	
ϕ коефицијент	0,74	
RR (Релативни ризик)	42,52	
95% CI	6,01	300,88
SE	0,9984	

Табела 5. Chi-квadratни тест повезаности пола и позитивног *ELISA* налаза

Chi-квadratни тест (добијена вриједност)	48,651
Chi-квadratни тест (критична вриједност)	3,841
DF (степен слободе)	1
p-вриједност (двострана)	<0,0001
alpha	0,05

Примјеном Chi-квadratног теста (Табела 5) установљена је статистички значајна разлика између броја *ELISA* позитивних мужјака и женки ($p < 0,0001$). Слични резултати су добијени и Фишеровим егзактним тестом (Табела 6).

Табела 6. Фишеров егзактни тест повезаности пола и позитивног *ELISA* налаза

р- вриједност (двострана)	<0,0001
alpha	0,05

5.2. Резултати добијени примјеном Bruce-ladder multiplex PCR методе

5.2.1. Резултати добијени након екстракције ДНК QIAamp Cador Pathogen mini китом

Свих 38 узорака хомогенизованих тестиса и епидидимиса код којих је ДНК екстрахована QIAamp Cador Pathogen mini китом испитани су Bruce-ladder multiplex PCR методом. Добијено је укупно 6 позитивних узорака (15,79 %). Од шест позитивних узорака два (5,26%) су била веома слабо позитивна.

Ниједан од 19 испитаних узорака пуне крви и 19 испитаних препуцијалних брисева овнова код којих је ДНК екстрахована QIAamp Cador Pathogen mini китом није био позитиван.

Ниједан од два испитана узорка пуне крви и два испитана узорка вагиналних брисева оваца код којих је ДНК екстрахован QIAamp Cador Pathogen mini китом није био позитиван. У свим испитивањима код позитивне контроле *B. melitenis* појавило се 6 ампликона 1682, 1071, 794, 587, 450 и 152 бп, док се код позитивне контроле *B. ovis Reo 198* појавило 5 ампликона 1071, 794, 587, 450 и 152 бп.

5.2.2. Резултати добијени након екстракције ДНК GeneJET Genomic DNA Purification китом

Свих 38 узорака хомогенизованих тестиса и епидидимиса код којих је ДНК екстрахована GeneJET Genomic DNA Purification китом испитани су Bruce-ladder multiplex PCR методом. Добијено је укупно четири позитивна узорка (10,53 %). Сва четири позитивна узорка су била веома слабо позитивна.

Ниједан од 6 испитаних узорака пуне крви код којих је ДНК екстрахована GeneJET Genomic DNA Purification китом није био позитиван. Ниједан од 6 испитаних узорака препуцијалних и вагиналних брисева код којих је ДНК екстрахована GeneJET Genomic DNA Purification китом није био позитиван. У свим испитивањима код позитивне контроле *B. melitenis* појавило се 6 ампликона 1682, 1071, 794, 587, 450 и 152 бп, док се код позитивне контроле *B. ovis Reo 198* појавило 5 ампликона 1071, 794, 587, 450 и 152 бп.

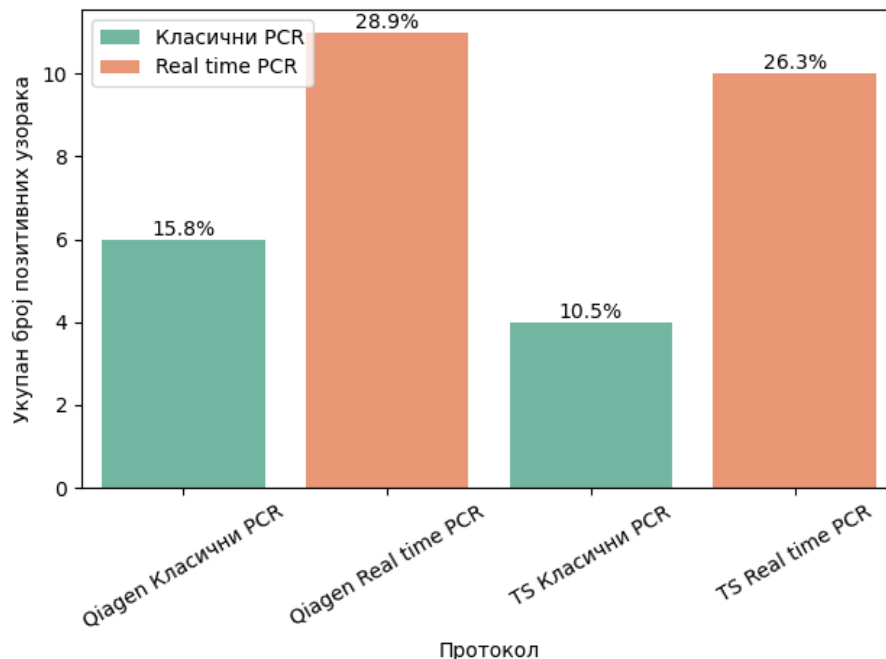
5.3. Резултати добијени примјеном Real time PCR методе

5.3.1. Резултати добијени након екстракције ДНК QIAamp Cador Pathogen mini китом

Укупно је Real time PCR методом испитано 80 узорака код којих је екстракција нуклеинске киселине вршена QIAamp Cador Pathogen mini китом. Од укупно 38 узорака ткива тестиса и епидидимиса добијено је укупно 11 (28,95%) позитивних узорака. Ниједан од 19 испитаних узорака пуне крви и 19 препуцијалних брисева овнова код којих је ДНК екстрахована QIAamp Cador Pathogen mini китом није био позитиван. Такође, ниједан од два испитана узорка пуне крви и два испитана узорка вагиналних брисева оваца није био позитиван.

5.3.2. Резултати добијени након екстракције ДНК GeneJET Genomic DNA Purification китом

Укупно је Real time PCR методом испитано 50 узорака код којих је екстракција нуклеинске киселине вршена GeneJET Genomic DNA Purification китом. Од укупно 38 узорака ткива тестиса и епидидимиса добијено је укупно 10 (26,32%) позитивних узорака. Ниједан од 6 испитаних узорака пуне крви (4 мужјака и двије женке) и 6 препуцијалних/вагиналних брисева (4 мужјака и двије женке) код којих је ДНК екстрахована GeneJET Genomic DNA Purification китом није био позитиван.



Графикон 2. Укупан број и проценат позитивних резултата добијених различитим PCR протоколима на ткивима тестиса и епидидимиса серолошки позитивних овнова

5.4. Упоредни резултати Bruce-ladder multiplex PCR и Real time PCR метода са различитим екстракционим протоколима

Код класичне PCR методе сва четири позитивна узорка ткива тестиса и епидидимиса код којих је нуклеинска киселина екстрахована GeneJET Genomic DNA Purification китом била су позитивна и код екстракције са QIAamp Cador Pathogen mini китом, односно класични PCR протоколи су имали конкорданцију 94,74% и Cohen's kappa вриједност од 0,771 (95% CI 0,614 – 0,929).

Табела 7. Таблица контингенције резултата добијених класичном PCR методом на узорцима ткива тестиса и епидидимиса након екстракције нуклеинске киселине QIAamp Cador Pathogen mini и GeneJET Genomic DNA Purification китом.

		Qiagen		Укупно
		Тест +	Тест -	
Thermo Scientific	Тест +	4	0	4
	Тест -	2	32	34
Укупно		6	32	38

Real time PCR протоколи су имали знатно лошији степен конкорданције од 71,05% са Cohen's kappa вриједношћу од 0,277 (95% CI 0,093 – 0,461).

Табела 8. Таблица контингенције резултата добијених Real time PCR методом на узорцима ткива тестиса и епидидимиса након екстракције нуклеинске киселине QIAamp Cadog Pathogen mini и GeneJET Genomic DNA Purification китом.

		Qiagen		Укупно
		Тест +	Тест -	
Thermo Scientific	Тест +	5	5	10
	Тест -	6	22	28
	Укупно	11	27	38

Код класичних PCR протокола сви позитивни овнови су имали позитивне резултате само код једног од два збирна узорка ткива тестиса и епидидимиса. Код Real time PCR протокола ован бр. 12 је имао оба позитивна узорка код екстракције QIAamp Cadog Pathogen mini китом, док је код екстракције GeneJET Genomic DNA Purification китом само ован бр. 1 имао оба позитивна збирна узорка. Само четири узорка репродуктивног ткива су имали позитивне резултате у сва четири PCR протокола.

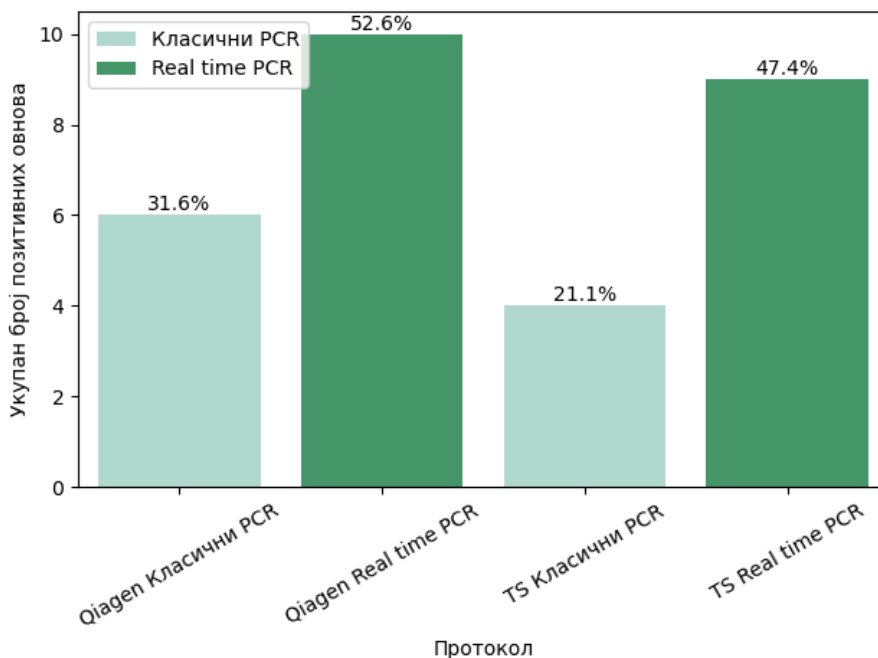
Табела 9. Упоредни резултати различитих PCR протокола у доказивању присуства нуклеинске киселине *B. ovis* на збирним узорцима ткива тестиса и епидидимиса *ELISA* позитивних овнова

Ован	Qiagen класични PCR	Thermo Scientific класични PCR	Qiagen Real-Time PCR	Thermo Scientific Real-Time PCR
1	-	-	-	++
2	+	+	+	+
3	-	-	-	-
4	+	+	+	+
5	-	-	+	-
6	-	-	-	-
7	-	-	+	-
8	-	-	+	-
9	-	-	-	-
10	-	-	-	-
11	-	-	-	-
12	+	+	++	+
13	+	+	+	+
14	-	-	+	-
15	-	-	+	-
16	+	-	-	+
17	-	-	-	+
18	+	-	+	+
19	-	-	-	+

Легенда: - Негативан налаз, + Позитиван на једном узорку, ++ Позитиван на оба узорка

Ако се посматра број овнова који су имали позитиван резултат код било којег од два збирна узорка репродуктивног ткива онда је Bruce-ladder multiplex PCR код екстракције нуклеинске киселине са QIAamp Cadon Pathogen mini китом имао осјетљивост од 31,6% (6/19). Код екстракције са GeneJET Genomic DNA Purification китом класични PCR је имао осјетљивост од 21,1% (4/19). Код Real time PCR протокола гдје је екстракција нуклеинске

киселине рађена QIAamp Cador Pathogen mini китом било је укупно 52,6% (10/19) овнова који су имали позитиван резултат барем на једном збирном узорку ткива, док је код екстракције GeneJET Genomic DNA Purification китом укупно било 47,4% (9/19) позитивних овнова (Графикон 3).



Графикон 3. Укупан број и проценат овнова позитивних на присуство нуклеинске киселине *B. ovnis* добијених различитим PCR протоколима на збирним узорцима ткива тестиса и епидидимиса.

5.5. Упоредни резултати добијени QIAamp Cador Pathogen mini и GeneJET Genomic DNA Purification протоколима екстракције различитим PCR методама

Код екстракције нуклеинске киселине QIAamp Cador Pathogen mini китом класичном PCR методом добијено је укупно 6 позитивних резултата док је Real time PCR методом добијено 11 позитивних резултата (Табела 10). Само у једном случају (ован бр. 16) темплат који је био позитиван класичним PCR-ом није био позитиван на Real time PCR-у. За ову методу екстракције добијена је Cohen's карпа вриједност од 0,482 (95% CI 0,306-0,659) уз степен конкорданције од 81,58%.

Табела 10. Таблица контингенције резултата добијених Bruce-ladder multiplex PCR методом и Real time PCR методом на узорцима ткива тестиса и епидидимиса након екстракције нуклеинске киселине QIAamp Cador Pathogen mini китом.

		Qiagen класични PCR		
		Тест +	Тест -	Укупно
Qiagen Real time PCR	Тест +	5	6	11
	Тест -	1	26	27
	Укупно	6	32	38

Код екстракције нуклеинске киселине GeneJET Genomic DNA Purification китом класичним PCR-ом добијено је укупно 4 позитивна резултата док је Real time PCR-ом добијено 10 позитивних резултата (Табела 11). Сви екстракти који су имали позитиван налаз класичним PCR-ом били су позитивни и на Real time PCR-у. За ову методу екстракције добијена је Cohen's карпа вриједност од 0,496 (95% CI 0,307-0,685) уз степен конкорданције од 84,21%.

Табела 11. Таблица контингенције резултата добијених Bruce-ladder multiplex PCR методом и Real time PCR методом на узорцима ткива тестиса и епидидимиса након екстракције нуклеинске киселине GeneJET Genomic DNA Purification китом.

		Thermo Scientific класични PCR		
		Тест +	Тест -	Укупно
Thermo Scientific Real time PCR	Тест +	4	6	10
	Тест -	0	28	28
	Укупно	4	34	38

5.6. Резултати клиничких испитивања

Адспекцијом је запажена асиметрија скротума код 63,16% (12/19) овнова (Слика 1).



Слика 1. Асиметрија скротума

Палпацијом је код 63,16% (12/19) овнова уочено унилатерално увећање репа епидидимиса, код 31,58% (6/19) увећање главе епидидимиса, док је болност констатована у 21,05% (4/19) случајева, а тестиси и епидидимиси су били покретни у скротуму код 57,89% (11/19) овнова, док је чвршћа конзистенција тестиса и епидидимиса констатована код 47,37% (9/19) овнова.

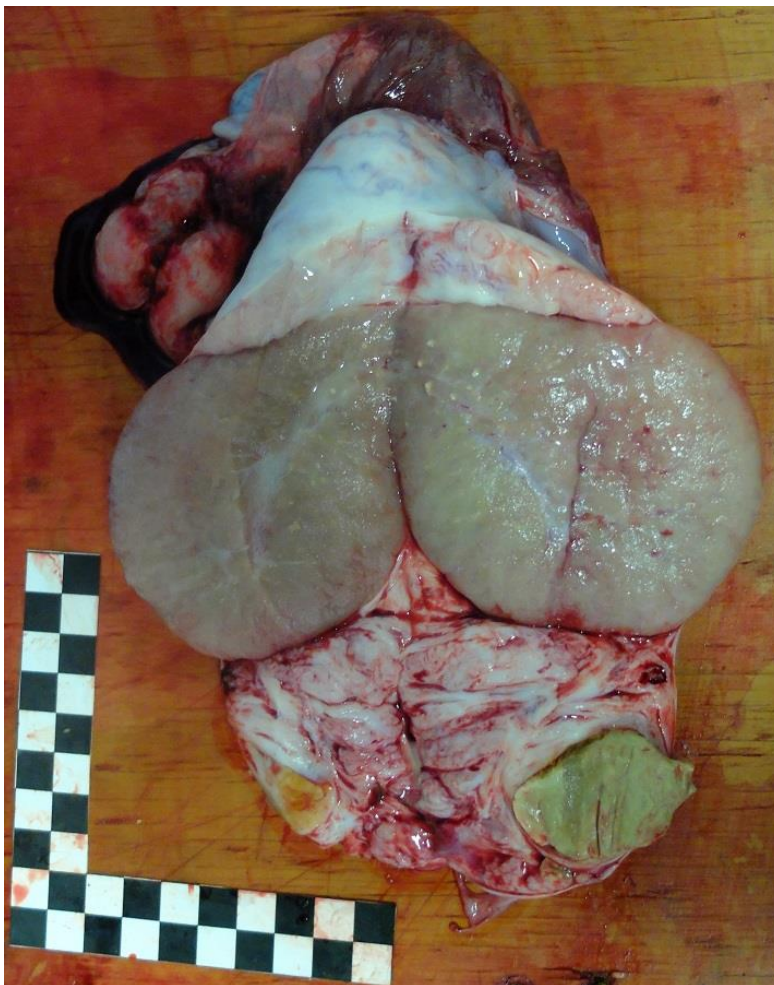
5.7. Резултати макроскопских испитивања

На глави епидидимиса спермоциста је уочена код 5,26% (1/19) овнова (Слика 2), некротичне промјене запажене су код 15,79% (3/19) овнова (Слика 3), хипертрофија главе

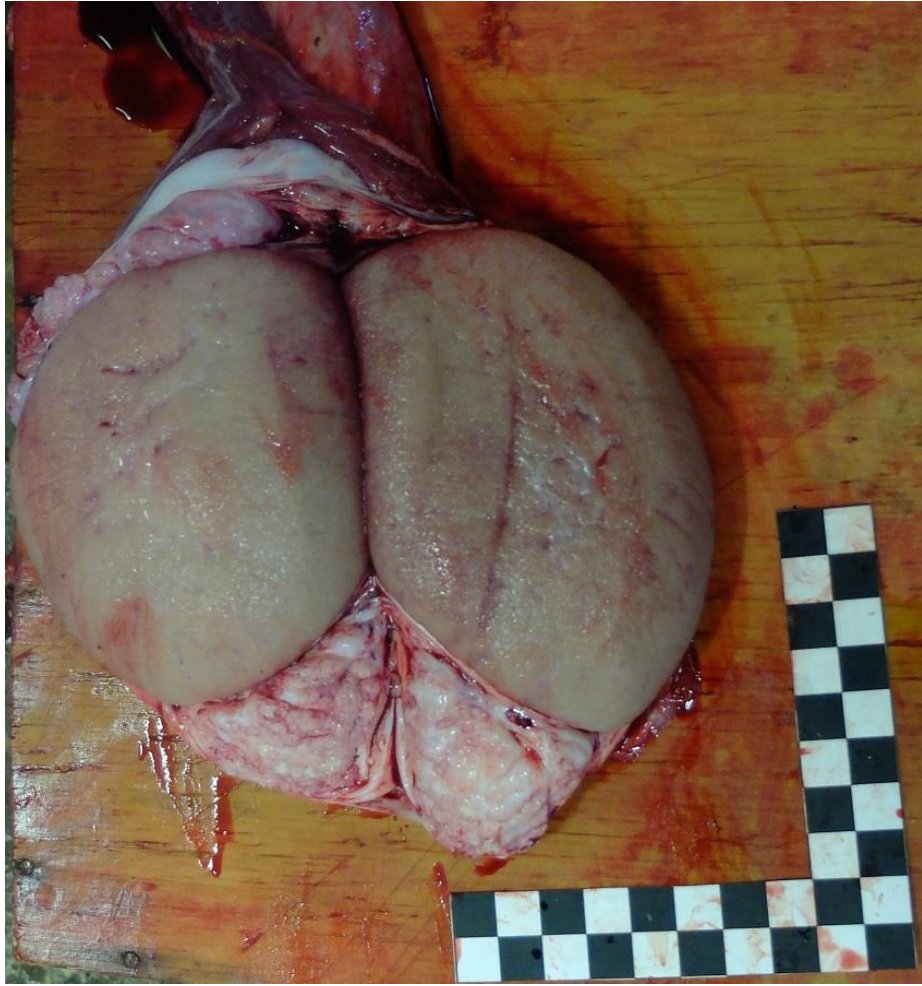
и репа епидидимиса код 31,58% (6/19) (Слика 4), док је фиброза епидидимиса макроскопски била изражена код 15,79% (3/19) овнова (Слика 5).



Слика 2. Хипертрофија и спермоциста у репу епидидимиса, хипертрофија главе епидидимиса



Слика 3. Некроза у репу епидидимиса и атрофија тестиса



Слика 4. Хипертрофија репа епидидимиса



Слика 5. Фиброза главе и репа епидидимиса и атрофија и фиброза тестиса

Фиброза тестиса макроскопски је запажена код 36,84% (7/19) овнова (Слика 5), калцификација код 15,79% (3/19) (Слика 6), а атрофија код 21,05% (4/19) овнова (Слика 6).



Слика 6. Хипертрофија главе и репа епидидимиса, атрофија и калцификација тестиса

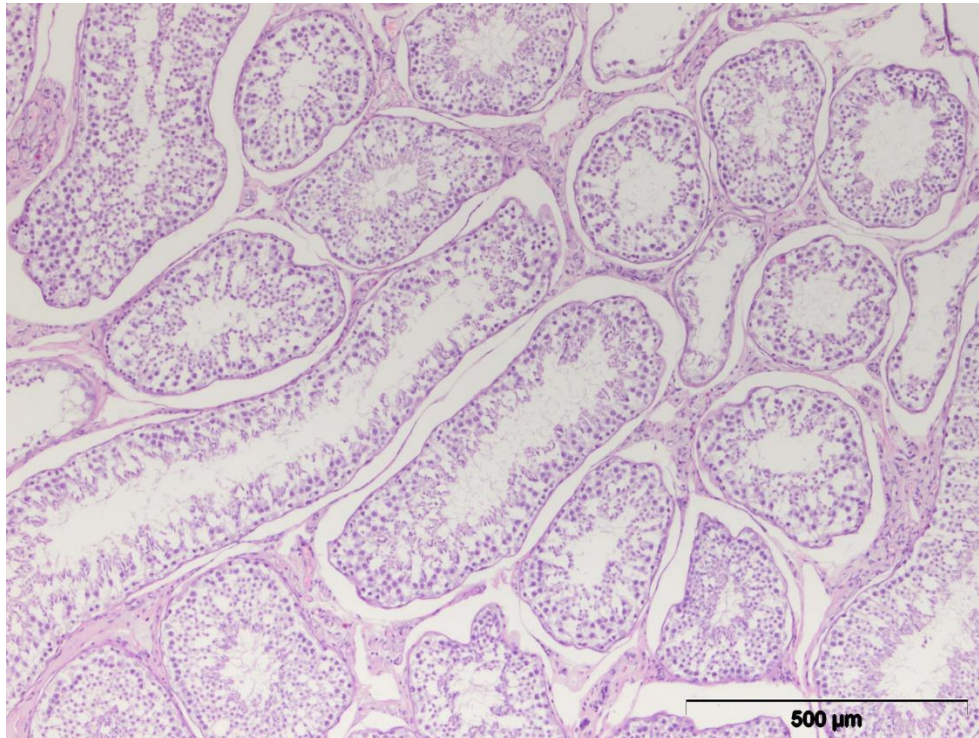
5.8. Резултати хистопатолошких испитивања

Хистопатолошки су констатоване промјене на тестисима и епидидимисима код свих испитаних животиња (19/19).

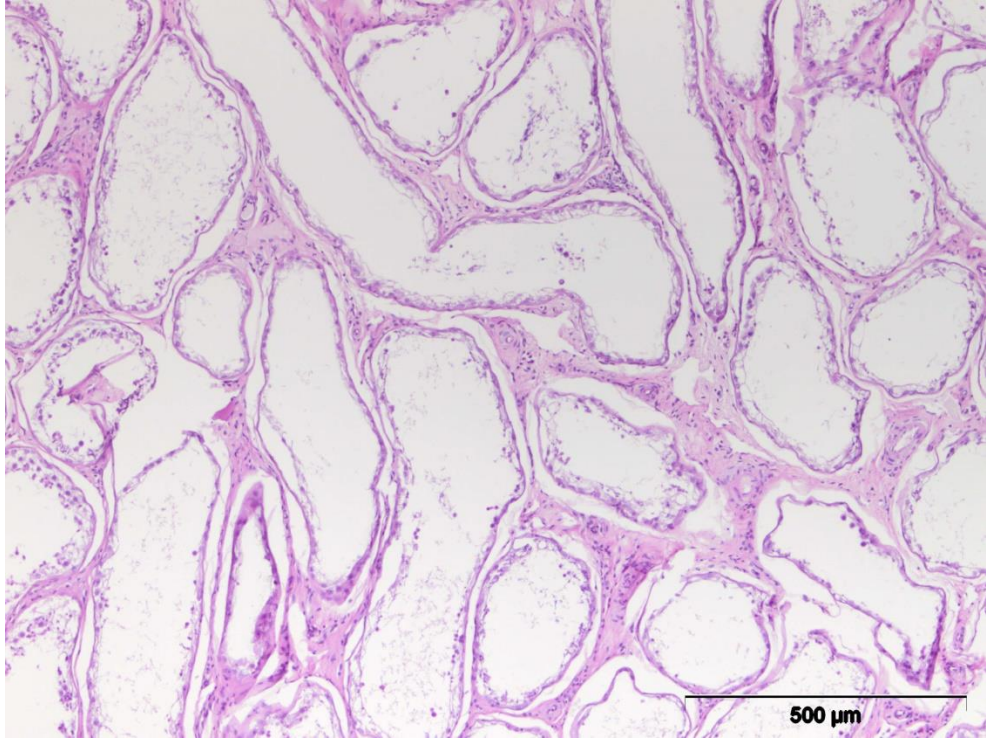
Дегенерација тестиса је у различитом степену уочена код свих испитаних животиња. Дегенеративне промене на тестисима су се карактерисале вакуолизацијом Сертолијевих ћелија, ексфолијацијом герминативних ћелија и смањивањем степена сперматогенезе која се манифестовала изостајањем матурације сперматозоида, апоптозом и некрозом сперматиде као и формирањем мултинуклеарних ћелија које се уочавају у лумену сјемених каналића (Слика 7). Базална мембрана сјемених каналића је често задебљала и таласастог изгледа. У израженом степену дегенеративних промјена сјемени

каналићи су готово празни са појединачним дегенерисалим Сертолијевим ћелијама (Слика 8).

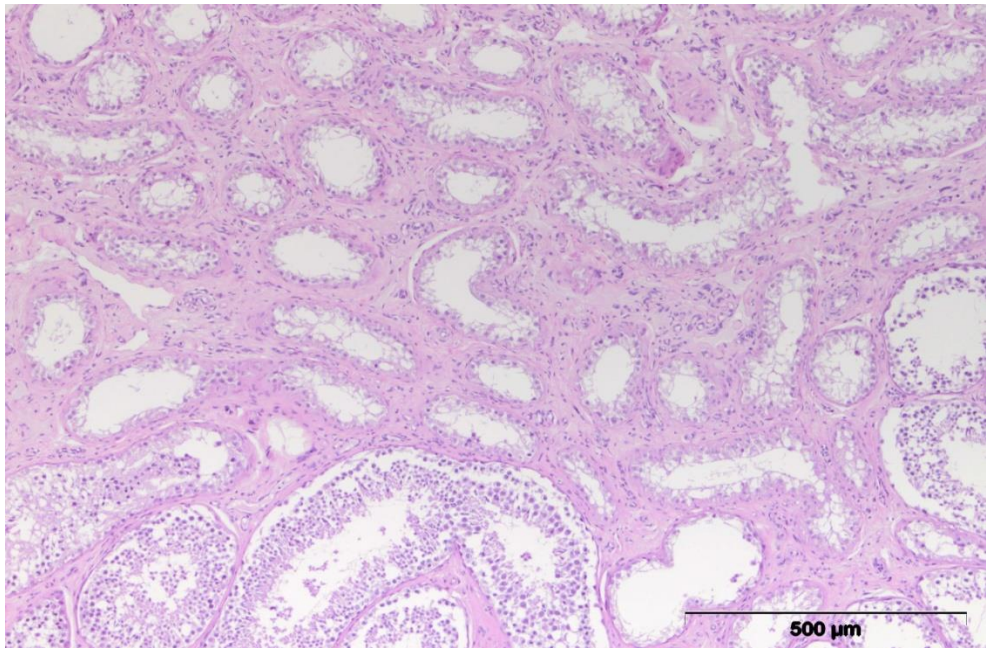
Фиброза тестиса манифестовала се умножавањем везивно-ткивних ћелија и влакана у интерстицијуму тестиса (Слика 9).



Слика 7. Тестиси овна, дегенерација тестиса, НЕх100

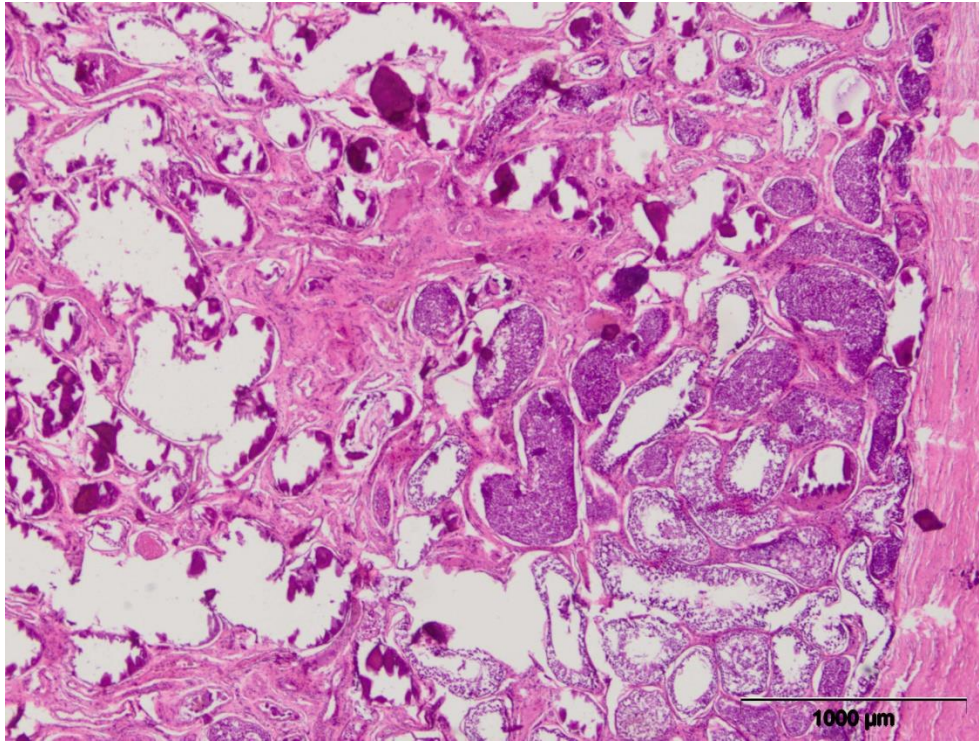


Слика 8. Тестиси овна, изражен степен дегенерације тестиса, НЕх100



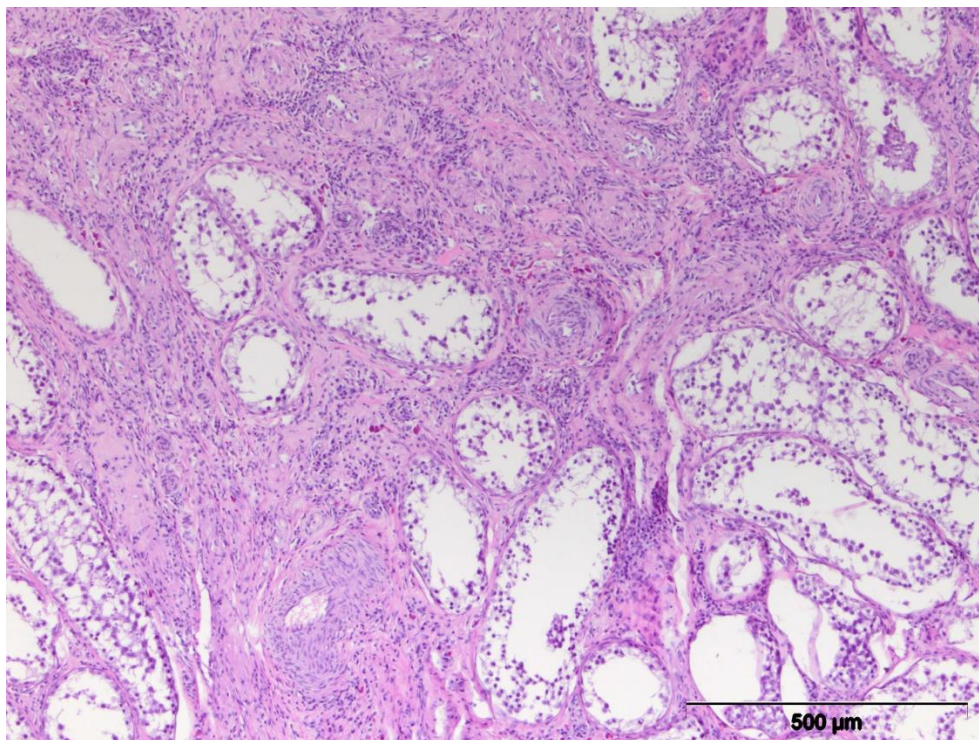
Слика 9. Тестиси овна, дегенерација и фиброза тестиса, НЕх100

Калцификација тестиса карактерисала се акумулацијом базофилних, хомогених беструктурних депозита калцијумових соли интратубуларно, у интерстицијуму и базалној мембрани сјемених каналића (Слика 10).



Слика 10. Тестис овна, Дегенерација, фиброза и калцификација, HE40

У интерстицијуму тестиса код 5.26% (1/19) овна уочена је инфилтрација лимфоцитима, макрофагима и плазма ћелијама (Слика 11). Поменуте промјене су карактеристичне за интерстицијални орхитис.



Слика 11. Тестис овна, дегенерација тестиса, инфилтрација лимфоцитима, макрофагима и плазма ћелијама, НЕх100

У каналићима епидидимиса код 100% (19/19) испитаних овнова запажена је дегенерација, вакуолизација и хиперплазија епителних ћелија. Унутар хиперпластичног епитела формирају се интраепителне цисте у који мигрирају неутрофилни гранулоцити и тако се формирају микроапсцеси (Слика 13). Овај налаз је запажен код 26,32% (5/19) животиња.

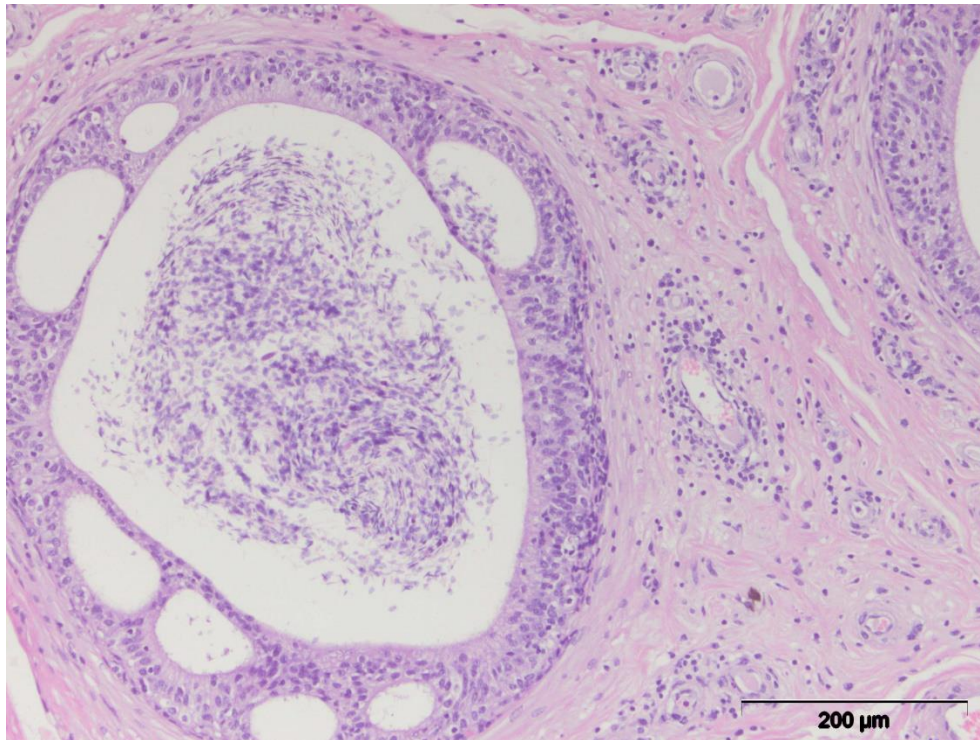
Код 5,26% (1/19) овнова услед хиперплазије епитела долази до сужавања лумена каналића епидидимиса што је проузроковало спермостазу (Слика 14).

Код 26,32% (5/19) животиња уочена је атрофија епителних ћелија каналића епидидимиса и у лумену ових каналића се не уочавају сперматозоиди (Слика 15).

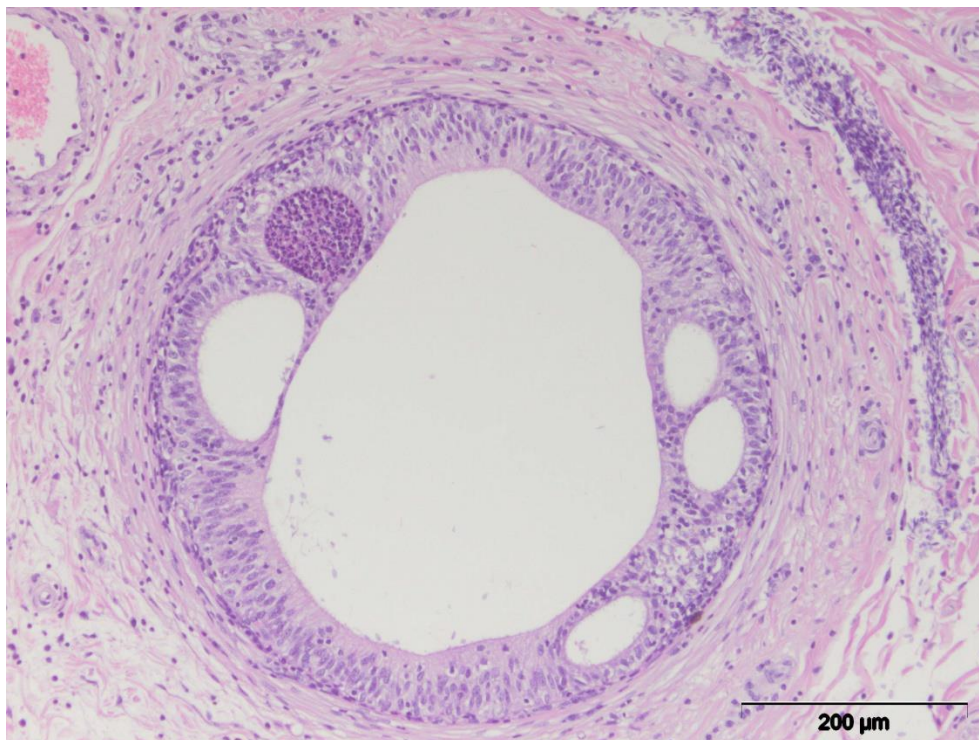
У интерстицијуму епидидимиса код 68,42% (13/19) овнова уочен је едем и инфилтрација ћелијама инфламације - лимфоцити, плазма ћелије и макрофаги. Описане промјене су карактеристичне за епидидимитис (Слика 16).

Гранулом са некротичним центром запажен је код 5,26% (1/19) животиња (Слика 17).

Фиброза епидидимиса карактерисала се умножавањем везивно-ткивних ћелија и влакана у интерстицијуму (Слика 18).



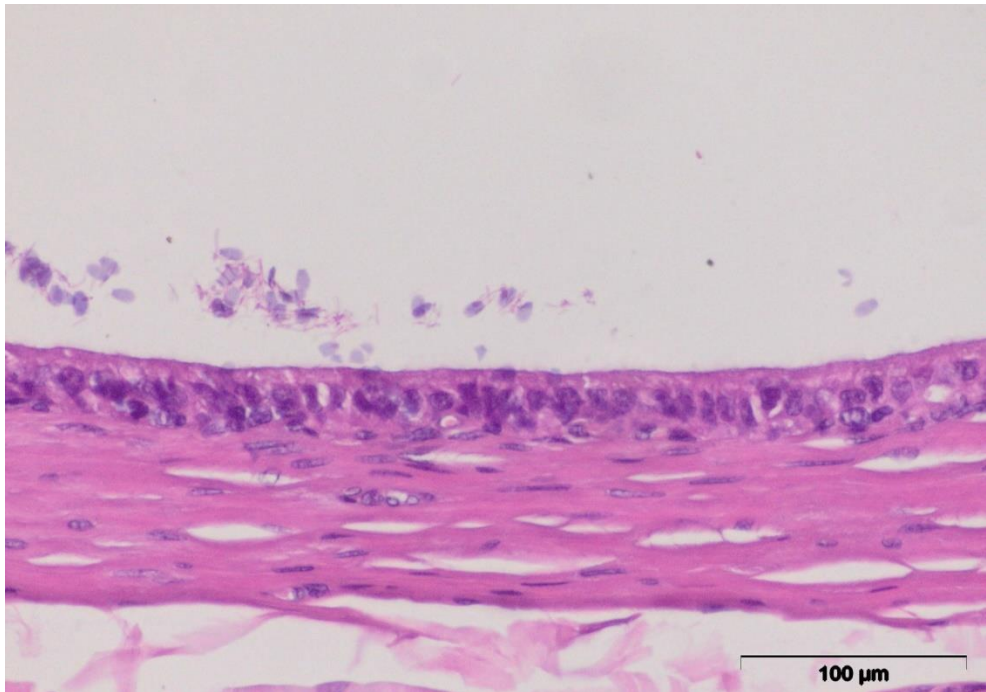
Слика 12. Епидидимис овна, дегенерација епитела са формирањем интраепителних циста, фиброза и инфилтрација мононуклеарним ћелијама у интерстицијуму, НЕх200



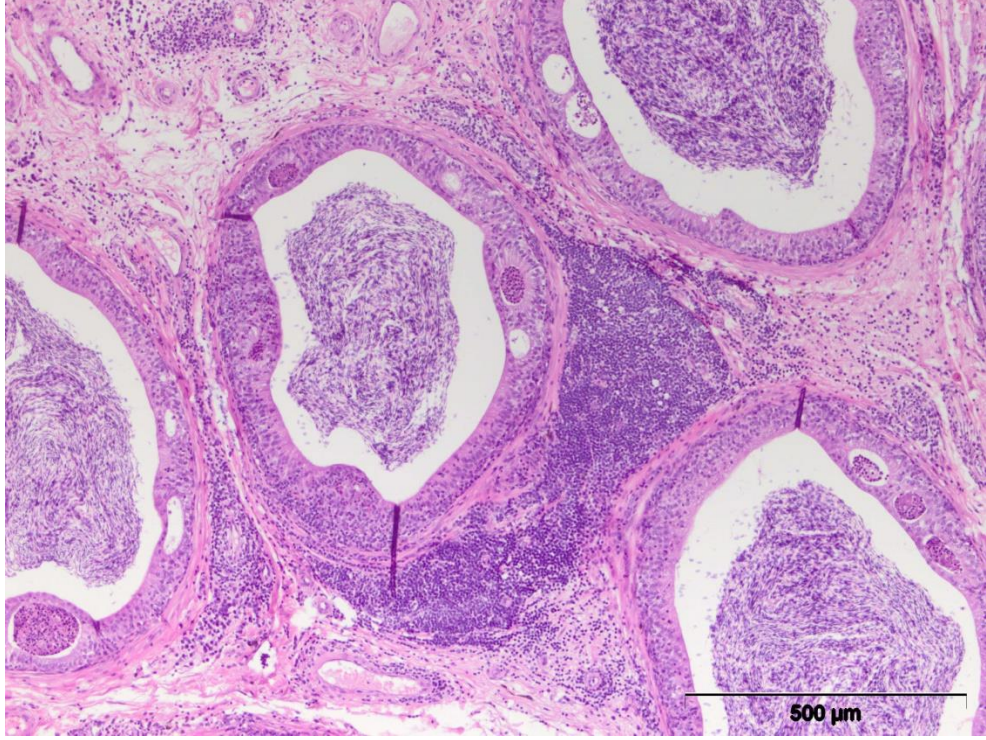
Слика 13. Епидидимис овна, дегенерација епитела са формирањем интраепителних циста и интраепителних микроапсцеса, фиброза и инфилтрација мононуклеарним ћелијама у интерстицијуму, НЕх200



Слика 14. Епидидимис овна, едем интерстицијума и спермостаза, НЕх404



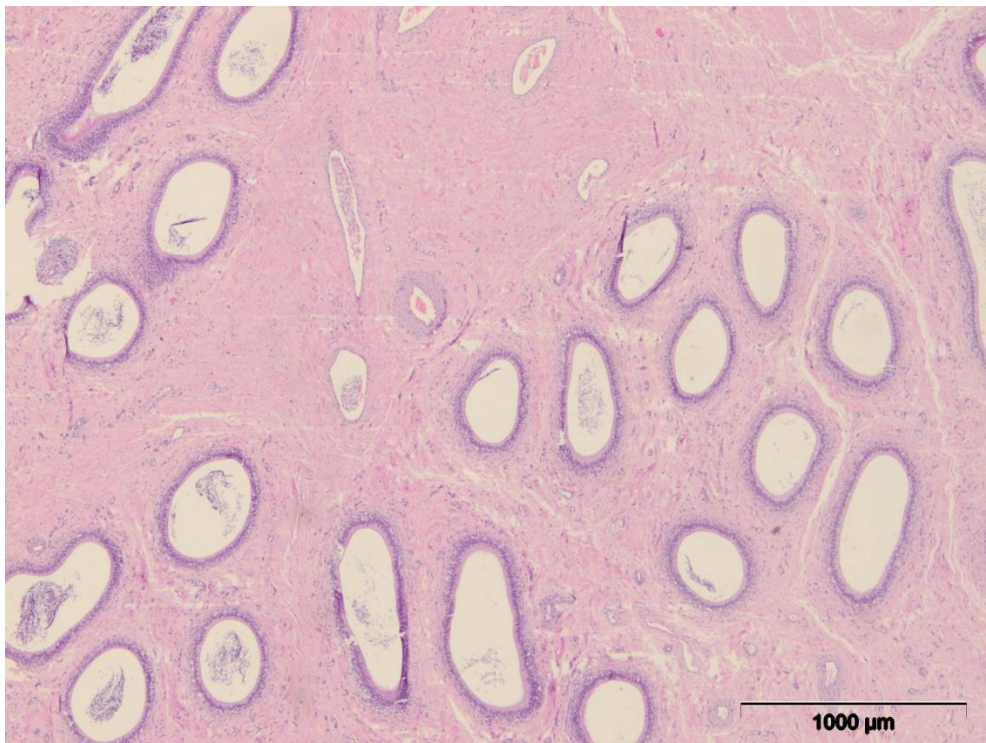
Слика 15. Епидидимис овна, дегенерација и атрофија епитела каналића епидидимиса, НЕх600



Слика 16. Епидидимис овна, дегенерација епитела са формирањем интраепителних циста и интраепителних микроапсеса, фиброза и инфилтрација мононуклеарним ћелијама у интерстицијуму, НЕх100



Слика 17. Епидидимис овна, гранулом са некротичним центром и фиброза; НЕх40



Слика 18. Епидидимис овна, дегенерација епитела и фиброза, НЕх40

5.9. Резултати статистичке обраде хистопатолошких података

Ради лакше статистичке обраде хистопатолошки параметри су приказани у облику ординалних категоричких варијабли са нумеричким вриједностима у распону од 0 до 4 гдје 0 представља одсуство промјена, а 4 изузетно висок интензитет промјена. Укупно је код тестиса праћено пет параметара: дегенерација, фиброза, минерализација/калцификација, присуство сперме и хиперемиија. Код епидидимиса је праћено осам хистопатолошких параметара: инфилтрација ћелијама запаљења, дегенерација и вакуолизација епитела, инфламаторне ћелије у епителу, дилатација каналића, хиперемиија, едем интерстицијума, фиброза и присуство сперме (Табела 12).

Табела 12 . Хистопатолошке промјене у тестисима и епидидимисима приказане у облику ординалних категоричких варијабли са распонем од 0 до 4

Ован	Старост	Орган	Дегенерација тестис	Фиброза тестис	Минерализација/калцификација тестис	Сперма тестис	Хиперемиија тестис	Инфилт р. ltr. Lu, Pc, Mf епидидимис	Дегенерација вакуолизација епитела епидидимис	Инфламаторне ћелије (епител) епидидимис	Дилатација каналића епидидимис	Хиперемиија епидидимис	Едем интерстицијума епидидимис	Фиброза епидидимис	Сперма епидидимис	PCR статус
		1.1	3	0	0	0	0	1	2	0	2	0	0	4	0	0
1	5	1.2	2	0	0	1	0	1	2	0	2	0	2	2	1	0
		2.1	3	2	0	1	0	3	3	3	1	0	1	1	1	0
2	5	2.2	3	2	0	1	0	1	1	0	2	0	2	1	2	1
		3.1	2	0	0	1	0	2	2	0	2	0	3	0	1	0
3	5	3.2	4	0	0	1	0	2	2	0	2	0	3	0	2	0
		4.1	1	0	0	2	0	2	2	0	2	2	2	2	2	1
4	7	4.2	1	0	0	2	0	0	2	0	2	2	3	0	1	0
		5.1	2	0	0	2	0	0	2	0	2	2	2	2	2	0
5	5	5.2	4	0	0	2	0	0	3	2	0	0	0	4	0	0
		6.1	3	3	0	0	0	2	2	0	0	0	0	4	1	0
6	7	6.2	3	0	0	0	0	2	2	0	0	0	0	4	1	0
		7.1	2	2	0	0	0	2	2	0	2	0	2	2	2	0
7	10	7.2	2	0	0	0	0	2	2	0	0	2	2	0	3	0
		8.1	3	0	0	0	0	2	2	0	2	2	2	0	1	0
8	7	8.2	4	2	2	0	0	0	2	0	2	2	2	0	1	0
		9.1	2	0	0	0	2	2	2	0	2	2	2	0	2	0
9	2	9.2	2	0	0	0	2	2	2	0	2	2	2	2	2	0
		10.1	2	0	0	0	2	3	3	2	0	2	2	2	2	0
10	3	10.2	2	0	0	0	2	2	2	0	2	2	2	2	2	0
		11.1	4	3	0	0	0	3	2	0	0	0	0	3	0	0
11	2	11.2	2	2	0	2	0	3	2	0	0	0	0	3	2	0
		12.1	2	2	0	0	0	3	2	0	0	0	2	3	2	0
12	2	12.2	2	0	0	0	0	3	2	0	2	0	2	2	2	1
		13.1	1	0	0	0	0	3	3	3	0	0	2	2	1	1
13	2	13.2	1	0	0	0	0	2	3	3	2	0	2	2	2	0
		14.1	4	0	0	0	0	2	2	0	0	0	2	2	2	0
14	3	14.2	3	2	0	0	0	2	2	0	0	0	2	2	2	0
		15.1	2	0	0	0	0	2	2	0	0	0	0	0	1	0
15	5	15.2	2	2	0	0	0	2	2	0	0	2	2	0	1	0
		16.1	1	0	0	2	0	0	0	0	0	0	1	0	2	1
16	2	16.2	1	0	0	2	0	0	0	0	0	0	1	0	2	0
		17.1	2	2	0	0	0	3	3	3	0	0	0	3	2	0
17	2	17.2	2	0	0	0	0	2	2	0	0	2	4	0	2	0
		18.1	3	2	2	0	0	2	2	0	2	3	3	0	2	1
18	5	18.2	3	3	4	0	0	3	2	0	2	0	0	3	0	0
		19.1	2	2	0	0	0	2	2	0	3	2	4	0	2	0
19	3	19.2	2	2	0	0	0	2	2	0	3	2	4	0	2	0

Резултати матрикса корелације хистопатолошких промјена на тестисима и старости овнова упућују на умјерену негативну корелацију између присуства сперме и дегенерације у тестисима (-0,403), умјерену позитивну корелацију између присуства фиброзе и дегенерације у тестисима (0,338), док су остале вриједности корелација слабе (Табела 13).

Табела 13. Матрикс корелације хистопатолошких промјена на тестисима

	Старост	Дегенерација	Фиброза	Сперма
Старост	1	0,196	0,038	-0,137
Дегенерација	0,196	1	0,338	-0,403
Фиброза	0,038	0,338	1	-0,179
Сперма	-0,137	-0,403	-0,179	1

Резултати матрикса корелације хистопатолошких промјена на епидидимисима и старости овнова указују на умјерену до јаку позитивну корелацију између дегенерације/вакуолизације епитела и присуства инфламаторних ћелија (0,660), едема интерстицијума и хиперемije (0,573), едема интерстицијума и дилатације каналића епидидимиса (0,501), присуства сперме и едема интерстицијума (0,497) и умјерену до јаку негативну корелацију између фиброзе и едема интерстицијума (-0,656) (Табела 14)

Табела 14. Матрикс корелације хистопатолошких промјена на епидидимисима

	Старост	Инфилтр. ltr. Ly, Pс, Mf	Дегенерација вакуолизац ија епитела	Инфламаторне ћелије (епител)	Дилатација каналића	Хиперемија	Едем интерстицијума	Фиброза	Сперма
Старост	1	-0,248	0,032	-0,239	0,173	0,153	-0,036	-0,060	-0,137
Инфилтр. ltr. Ly, Pс, Mf	-0,248	1	0,487	0,264	-0,161	-0,137	-0,064	0,236	0,083
Дегенерација вакуолизац ија епитела	0,032	0,487	1	0,660	-0,005	0,049	-0,026	0,347	-0,207
Инфламаторне ћелије (епител)	-0,239	0,264	0,660	1	-0,229	-0,235	-0,190	0,229	-0,090
Дилатација каналића	0,173	-0,161	-0,005	-0,229	1	0,364	0,501	-0,278	0,048
Хиперемија	0,153	-0,137	0,049	-0,235	0,364	1	0,573	-0,491	0,312
Едем интерстицијума	-0,036	-0,064	-0,026	-0,190	0,501	0,573	1	-0,656	0,497
Фиброза	-0,060	0,236	0,347	0,229	-0,278	-0,491	-0,656	1	-0,370
Сперма	-0,137	0,083	-0,207	-0,090	0,048	0,312	0,497	-0,370	1

5.10. Кластер анализа

У овом истраживању посебно су анализиране хистопатолошке промјене за тестисе и епидидимисе. Из групе кластеровања рађене су три различите кластер анализе:

1. Хијерархијско дивизионо кластероване при чему је као критеријум раздвајања у кластере коришћена Еуклидова удаљеност између опсервација.
2. Хијерархијско агломеративно кластероване при чему је као критеријум сличности међу опсервацијама коришћен Pearson-ов коефицијент корелације.

3. *K-means* кластеровање при чему је као критеријум раздвајања у кластере коришћена Еуклидова удаљеност између опсервација, док је иницијални број кластера (k) постављен на вриједност броја кластера добијених хијерархијским кластер анализама.

Резултати кластер анализе за тестисе показали су груписање података у пет кластера при чему је постојала велика разлика у класификацији међу коришћеним моделима уз изражену појаву недефинисанх кластера те из тог разлога нису рађене даљне статистичке анализе за ове органе.

Резултати кластер анализе за епидидимисе показали су груписање података у два кластера при чему је постојала велика сличност у класификацији међу моделима као и знатно мање преклапање између кластера (Табела 15). Даље статистичке анализе су рађене на такав начин да је кластер за одређену опсервацију додијељен као доминантна вриједност међу три коришћена модела кластеровања.

Табела 15. Статистички параметри раздвајања епидидимиса у кластере

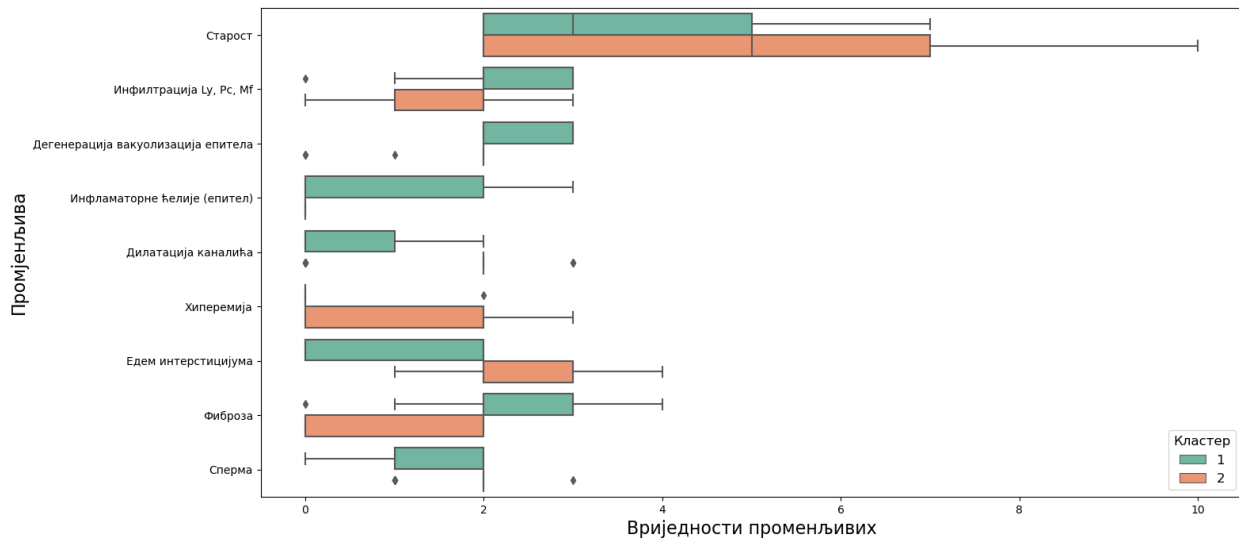
Silhouette индекс	0,2719
Hartigan индекс	0,9900
Calinski & Harabasz индекс	17,7665

Анализа средњих вриједности варијабли између кластера показала је да су у првом кластеру доминантне промјене у виду инфилтрације инфламаторним ћелијама у епителу и паренхиму епидидимиса, затим дегенерација и вакуолизација епитела и фиброза. Са друге стране у кластеру број два доминирају промјене у виду дилатације каналића епидидимиса, хиперемije, едема интерстицијума и присуства сперме (Табела 16). Такође, средња вриједност старости овнова је нешто већа у другом кластеру.

Табела 16. Средње вриједности старости овнова и интензитета хистопатолошких промјена по кластерима

Клас тер	Стар ост	Инфилтр. Lu, Pc, Mf	Дегенерација вакуолизација епитела	Инфламаторне ћелије (епител)	Дилатација каналића	Хиперемија	Едем интерстицијума	Фиброза	Сперма
1	3,83	2,24	2,35	0,94	0,53	0,12	0,88	2,59	1,18
2	4,71	1,52	1,76	0,00	1,62	1,38	2,28	0,62	1,81

Визуелни приказ распореда хистопатолошких промјена и старости по кластерима дата је у графикону бр. 4



Графикон 4. Расподјела старости и хистопатолошких промјена у епидидимисима по кластерима

Извођење ANOVA теста је показало је да су све разлике између средњих вриједности интензитета хистопатолошких промјена значајне за ниво значајности 0,05 изузев код старости овнова (Табела 17)

Табела 17. Резултати ANOVA теста као процјене статистичке значајности разлике међу средњим вриједностима старости и интензитета хистопатолошких промјена на епидидимисима изумеђу кластера

ANOVA тест	Старост	Инфилтр. Ly, Pc, Mf	Дегенерација вакуолизација епитела	Инфламаторне ћелије (епител)	Дилатација каналића	Хиперемија	Едем интерстицијума	Фиброза	Сперма
F статистика	1,48	5,65	10,11	10,35	12,88	21,84	24,73	35,38	8,63
p-вриједност	0,229	0,003	0,003	0,03	0,0009	4×10^{-5}	$1,63 \times 10^{-5}$	$8,15 \times 10^{-7}$	0,006

Резултати Tukey теста су потврдили да постоји статистички значајна разлика између кластера 1 и 2 за све променљиве које су анализирани изузев за старост овнова.

5.11. Регресиона анализа повезаности старости овна и интензитета хистопатолошких промјена

У табели бр. 18 приказани су резултати регресионе анализе повезаности старости овна и интензитета хистопатолошких промјена на тестисима.

Табела 18. Регресиона анализа повезаности старости овна и интензитета хистопатолошких промјена на тестисима

	Дегенерација	Фиброза	Сперма
R ²	0,039	0,001	0,019
F	1,445	0,053	0,692
Pr > F	0,237	0,819	0,411

У табели бр. 19 приказани су резултати регресионе анализе повезаности старости овна и интензитета хистопатолошких промјена на епидидимисима.

Табела 19. Регресиона анализа повезаности старости овна и интензитета хистопатолошких промјена на епидидимисима

	Инфил тр. Lu, Pc, Mf	Дегенер ација вакуоли зација епитела	Инфлам аторне промјен е (епител)	Дилатац ија каналит а	Хипере мија	Едем интерс тицију ма	Фиброз а	Сперма
R ²	0,062	0,001	0,057	0,030	0,023	0,001	0,004	0,020
F	2,350	0,036	2,190	1,107	0,861	0,046	0,128	0,692
Pr>F	0,134	0,850	0,148	0,300	0,360	0,831	0,723	0,411

5.12. Повезаност хистопатолошких промјена и PCR резултата

Резултати истраживања за све хистопатолошке параметре за ниво значајности од 0,05 показали су одсуство било какве повезаности PCR статуса и интензитета хистопатолошких промјена (Табела 20).

Табела 20. Повезаност Bruce ladder multiplex PCR статуса узорка и интензитета хистопатолошких промјена на Man-Whitney U тесту и т-тесту за независне узорке

Промјена	Man-Whitney U		Независни т-тест	
	Статистика	р-вриједност	Статистика	р-вриједност
Дегенерација *	63	0,164	-1,5	0,137
Фиброза *	86	0,660	-0,5	0,637
Минерализација/калцификација *	105,5	0,441	0,4	0,679
Сперма *	118,5	0,283	1,1	0,270
Хиперемија *	84	0,387	-0,9	0,374
Инфилтр. Lu, Pс, Mf **	97,5	0,965	0,0	0,981
Дегенерација вакуолизација епитела **	73	0,225	-1,5	0,133
Инфламаторне промјене (епител) **	98	0,925	0,2	0,837
Дилатација каналића**	107	0,639	0,5	0,621
Хиперемија **	95,5	1,00	0,0	0,965
Едем интерстицијума **	111,5	0,517	0,6	0,521
Фиброза **	82	0,569	-0,6	0,535
Сперма **	121,5	0,257	1,1	0,264

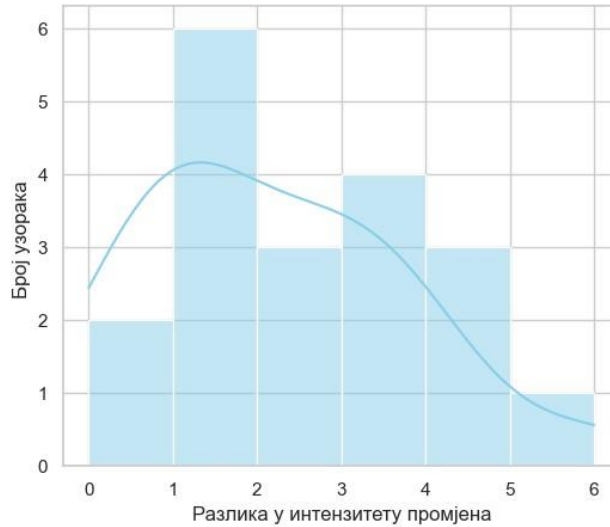
*Тестис ** Епидидимис

За предвиђање PCR статуса у односу на интензитет хистопатолошких промјена конструисани су модели логистичке регресије, *Random Forest* класификатор, *k-means* и хијерархијског кластеровања. Ниједан од поменутих модела није успео да предвиди PCR статус узорка боље у односу на случајно погађање.

5.13. Упоредна анализа интензитета промјена на парним органима

Код епидидимитиса овнова честа је појава да су макроскопске промјене на једном тестису и епидидимису јаче изражене. У овом испитивању сабране су нумеричке вриједности хистопатолошких промјена за све појединачне узорке и скуп података је подјелењен на двије подгрупе, једну са узорцима органа сваког овна са мање израженим промјенама и другу са

јаче израженим промјенама. Затим је за добијену разлику два скупа података провјерен услов нормалности расподеле визуелно конструисањем хистограма разлика (Графикон 5) и статистички коришћењем Shapiro-Wilk теста.



Графикон 5. Хистограм разлика суме хистопатолошких промјена парних репродуктивних органа овнова

Добијене вриједности статистике (0,923) и р-вриједност (0,127) у Shapiro-Wilk тесту указале су да нема довољно доказа да разлике нису нормално распоређене. Пошто су оба теста испунила услов нормалности расподела разлика између парних узорака коришћен је т-тест. Како се ради о парним подацима, гдје постоје мјерења на истим животињама гдје су подаци у једном узорку директно повезани са подацима у другом узорку поред т-теста за независне узорке препоручује се коришћење т-теста за парне узорке. Извођењем ових тестова добијене су негативне вриједности Т статистике и р-вриједности мање од 0,05 што указује да постоје статистички значајне разлике у интензитету хистопатолошких промјена на парним репродуктивним органима овнова инфицираних *B. ovis* (Табела 21).

Табела 21. Резултати статистичке анализе о значајности разлика у интензитету хистопатолошких промјена у парним репродуктивним органима

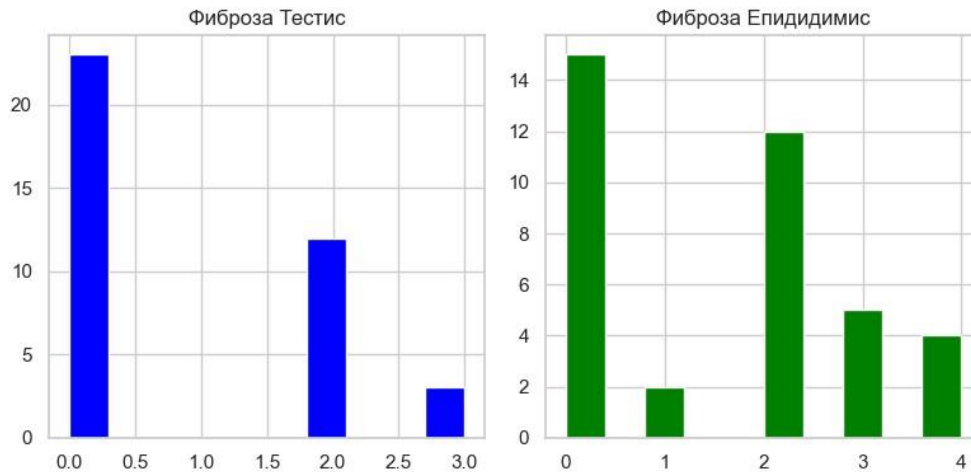
	Статистика	р-вриједност
Независни т-тест	-6,083	$9,5 \times 10^{-6}$
Парни т-тест	-2,046	0,048

5.14. Упоредна анализа интензитета промјена на тестисима и епидидимисима

Испитивање интензитета промјена на тестисима и епидидимисима код овнова изазваних *B. ovis* требало би резултирати закључком да су промјене на епидидимисима израженије у односу на промјене на тестисима. Ово истраживање спроведено је на хистопатолошким промјенама које су могле упоредно да се прате на тестисима и епидидимисима, а то укључује фиброзу и дегенерацију.

5.14.1. Фиброза

Након сумирања нумеричких вриједности свих испитиваних узорака за фиброзу у тестисима, добијен је скор од 33, док је код фиброзе на епидидимисима добијен резултат од 57, што указује на израженије фиброматозне промјене на пасјеменицима. Визуализација дистрибуције података (Графикон б) показала је да дистрибуција није у типу нормалне расподјеле, па је за статистичку анализу коришћен Wilcoxon-ов тест, који није осјетљив на претпоставке о дистрибуцији података. Будући да овај тест може бити непоуздан ако у скупу података има нула (0) вриједности, поред њега је коришћен и Man-Whitney U тест, који такође није осјетљив на претпоставке о дистрибуцији података али може бити отпорнији на присуство нула вриједности



Графикон б. Хистограм дистрибуције фиброматозних промјена у хистопатолошким узорцима тестиса и епидидимиса

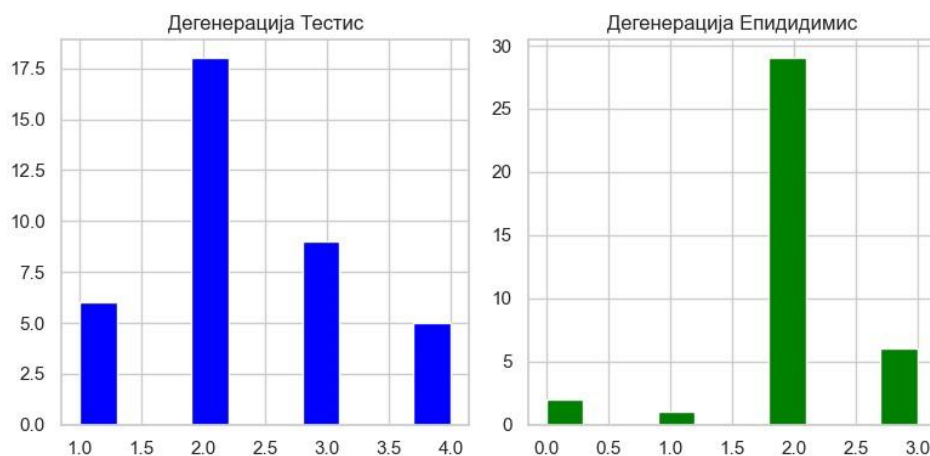
Резултати урађених тестова указују да постоји статистички значајна разлика у интензитету фиброматозних промјена у тестисима и епидидимисима за ниво значајности 0,05 (Табела 22)

Табела 22. Резултати статистичке анализе о значајности разлика фиброматозних промјена у тестисима и епидидимисима

	Статистика	р-вриједност
Wilcoxon	77,0	0,031
Man-Whitney U	543,0	0,043

5.14.2. Дегенерација

Након сабирања нумеричких вриједности свих испитиваних узорака за дегенеративне промјене у тестисима добијен је скор 89, док је код дегенеративних промјена на епидидимисима добијен скор 77 што указује да су дегенеративне промјене благо израженије на тестисима. За разлику од фиброзе и хиперемije дистрибуција података за дегенерацију типична је за нормалну расподелу (Графикон 7) па су за анализу коришћени независни и зависни т-тест.



Графикон 7. Хистограм дистрибуције дегенеративних промјена у хистопатолошким узорцима тестиса и епидидимиса

Резултати свих тестова показали су да не постоји статистички значајна разлика између дегенеративних промјена на тестисима и епидидимидма за ниво значајности 0,05 (Табела 23)

Табела 23. Резултати статистичке анализе о значајности разлика у интензитету дегенеративних промјена у тестисима и епидидимисима

	Статистика	р-вриједност
Независни т-тест	1,75	0,083
Парни т-тест	1,92	0,063

6. ДИСКУСИЈА

Врсте из рода *Brucella* припадају фамилија *Brucellaceae* и овим родом обухваћене су грам негативне бактерије које су на основу осјетљивости према пептиду трифолитоксину класификоване у групу α -2 протеобактерија. Поред овог рода фамилија *Brucellaceae* обухвата још родове *Mycoplana* и *Ochrobactrum* (Moreno и сар., 1990). Род *Brucella* обухвата дванаест врста, а подјела је углавном извршена на основу афинитета према одређеном домаћину. Од нарочитог значаја је шест врста бруцела од којих је најзначајнија *B. melitensis* која обично инфицира овце и козе, а уједно представља и значајну зоонозу, *Brucella abortus*, која доминантно инфицира говеда, *B. suis* која инфицира свиње, зечеве, сјеверне јелене и неке врсте дивљих глодара, *B. canis* која је дијагностикована код паса, *B. neotomae* изолована из пустињских пацова и *B. ovis* која код оваца изазива обољење познато као епидидимитис овнова.

Поменуте бактерије изазивају бруцелозу, значајну групу обољења од којих су неке зоонозе. Бруцелоза је значајна како због зоонозног потенцијала тако и због великих економских штета (McDermott и сар., 2013).

B. ovis изазива обољење које је познато као „епидидимитис овнова“, мада инфекција поменутим узрочником изазива плацентитис и абортус код гравидних оваца као и превремене порођаје са рађањем слабо виталне јагњади. Из помешних разлога се данас сматра да је тачније говорити о комплексу обољења које носе назив „*Brucella ovis* инфекције“ (Galluzzo и сар., 2021).

Поред оваца *B. ovis* је патогена и за европског јелена (*Cervus elaphus*) (Ridler и сар., 2015), козе, бјелорепог јелена (*Odocoileus virginianus*) и америчког муфлона (*Ovis canadensis*) (McCollum, 2013).

Од поменутих обољења која се могу сврстати у комплекс обољења изазваних *B. ovis* свакако је најдоминантнији епидидимитис овнова који је регистрован скоро у свим земљама са развијеном овчарском производњом, а на територији Србије болест је први пут серолошки потврђена у Војводини 2009. године (Grgić и сар., 2009), док је *B. ovis* први пут изолована у околини Пирота 2014. године (Petrović и сар., 2014). Епидидимитис овнова није клинички специфичан искључиво за инфекцију *B. ovis* и код више од половине инфицираних животиња изостају клинички симптоми, а такође читав низ других узрочника може да изазове инфламацију тестиса и епидидимиса код овнова: *Histophilus ovis* (Buddle, 1955); *Haemophilus agni* (Zeki и сар, 1981), *Haemophilus somnus* (Bruss и сар., 1981; Bulgin и Anderson, 1983), *Actinobacillus seminis* (Dodd и Hartley 1955), (Livingston и Hardy, 1961; Worthington и Bosman, 1968; De la Puente-Redondo и сар.,2000), *Actinobacillus actinomycetmecomitans* (De Long и сар., 1979). Такође, велики број других

микроорганизама је изолован код случајева епидидимитиса овнова: *Trueperella pyogenes* (Tzora и сар., 2002; Jost и Bilington, 2004), *Corynebacterium pseudotuberculosis* (Simmons и Hall 1953; Galloway, 1966; Ekdahl и сар., 1968; Ivanov и Masalski, 1974; Zamora и сар., 1977; De Long и сар., 1979), *Streptococcus spp* (Ekdahl и сар., 1968), *Staphylococcus spp* (Ekdahl и сар., 1968; Zamora и сар., 1977; De Long и сар., 1979), *Manheimia haemolytica* (Ekdahl и сар., 1968; Garcia-Pastor и сар., 2009), *Pasteurella multocida* (Ekdahl и сар., 1968; Garcia-Pastor и сар., 2009), *Brucella abortus S19* (Ekdahl и сар., 1968), *Pseudomonas maltophilia* (De Long и сар., 1979), *Actinobacillus actinomycetmecomitans* (De long и сар., 1979), *Actinobacillus lignieresii* (Laws и Elder, 1969), *Yersinia pseudotuberculosis* (Ekdahl и сар., 1968; Zamora и сар., 1977), *Histophilus ovis* (Dodd и Hartley, 1955; Ekdahl и сар., 1968), *Biberstenia trehalosi* (Garcia-Pastor и сар., 2009), *Salmonella enterica subsp. diarizonae* (Celeghini и сар., 2013), *Brucella melitensis biovar. 3* (Buyukcangaz и сар., 2013).

Серолошке методе су се показале као веома поуздане у дијагностици и ерадикацији епидидимитиса овнова а најчешће кориштене методе су *ELISA*, РВК и нешто ређе АГИД (Blasco и сар., 2010), (WOAH, 2018). У овом раду од серолошких метода коришћена је индиректна *ELISA* (Ingenaza, Spain) која детектује присуство антитјела против *B. ovis* у крви инфицираних оваца. Испитано је укупно 94 узорка серума, 33 од мужјака и 61 од женки, при чему од 33 узорка серума овнова, 23 су била позитивна (69,7%), а од 61 узорка серума оваца, 2 (3,3%) су била позитивна.

Према подацима из литературе серопреваленција у испитиваним стадима варира од 2,5% (Machado и сар., 2015) до 22,5% (Elderbrook и сар., 2019), док се серопреваленција у односу на укупни број испитаних животиња креће од 0,53% (Elderbrook и сар., 2019) до 24,04% (Dorneles и сар., 2020). Серопреваленција код овнова се креће од 2,89% (Machado и сар., 2015) до 62,5% (Galluzzo и сар., 2021). У овом испитивању добијена је ниска серопреваленција код женки што се могло очекивати имајући у виду малу осјетљивост оваца на инфекцију. Сличне резултате су добили и Galluzzo и сар., 2021. године гдје је серопреваленција код оваца износила 3,5% (Galluzzo и сар., 2021).

У студији о процјени ризика анализирана је коваријанса пола и ризика од настанка инфекције *B. ovis*. Резултати су показали значајну асоцијацију између пола и ризика од инфекције, са овновима значајно изложенијим ризику у поређењу са овцама. Ови налази сугеришу да је пол важан фактор који треба узети у обзир приликом процјене ризика од инфекције *B. ovis*.

У једној студији спроведеној у Француској, у поређењу са РВК тестом, индиректна *ELISA* (Chekit *B. ovis*, Idexx, France) показала је осјетљивост од 91,7% и специфичност од 95,2% (Praud и сар., 2012). У другој студији спроведеној у Канади, такође у поређењу са РВК тестом, индиректна *ELISA* (модификована према методи коју су објавили Vigliosso и сар. (1997) показала је осјетљивост од 96,3% и специфичност од 99,6% (Gall и сар., 2003). Према упуству произвођача теста који је коришћен за потребе ове дисертације (Ingenaza,

Spain) његова осјетљивост и специфичност износе 99% и 98%. Ове вриједности су јако високе што *ELISA* тест чини јако поузданим у дијагностици обољења изазваног *B. ovis*. Ово је нарочито важно јер је *ELISA* тест серолошка дијагностичка метода коришћена у овој студији.

Специфичност теста од 98% указује на висок проценат тачно негативних резултата, док осјетљивост од 99% сугерише висок проценат тачно позитивних резултата. Овако високе вриједности осјетљивости и специфичности указују на велику поузданост *ELISA* теста у идентификацији инфицираних јединки у популацији. Позитивна предиктивна вриједност (PPV) од 95,83% указује на велику вјероватноћу да је животиња која има позитиван резултат стварно инфицирана врстом *B. ovis*, док негативна предиктивна вриједност (NPV) од 98,57% указује на изузетно велику вјероватноћу да животиња са негативним *ELISA* резултатом стварно није инфицирана. Ниске стопе лажно позитивних (2%) и лажно негативних (1%) резултата указују на висок ниво поузданости теста. Ови резултати су важни за процјену корисности теста у клиничкој пракси. Релативни ризик од 67,08 и однос шанси од 1587,00 показују значајно повећан ризик од инфекције код овнова у поређењу са овцама. Овнови су осјетљивији на инфекцију *B. ovis* у односу на овце. Овце врло ријетко бивају инфициране и углавном служе као механички вектори обољења. Код оваца се углавном срећу пролазни серолошки одговор, ријетко побачаји и рађање мртвих или авиталних јагњади (Rovid, 2018). Код овнова са друге стране, настаје активна инфекција праћена патолошким промјенама на репродуктивним органима и последично смањеном плодношћу. Овнови се инфицирају у току сезоне парења преко оваца или директним контактом са другим инфицираним овновима. Имајући у виду природу преноса узрочника могуће је да је овако висок проценат серолошки позитивних овнова последица несразмјерно великог броја овнова у односу на овце што доприноси лакшем ширењу болести. Лакше ширење бруцела може бити последица тога што се овце у току трајања еструса паре са више овнова или се пак ван сезоне парења болест лакше преноси директним контактом међу овновима. Битно је напоменути да на фарми на којој је студија рађена већина овнова није била у конакту са овцама што истиче огромну улогу међуовновских контаката у преносу *B. ovis* у овој студији. Из тог разлога би се на фармама које имају високу преваленцију обољења требало организовати групни или индивидуални модел парења, а такође би било пожељно држати овнове индивидуално. Такве мјере би значајно смањиле ризик од ширења инфекције *B. ovis*.

Молекуларне методе иако генерално јако осјетљиве и специфичне за одређене врсте испитивања, у овој студији су показале велики недостатак осјетљивости. Оне су спроведене код 19 серолошки позитивних овнова и двије серолошки позитивне овце. Анализирајући карактеристике *ELISA* теста може се очекивати стопа лажно позитивних резултата од 2% (95% CI 0,00 – 4,83%), а такође треба узети у обзир и да су свих 19 овнова имали више или мање изражене клиничке и хистопатолошке промјене на репродуктивним органима што указује да су те животиње заиста биле инфициране *B. ovis*. Па ипак, од 19

испитаних овнова само је њих 31,6% (6/19) имало позитиван Bruce-ladder multiplex PCR налаз код барем једног од два збирна узорка репродуктивног ткива када је нуклеинска киселина екстрахована QIAamp Cador Pathogen mini китом. Код екстракције GeneJET Genomic DNA Purification китом Bruce-ladder multiplex PCR методом било је позитивно 21,1% (4/19) овнова. Real time PCR протоколи су имали нешто већу осјетљивост па је код екстракције нуклеинске киселине QIAamp Cador Pathogen mini китом 52,6% (10/19) овнова имало позитиван барем један збирни узорак репродуктивног ткива, док је код екстракције GeneJET Genomic DNA Purification китом 47,4% (9/19) овнова било позитивно на барем једном збирном узорку. У једној студији спроведеној у Вајомингу (САД) утврђено је да 29% (5/17) серопозитивних овнова има негативне PCR, културелне и хистопатолошке резултате (Branscom и сар., 2019).

Присуство *B. ovis* у различитим ткивима репродуктивног система знатно варира и најчешће се детектују у ткивима епидидимиса (нарочито репа), сјеменим кесицама и ампулама (Branscom и сар., 2019). Ако се посматра осјетљивост молекуларних тестова у дијагностици епидидимитиса овнова из репродуктивног ткива она варира од 10-80% у зависности од врсте ткива (Xavier и сар., 2010). Ови резултати су добијени анализом 15 различитих ткива. Са друге стране Branscom и сар. су 2019. године од једне животиње узимали по 12 узорака ткива укључујући ткиво тестиса, епидидимиса, ампула, сјемених кесица, булбоуретралних жлијезда, ингвиналних и медијалних илијачних лимфних чворова. Осјетљивост PCR теста у овој студији се кретала између 0-45%, при чему је осјетљивост из ткива тестиса износила свега 0-5 % а из ткива епидидимиса 35-45%. Важно је истаћи да је у овој студији која је обухватила 20 иницијално серолошки реактивних овнова на поновљеном серолошком тестирању било четири негативна резултата, као и да отприлике половина овнова није имала клиничке и хистопатолошке промјене у репродуктивним органима. Имајући у виду да су се у студији за потребе ове дисертације користила два збирна узорка ткива тестиса и епидидимиса добијени резултати не изненађују. Из тог разлога неки аутори препоручују узимање узорака у дупликату или чак трипликату да би се повећала шанса добијања позитивног налаза (Branscom и сар., 2019).

У овој студији у зависности од типа молекуларног теста и екстракционог кита осјетљивост варира између 21,1% и 52,6%. Ако посматрамо цијели експеримент 73,68% (14/19) овнова је имало позитиван резултат код барем једног збирног узорка репродуктивног ткива на барем у једној од четири различите комбинације екстракционих протокола и типа молекуларно генетичких испитивања (PCR, Real time PCR). Са друге стране само четири збирна узорка репродуктивног ткива су дала позитивне резултате код све четири комбинације екстракционих и PCR протокола. Ако се све четири комбинације екстракционих и PCR протокола посматрају одвојено онда су само два овна имала позитиван резултат код оба збирна узорка репродуктивног ткива. Овакав налаз потврђује да би се од једне животиње требало узимати више узорака чиме се повећава осјетљивост

теста и можда би се могао објаснити добро познатом чињеницом да су промјене код епидидимитиса овнова чешће једностране него двостране. Ипак, резултати хистопатолошких испитивања ове дисертације указују да су промјене на парним органима по правилу двостране, и обично са нешто интензивнијим промјенама на једном од парних органа. У овом случају много је већа вјероватноћа да у испитујућем узорку није било бруцела или су оне биле присутне у малом броју који је испод лимита детекције молекуларних тестова. Такође, недовољан принос нуклеинске киселине након екстракције као и лоша ефикасност амплификације могли би објаснити недостатак осјетљивости молекуларних тестова. Квалитет и чистоћа ДНК *Brucella spp.* је веома важна приликом извођења PCR-а, нарочито за мултиплекс методе које имају могућност доказивања великог броја врста и варијетета. Било који инхибитор у ДНК узорку из било ког извора може лимитирати осјетљивост ових метода (Yu и Nielsen, 2010).

Резултати различитих PCR протокола су показали значајан ниво неслагања иако су код свих коришћени исти збирни узорци ткива тестиса и епидидимиса. Већи број позитивних резултата код Real time PCR протокола указује на његову већу осјетљивост иако је ова студија обухватила сувише мали број узорака да би се то са сигурношћу тврдило. Према анализи снаге, за поуздане закључке идеалан број узорака би био 220. Занимљива је чињеница да је код Real time PCR протокола са различитим протоколима екстракције ДНК, иако са сличним укупним бројем позитивних резултата запажен значајан степен неслагања. Обје комбинације су користиле исте узорке репродуктивног ткива, исти PCR микс, имале су идентичне термалне профиле и практично једина разлика је била та што је темплат добијан различитим екстракционим протоколима. Постоји реална вјероватноћа да је разлог ове појаве варијабилан принос нуклеинске киселине *B. ovis* након процеса екстракције. Резултати добијени од стране неколико аутора сугеришу да се различити екстракциони протоколи разликују у приносима нуклеинске киселине, њиховој репродуктивности и линеарности (Yang и сар., 2011; Cook и сар., 2018).

Када се пореде класични и Real time PCR протоколи примјећује се да су скоро сви узорци који су имали позитиван резултат на класичном PCR-у били позитивни и на Real time PCR протоколу са изузетком једног узорака који потиче од овна бр. 16. Са друге стране 12 узорака, по шест у оба екстракциона протокола су имали негативан резултат на класичном а позитиван резултат на Real time PCR протоколу. Класични и Real time PCR протоколи су користили исте екстракте што значи да је ДНК *B. ovis* била присутна у екстрактима који су били позитивни на Real time PCR протоколу али Bruce-ladder multiplex PCR протокол није успјео да је детектује. Ова чињеница указује да је класични PCR протокол показао нижу осјетљивост вјероватно као последицу ниске концентрације циљне ДНК у темплатима. Важно је напоменути да су класични и Real time PCR протоколи имали различите таргет секвенце генома *B. ovis* те да њихови приноси у току процеса екстракције могу варирати. Разлике у резултатима класичне PCR методе и Real time PCR методе могу бити последица

различитих амплификационих протокола који су коришћени, различитих принципа амплификације, детекције умножене ДНК и коришћених реагенаса. Студија спроведена у Египту 2021. године је потврдила већу дијагностичку осјетљивост Real time PCR-а у односу на класични PCR у дијагностици бруцелозе говеда (Abdel-Hamid и сар., 2021).

Свих 19 узорка препуцијалних брисева као и два узорка вагиналних брисева код којих је екстракција ДНК вршена QIAamp Cador Pathogen mini китом били су негативни на присуство *B. ovis*. Такође, сва четири узорка препуцијалних брисева као и два узорка вагиналних брисева код којих је ДНК екстрахована GeneJET Genomic DNA Purification китом били су негативни на присуство *B. ovis*. Нека истраживања упућују да препуцијални/вагинални брис може бити валидан узорак за детекцију *B. ovis* ДНК Real time PCR методом (Xavier и сар., 2010; Galluzzo и сар., 2021). Развијен је *B. ovis* PCR тест који за препуцијални/вагинални брис има лимит детекције од 1 CFU/ml и чије су осјетљивост и специфичност сличне оној код бактериолошког испитивања (Xavier и сар., 2010). Резултати истраживања ове дисертације показују да препуцијални/вагинални брис ни у ком случају не може бити валидан узорак приликом постављања дијагнозе епидидимитиса овнова. Доказано је да се *B. ovis* повремено излучује сјеменом и урином, и највјероватније да препуцијална/вагинална слузница иако примарна мјеста уласка бактерија у организам нису мјесто њиховог задржавања. Овако лоша осјетљивост молекуларних тестова могла би бити због неадекватних или неефикасних протокола екстракције ДНК који су коришћени, мале концентрације бруцела или њиховог потпуног одсуства у испитујућим узорцима (Navarro и сар., 2004; Mitka и сар., 2007). Лажно негативни резултати се такође могу добити из других разлога као што су присуство EDTA, РНК-аза, ДНК-аза, хема, хепарина, фенола, полиамина, биљних полисахарида, урина, калцијум алгината и можда још неких реагенаса (Wiedbrauk и сар., 1955; Yu и Nielsen, 2010).

Ниједан од 21 узорка пуне крви код којих је ДНК екстрахована QIAamp Cador Pathogen mini китом као ни 6 узорака пуне крви код којих је ДНК екстрахована GeneJET Genomic DNA Purification китом није имао позитиван резултат на присуство ДНК *B. ovis*. Сличне резултате су добили и Xavier и сар. 2010. године. У овој студији девет овнова је вјештачки инфицирано *B. ovis* и сви овнови су развили серолошки одговор, а многи од њих су имали и клиничке и хистопатолошке промјене на репродуктивним органима. У трајању од шест мјесеци животињама је у двонедељним интервалима узимана крв и ни у једном тренутку није добијен позитиван како бактериолошки тако и PCR налаз. Након инфекције преко препуцијалне, вагиналне, ороназалне, конјунктивалне или ректалне слузнице *B. ovis* преко аферентних лимфних судова и регионалних лимфних чворова улази у крвоток и разноси се по цијелом организму (Ridler и сар., 2014). Бруцеле се затим локализују у епидидимисима, сјеменим кесицама, булбоуретралним жлијездама, ампулама и мокраћној бешици. *B. ovis* остаје у крвотоку кратак временски период и бактеријемиа је врло

вјероватно јако ниског интензитета што крв чини лошим узорком у PCR дијагностици епидидимитиса овнова. Међутим, могућност губитка нуклеинске киселине бруцела током процеса екстракције из крви не смије се искључити. Код људи, испирање узорака крви неколико пута са водом или пуфером за лизирање до потпуног ишчезавања хемоглобина прије екстракције ДНК значајно повећава осјетљивост (Miller и сар., 1988). PCR протокол који садржи овакву процедуру испирања крви, већи број циклуса на термосајклеру (40 умјесто 35) и прајмере специфичне за ген који кодира *Brucella* површински солима екстрактибилан протеин (BCSP) 31-kDa може детектовати бруцеле у концентрацији од 700 CFU/mL у периферној крви људи (Baddour и Alkhalifa, 2008).

Од клинички палпабилних промјена код испитиваних овнова уочена је асиметрија скротума (63,16%), унилатерално увећање репа епидидимиса (63,16%), увећање главе епидидимиса (31,58%), болност (21,05%), покретљивост у скротуму (57,89%) и чвршћа конзистенција тестиса и епидидимиса (47,37%). Описане промјене и њихова фреквенција појављивања су сагласне промјенама описаним код других аутора (Ridler и сар., 2006, 2014).

Макроскопским испитивањем тестиса и епидидимиса овнова утврђен је низ промјена. На глави епидидимиса спермоциста је уочена код 5,26%, некротичне промјене запажене су код 15,79%, док су хипертрофија главе и репа епидидимиса утврђене код 31,58% испитаних овнова. Макроскопски, фибротичне промјене на епидидимису биле су изражене код 15,79% испитаних овнова. Сличне промјене описали су и други аутори (Galluzzo и сар., 2021), (Silva и сар., 2015), (Petrović и сар., 2014).

Фиброза тестиса макроскопски је запажена код 36,84% овнова, калцификација код 15,79%, а атрофија код 21,05% овнова. Према подацима које су добили Kennedy и сар. (1956) атрофија тестиса се јавља уколико се на тестисима налазе прираслице. Код атрофичних тестиса присутни су фокуси стазе сперме, грануломи и калцификација са околном зоном фиброзе (Kennedy и сар., 1956).

Микроскопским прегледом препарата ткива тестиса и епидидимиса бојених хематоксилином и еозином код свих испитаних овнова утврђен је низ промјена различитог дијагностичког значаја. Према литературним подацима других аутора код инфекције *B. ovis* прве микроскопске промјене се уочавају на репу епидидимиса и тек касније се могу проширити на тијело и главу овог органа (Biberstein и сар., 1964).

У каналићима епидидимиса код свих испитаних овнова утврђена је дегенерација, вакуолизација и хиперплазија епителних ћелија. Унутар хиперпластичног епитела дошло је до развоја интраепителних цисти у које су мигрирали неутрофилни гранулоцити што је код 26,32% испитаних овнова довело до формирања микроапсцеса. Према бројним наводима из литературе хиперплазија епитела епидидимиса је промјена карактеристична за бруцелозу овнова. Такође описане су и метапластичне промјене са нерегуларним

распоредом ћелијских једара која су изгубила карактеристичан базални распоред и насумично су оријентисана. Ове промјене су често сегменталног карактера и обично почињу и најинтензивније су у дисталном дијелу репа епидидимиса. (Kennedy и сар., 1956; Viberstein и сар., 1964; Marin и сар. 1989; Ridler и сар, 2012; McCollum и сар. 2013). Услед поменуте хиперплазије код једног испитаног овна дошло је до сужења лумена каналића епидидимиса што је проузроковало спермостазу, док је код 26,32% испитаних овнова утврђена атрофија епителних ћелија каналића епидидимиса и у лумену овних каналића се не уочавају сперматозоиди.

Свакако је најзначајнији налаз едема и инфилтрације моноклеарним ћелијама инфламације - лимфоцити, плазма ћелије и макрофаги у интерстицијуму епидидимиса. Поменуте промјене су запажене код 68,42% испитаних овнова и описане промјене одговарају налазу епидидимитиса. Овакав налаз је карактеристичан и описан од стране других аутора, који описују дифузни најчешће периваскуларно оријентисани моноклеарни инфилтрат кога чине преодминантно плазма ћелије. Описане промјене на епителу епидидимиса доводе до изласка сперме из каналића епидидимиса при чему сперматозоиди који се нађу слободни у интерстицијуму епидидимиса провоцирају инфламаторну реакцију, често хроничног грануломатозног карактера (Kennedy и сар., 1956; Viberstein и сар., 1964; Marin и сар. 1989; Ridler и сар, 2012; McCollum и сар. 2013), што је и описано код једног испитаног овна. Према наводима других аутора сперматични грануломи се готово увјек јављају у епидидимисима, при чему грануломатозна реакција замјењује интратубуларну неутрофилну реакцију. Такође, запажено је да у тубулима у којим је дошло до фокалног изласка сперме из каналића епидидимиса, повремено долази до сквамозне метаплазије епитела. (Kennedy и сар., 1956). Поред моноклеарног инфламаторног инфилтрата у интерстицијуму у хроничном току се јавља дифузна фиброза (Kennedy и сар., 1956) што је такође запажено код испитиваних овнова.

Дегенеративне промјене различитог степена уочене су у тестисима код свих испитаних овнова и карактерисале су се вакуолизацијом Сертолијевих ћелија, ексфолијацијом герминативних ћелија и смањивањем степена сперматогенезе која се манифестовала изостајањем матурације сперматозоида, апоптозом и некрозом сперматиде као и формирањем мултинуклеарних ћелија које се уочавају у лумену сјемених каналића. Код веома изражених дегенеративних промјена сјемени каналићи су готово празни са појединачним дегенерисалим Сертолијевим ћелијама. Промјене се запажају и на базалној мембрани у виду њеног задебљања. Viberstein и сар. сматрају да су промјене на тестисима блаже него на епидидимисима и да су углавном у форми неспецифичне дегенерације са паралелним промјенама на пасјеменицима (Viberstein и сар., 1964), док Hall сматра да су фокална стаза сперме и тубуларна дегенерација у тестисима чешће примарне него секундарне због оклузије епидидимиса (Hall, 1955).

Узроци настанка дегенеративних промјена на тестисима су бројни: старост, хемијски агенси, топлота, хормони, неоплазма хипофизе, нутритивни дисбаланси, биљке, радијација, стрес/терапија кортикостероидима, траума, ултразвук, вирусне инфекције. Нарочито је значајно да се као један од значајних узрока дегенеративних промјена на тестисима наводе инфламаторни процеси на епидидимису (Foster и Premanandan, 2022).

У хроничном току дегенеративне промјене доводе до макроскопски уочљиве атрофије тестиса који су смањеног обима и чвршће конзистенције (Foster и Premanandan, 2022).

Поред дегенеративних промјена хистопатолошки је утврђена фиброза тестиса која се карактерисала умножавањем везивно-ткивних ћелија и влакана у интерстицијуму тестиса. Фиброза се јавља у хроничном току различитих патолошких процеса (Ackermann, 2022). Такође је утврђена калцификација тестиса која се карактерисала акумулацијом базофилних, хомогених безструктурних депозита калцијумових соли интратубуларно, у интерстицијуму и базалној мембрани сјемених каналића. Дистрофична калцификација је патолошки процес таложења калцијумових соли у девитализованим и дистрофичним ткивима при чему је ниво калцијума у крви нормалан. Такође, у литератури је описано да уколико се развије спермостаза на њу се често надовезује инфламаторни процес, стварање сперматичних гранулома и калцификација (Cheville NF, 2006; Foster и Premanandan, 2022). Код једног овна уочен је интерстицијални орхитис који се карактерисао инфилтрацијом лимфоцитима, макрофагама и плазма ћелијама у интерстицијуму тестиса. Иако мање фреквентни од епидидимитиса орхитиси се најчешће јављају управо истовремено са инфламацијом епидидимиса и најчешће их изазивају бактерије (Foster, 2016).

Прије анализирања статистичких података везаних за хистопатолошке промјене важно је нагласити да су се градације промјена (од 0 до 4) вршиле посматрањем хистопатолошких препарата без егзактних критеријума што је могло довести до пристрасности у добијеним резултатима.

Негативна корелација између присуства сперме и дегенеративних промјена у тестисима је очекивана с обзиром на то да већи степен дегенерације у сјеменим каналићима директно проузрокује смањење обима сперматогенезе. Позитивна корелација између дегенерације и фиброзе у тестисима може се објаснити тиме да код хроничних инфламаторних процеса каква је бруцелоза долази до дегенерације ткива која даље последишно стимулише фиброзни одговор организма.

Умјерена до јака позитивна корелација између дегенерације/вакуолизације епитела епидидимиса и присуства ћелија инфламације очекивана је код хроничних инфекција, која често представљају основни стимулус за дегенеративне промјене у епителу. Хронична инфекција индукује активацију имунолошког одговора, укључујући миграцију различитих типова имунолошких ћелија ка локацији запаљења. Присуство инфламаторних ћелија у овом контексту не само што је индикатор активне имунске реакције, већ такође доприноси оштећењу епитела путем локалног излучивања инфламаторних медијатора, укључујући

цитокине и хемокине. Ови медијатори могу иницирати молекуларне промјене у епителу, резултирајући дегенеративним процесима и оштећењем ћелијске функције. Веза између дегенерације и инфламације представља својеврстан зачарани круг, гдје хронична инфламација и дегенеративни процес допуњавају и подстичу један други. Пошто су оба процеса динамична и дуготрајна, њихова веза може континуирано утицати на стање епитела током времена. Такође, сматра се да излазак сперматозоида из оштећених сјемених каналића значајно доприноси интензитету инфламаторних промјена (Kennedy и сар., 1956).

У овом истраживању утврђена је умјерена позитивна корелација едема интерстицијума, са хиперемијом и дилатацијом каналића епидидимиса. Ове патолошке промјене у ткиву епидидимиса вјероватно се развијају синергетски, доприносећи заједничком укупном стању промјена које карактеришу запаљенске и вазодилаторне процесе. Едем интерстицијума, као резултат патолошког кумулативног нагомилавања течности у ткиву, често је пратећа појава у просторима гдје постоје хиперемија и дилатација каналића. Хиперемија, која означава повећано накупљање крви у ткиву или органу, утиче на пуноћу крвних судова у интерстицијуму. Истовремено, дилатација каналића епидидимиса, као реакција на хиперемију, може допринјети ослобађању течности у интерстицијум.

Умјерена до јака негативна корелација између фиброзе и едема интерстицијума епидидимиса истиче сложеност патолошких процеса у овом ткиву. Едем интерстицијума могао би имати улогу у патогенези фиброзе, кроз стимулацију различитих инфламаторних или фиброзних процеса. Смањено дренажање течности или дисфункција лимфатичног система у условима едема може допринјети патолошким процесима који укључују фиброзу. Даље, присуство фиброзе у епидидимису доприноси промјени у микроархитектури ткива и индукује компресију интерстицијума. Овакво стање могло би довести до смањеног едема, јер компресија интерстицијума може смањити слободан простор за нагомилавање течности.

У кластер анализи хистопатолошких промјена на тестисима и епидидимисима вршено је груписање узорака на основу сличности у присуству различитих патолошких карактеристика. Кластер анализа промејна на тестисима довела је до формирања пет кластера уз велики степен неслагања три коришћена модела кластерована и појаву недефинисаних кластера што упућује на одсуство хистопатолошких промјена на тестисима које би могле формирати одређене обрасце. Са друге стране резултати кластер анализе епидидимиса показују да су подаци груписани у два главна кластера, што могуће указује на постојање различитих хистопатолошких фенотипова епидидимитиса или се ради о различитим фазама јединственог процеса. Silhouette индекс варира од -1 до 1, где су вриједности ближе 1 показатељ доброг раздвајања кластера, а ближе 0 указују на преклапање. Са вриједношћу од 0,2719, постоји одређено раздвајање, али може се побољшати. Hartigan индекс мјери густину кластера а вриједност од 0,9900 указује на

релативно густе кластере. Calinski & Harabasz индекс, који мјери компактност и раздвајање кластера, са вриједношћу од 17,7665 сугерише релативно добро компактно кластеровање. У цјелини, ови индекси показују да постоји неко раздвајање између кластера, али је потребно побољшати компактност и раздвајање за боље кластеровање.

Резултати Tukey теста су потврдили да постоји статистички значајна разлика између кластера 1 и 2 за све променљиве које су анализирани изузев за старост овнова. Ово додатно потврђује да постоји хетерогеност у патолошким процесима између ове двије групе. У првом кластеру, примјећује се доминација промјена у виду инфилтрације запаљенским ћелијама, дегенерације и вакуолизације епитела, као и присуство фиброзе. Ове промјене указују на присуство хроничне упалне реакције у епидидимисима као последицу хроничне инфекције *B. ovis*. Такође, присуство фиброзе сугерише на процес ремоделовања ткива које се јавља као одговор на хроничну иритацију или оштећење. У другом кластеру, евидентно је да доминирају промјене попут дилатације каналића, хиперемije, едема интерстицијума и већег присуства сперме. Ове промјене могу бити последица различитих стања, укључујући механичке сметње у протоку сперматозоида и васкуларне поремећаје као реакцију на инфекцију *B. ovis*. Израженије присуство сперме у овом кластеру може указивати на очуваније нормалне физиолошке процесе. Важно је напоменути да се старост овнова није статистички значајно разликовала међу кластерима. Ипак, услови под којим је истраживање спроведено односно податак да се код ових животиња радило о природној инфекцији непознатог тока трајања не искључује могућност да би добијени кластери могли бити повезани са старошћу патолошког процеса. Анализом добијених кластера долази се до закључка да би критеријум раздвајања могао бити дужина трајања патолошког процеса на репродуктивним органима. Промјене у првом кластеру указују на изражен хроничитет јер већи степен фиброзе и мањак сперме указују да се ради о хроничном процесу који нарушава нормалан процес сперматогенезе. Промјене у другом кластеру дјелују да су акутније, краћег тока. Хиперемija и едем су обично карактеристични за акутна запаљења, а такође и веће присуство сперме у другом кластеру указује да се ради о процесу који краће траје те је из тог разлога и сперматогенеза очуванија. Ова хипотеза се не може доказати јер је код овнова у овој студији инфекција била непознатог тока трајања. Ипак, добијени резултати наглашавају снагу кластеровања чији највећи квалитет јесте могућност проналажења образаца међу подацима који нису лако уочљиви пуким прегледом.

Када се посматрају старост овна и интензитет патоморфолошких промјена било би очекивано да су оне повезане. Међутим, у овој студији корелације између старости овнова и интензитета промјена на репродуктивним органима су ниске. Овдје је битно истаћи да се код овних животиња ради о инфекцији непознатог тока трајања, као и да постоји могућност да подаци о њиховој старости можда нису вјеродостојни што све може унијети пристрасност у добијене резултате. У овој студији примјећује се да су вриједности

корелација између већине хистопатолошких промјена и старости негативне што значи да је већина хистопатолошких промјена мање изражена код старијих овнова.

Резултати регресионе анализе као и матрикс корелације указују на низак степен повезаности старости овна са било којом хистопатолошком промјеном како на тестисима, тако и на епидидимисима. Анализа је извођена на такав начин да је старост била независна (предиктор) варијабла док су патолошке промјене биле зависне (таргет) варијабле, односно конструисани су модели линеарне регресије који су покушали да на основу старости овна предвиде интензитет појединих хистопатолошких промјена. Регресиона анализа је потврдила да не постоји значајна повезаност промјена на репродуктивним органима и старости животиња. R^2 вриједност која мјери дио укупне варијабилности у патолошким промјенама која је објашњена старашћу је за све промјене мања од 10%. Такође, патолошке промјене на тестисима и епидидимисима показују да старост овнова нема статистички значајану повезаност ни са једном промјеном јер су $P > F$ вриједности веће од нивоа значајности 0,05. Треба истаћи да регресиона анализа објашњава само линеарну зависност између старости овнова и интензитета патолошких промјена, док остали фактори који нису укључени у ово истраживање могу допринјети неизвјесности резултата.

У студији о процјени ризика од инфекције *B. ovis*, анализирана је коваријанса старости и интензитета хистопатолошких промјена. Иако су постојала очекивања о повезаности између старости и интензитета патолошких промјена, резултати нису показали њихову значајну корелацију. Овакви неочекивани налази указују на комплексност биолошких процеса и наглашавају потребу за додатним истраживањем како би се боље разумјела улога старости животиње и дужине трајања инфекције у развоју патолошких промјена на репродуктивним органима. Имајући у виду да је студија обухватила природну инфекцију која је имала непознат ток трајања, потребно је узети у обзир да је трајање процеса могло варирати што је утицало на манифестацију патолошких промјена. Ово додатно наглашава потребу за пажљивим праћењем и истраживањем како би се боље разумјела динамика болести.

Резултати студије о повезаности PCR резултата и интензитета хистопатолошких промјена у тестисима и епидидимисима показују да између њих не постоји статистички значајна повезаност. Циљ овог истраживања био је испитати евентуалну повезаност између одређених хистопатолошких параметара и резултата молекуларно гентичких испитивања. Приликом узимања узорак репродуктивних органа након орхидектомије, један дио истог узорка је коришћен за хистопатолошку анализу док је други део коришћен у молекуларним испитивањима. Постоји могућност да је позитиван PCR резултат (присуство *B. ovis* у узорцима ткива) у корелацији са интензитетом патолошких промјена. Ова анализа имала је за циљ дубље разумјевање веза између молекуларних и хистопатолошких карактеристика и требала је да пружи допринос у разумјевању

комплексности патолошких процеса у репродуктивним органима овнова инфицираних *B. ovis*. Ово истраживање рађено је на нумеричким подацима који се крећу од 0 до 4 и двије групе узорака, Bruce ladder multiplex PCR позитивним и негативним. Како би се тестирала хипотеза о разликама између ових група коришћена су два теста, непараметријски тест за независне узорке Man-Whitney U који се користи за упоређивање расподеле нумеричких података двије независне групе података и т-тест за независне узорке. Добијени резултати подржавају хипотезу о одсуству корелације између присуства *B. ovis* у ткиву и тежине патолошких промјена. Један од најзначајнијих аспеката овог истраживања је у томе што су молекуларно генетичка и хистопатолошка истраживања рађена на истим узорцима, што омогућава директно упоређивање резултата. Важно је напоменути да се у оваквим истраживањима могу појавити неки изазови. На пример, иако су анализе базиране на нумеричким подацима, можда постоје додатни фактори који би могли утицати на резултате. Одабир непараметријског Man-Whitney U теста био је одговарајући за анализу ових података, али такође постоје и лимитације у виду осјетљивости на величину узорка, неадекватности код интервалних података и прерачунавање података у рангове што може уклонити неке информације. Т-тест је такође имао своје лимитације због чињенице да подаци за све патолошке промјене нису имали нормалну расподелу података и једнаку варијабилност.

Логистичка регресија и *Random Forest* класификатор су алгоритми надгледаног машинског учења који подразумевају да су у подацима за тренирање модела присутне вриједности таргет варијабле (у овом случају PCR статус) и користе се у класификацијске сврхе. Такође су конструисани модели *k-means* и хијерархијског кластеровања који као представници ненадгледаног машинског учења разврставају иницијални сет података у одговарајући број група (кластера). Сви модели машинског учења су показали да не постоји веза између PCR резултата и интензитета хистопатолошких промјена у тестисима и епидидимисима.

У случају епидидимитиса код овнова, често је забиљежено да су макроскопске промјене присутне само на једном тестису и епидидимису, или су пак присутне на оба али изражене са различитим интензитетом (Ridler и сар., 2006, 2014; Galuzzo и сар., 2021). Ова студија је показала да су микроскопске промјене присутне у оба парна репродуктивна органа, али интензитет ових промјена у њима статистички варира.

Испитивање интензитета промјена на тестисима и епидидимисима код овнова изазваних *B. ovis* требало би резултирати закључком да су промјене у епидидимисима израженије у односу на промјене у тестисима, како се углавном и наводи у литератури (Blasco и сар., 2014). У истраживању које је извршено на хистопатолошким промјенама тестиса и епидидимиса овнова, фокус је био на интензитету промјена, укључујући фиброзу и дегенерацију. У случају фиброзе, резултати указују на значајно израженије фиброматозне промјене на епидидимисима у односу на тестисе. Дистрибуција података за фиброматозне

промјене није у складу са нормалном расподелом, те су коришћени Wilcoxon-ов и Man-Whitney U тестови. Резултати су показали статистички значајне разлике у интензитету фиброматозних промјена између тестиса и епидидимиса, што је потврђено на нивоу значајности од 0,05. У оквиру истраживања дегенеративних промјена на тестисима и епидидимисима овнова, примјећено је да је сумарни скор за дегенеративне промјене био нешто већи за тестисе него за епидидимисе, што указује на благо израженије дегенеративне промјене на тестисима. Анализа дистрибуције података за дегенерацију приказала је типичан облик за нормалну расподелу, што је било различито у односу на фиброзу. Због тога су за статистичку анализу коришћени независни и зависни т-тест. Резултати ових тестова показују да нема статистички значајних разлика у интензитету дегенеративних промјена између тестиса и епидидимиса, на нивоу значајности од 0,05, што утврђује хомогенизацију у интензитету дегенеративних промјена оба репродуктивна органа. Поред оваквих резултата намеће се закључак да су у епидидимисима присутне инфламаторне и дегенеративне промјене док у тестисима доминирају дегенеративне промјене. Сличне закључке имали су и Viberstein и сарадници, 1964. године.

7. ЗАКЉУЧЦИ

На основу добијених резултата изведени су следећи закључци:

1. Коришћењем индиректног *ELISA* теста утврђена серопреваленција бруцелозе изазване врстом *B. ovis* у некомерцијалном стаду оваца износила је 25,4%, при чему је било 69,7% серопозитивних овнова и 3,3% серопозитивних оваца.
2. Примјеном Bruce-ladder multiplex PCR методе код којих је ДНК *B. ovis* екстрахована QIAamp Cadon Pathogen mini китом из узорака хомогенизованих тестиса и епидидимиса добијено је 6 позитивних узорака (15,79%), док су коришћењем GeneJET Genomic DNA Purification кита за екстракцију ДНК *B. ovis* добијена четири позитивна узорка (10,53%)
3. Примјеном Real time PCR методе код којих је ДНК *B. ovis* екстрахована QIAamp Cadon Pathogen mini китом из узорака хомогенизованих тестиса и епидидимиса добијено је 11 позитивних узорака (28,95%), док је коришћењем GeneJET Genomic DNA Purification кита за екстракцију ДНК *B. ovis* добијено 10 позитивних узорака (26,32%).
4. Real time PCR протокол показао је нешто већу осјетљивост у односу на Bruce-ladder multiplex PCR протокол.
5. Молекуларни тестови су у поређењу са индиректним ЕЛИСА тестом показали значајан недостатак осјетљивости. Од 19 серопозитивних овнова 26,3% имало је негативне резултате у оба збирна узорка репродуктивног ткива за све протоколе екстракције ДНК и PCR протоколе, док су пуна крв и препуцијални и вагинални брисеви били негативни.
6. Клинички промјене на репродуктивним органима серолошки позитивних овнова манифестовале су се асиметријом скротума, унилатералним увећањем репа епидидимиса (63,16%), увећањем главе епидидимиса (31,58%), болношћу (21,05%) и чвршћом конзистенцијом тестиса и епидидимиса (47,37%).
7. Макроскопским испитивањем на епидидимису су на глави уочене спермоцисте (5,26%), некротичне промјене (15,79%), хипертрофија главе и репа (31,58%) и фиброза код 15,79%, док је на тестисима запажена фиброза (36,84%), калцификација (15,79%) и атрофија (21,05%).
8. Микроскопске промене на тестисима уочене су код свих серолошки позитивних овнова и биле су у форми дегенерације тестиса која се карактерисала дегенеративним промјенама герминативних и Сертоли ћелија, смањивањем степена

сперматогенезе, формирањем мултинуклеарних ћелија и задебљањем базалне мембране сјемених каналића, фиброзом и калцификацијом тестиса као и инфилтрацијом интерстицијума мононуклеарним инфламаторним ћелијама (лимфоцитима, макрофагима и плазма ћелијама).

9. У каналићима епидидимиса свих серолошки позитивних овнова уочена је дегенерација, вакуолизација и хиперплазија епителних ћелија са формирањем интраепителних циста и микроапсеса (26,32%); спермостаза (5,26%); атрофија епителних ћелија каналића епидидимиса (26,32%). Такође је уочена и фиброза епидидимиса, као и грануломи са некротичним центром. Код 68,42% серолошки позитивних овнова уочена је инфилтрација интерстицијума епидидимиса мононуклеарним инфламаторним ћелијама (лимфоцитима, макрофагима и плазма ћелијама), што је налаз карактеристичан за епидидимитис.
10. Кластер анализа за хистопатолошке промјене на тестисима показала је одсуство формирања значајних образаца између промјена. Формирана су два кластера промјена на епидидимисима при чему би критеријум раздвајања могао бити дужина трајања патолошког процеса.

8. ЛИТЕРАТУРА

1. Abdel-Hamid N.H., Beleta E.I.M., Kelany M.A., Ismail R.I. Shalaby N.A., Khafagi M.H.M. (2021). Validation of real-time polymerase chain reaction versus conventional polymerase chain reaction for diagnosis of brucellosis in cattle sera. *Vet World*. Jan;14(1):144-154. doi: 10.14202/vetworld.2021.144-154. Epub Jan 19. PMID: 33642798; PMCID: PMC7896886.
2. Ackermann M.R. (2022). Inflammation and Healing, in *Pathologic basis of veterinary disease* editor Zachary JF, seventh edition, Elsevier
3. Ajai C.O., Cook J.E., Dennis S.M. (1980). Diagnosis of ovine epididymitis by immunofluorescence. *Vet. Rec.*, 107: 421-424.
4. Al-Katib W.A., Dennis S.M. (2009). Ovine genital actinobacillosis: a review. *N.Z. Vet. J.* 57: 352-358.
5. Alton G.G. (1978). Recent developments in vaccination against bovine brucellosis. *Aust. vet. J.* 54: 551.
6. Alton G.G., Jones L.M., Angus R.D., Verger J-M. (1988). *Techniques for the brucellosis laboratory*. Paris: INRA.
7. Aragón-Aranda B., de Miguel M.J., Martínez-Gómez E., Zúñiga-Ripa A., Salvador-Bescós M., Moriyón I., Iriarte M., Muñoz P.M., Conde-Álvarez R. (2019). Rev1 wbd tagged vaccines against *Brucella ovis*. Published online 2019 Nov 15. doi: 10.1186/s13567-019-0714-3.
8. Arellano-Reynoso B., Lapaque N., Salcedo S., Briones G., Ciocchini A.E., Ugalde R., Moreno E., Moriyón I., Gorvel J.P. (2005). Cyclic beta-1,2-glucan is a *Brucella* virulence factor required for intracellular survival. *Nat Immunol.* Jun; 6(6): 618-25.
9. Ariza J., Bosilkovski M., Cascio A., Colmenero J.D., Corbel M.J., Falagas M.E., Memish Z.A., Roushan M.R., Rubinstein E., Sipsas N.V., Solera J., Young E.J., Pappas G. (2007). Perspectives for the treatment of brucellosis in the 21st century: the Ioannina recommendations. *PLoS Med.* Dec; 4(12): e317.
10. Arsenault J., Girad C., Dubreuil P., Belanger D. (2004). Lack of evidence of *Brucella ovis* infection in rams in Quebec. *Can Vet J.* 45: 312-314.

11. Baddour M.M., Alkhalifa D.H. (2008). Evaluation of three polymerase chain reaction techniques for detection of *Brucella* DNA in peripheral human blood. *Can J Microbiol.* May;54(5):352-7. doi: 10.1139/w08-017. PMID: 18449219.
12. Bagley C.V., Healey M.C., Sisson D.V. (1989). Problems related to eradication of *Brucella ovis* from Utah range Hocks. *Proc WRCC-46 Conf*, pp 110-116.
13. Bagley C.V., Paskett M.E., Matthews N.J., Stequist N.J. (1985). Prevalence and causes of ram epididymitis in Utah. *J Am Vet Med Assoc.* 186: 798-801.
14. Bakurjiev K., Krustev H. (1976). Autophagocytosis of spermatozoa in rams with a *Brucella ovis* infection. *Vet. Med. Nauki*, 13: 44-51.
15. Bakurjiev K., Krustev H. (1977). Ultrastructural changes in the spermatozoa of rams infected with *Brucella ovis*. *Vet. Med. Nauki*, 14: 3-12.
16. Bakurjiev K., Krustev H. (1978). Ultrastructural changes in testis and epididymis of rams with infectious epididymitis. *Vet. Med. Nauki*, 15: 44-52.
17. Bakurjiev K., Stoyanov T. (1977). Cholinesterase activity of semen from rams infected with *Brucella ovis*. *Vet. Med. Nauki*, 14: 46-51.
18. Barquero-Calvo E., Chaves-Olarte E., Weiss D.S., Guzmán-Verri C., Chacón-Díaz C., Rucavado A., Moriyón I., Moreno E. (2007). *Brucella abortus* uses a stealthy strategy to avoid activation of the innate immune system during the onset of infection. *PLoS One*; 2:e631. doi: 10.1371/journal.pone.0000631
19. Barrio M.B., Grilló M.J., Muñoz P.M., Jacques I., González D., de Miguel M.J., Marín C.M., Barberán M., Letesson J.J., Gorvel J.P., Moriyón I., Blasco J.M., Zygmunt M.S. (2009). Rough mutants defective in core and O-polysaccharide synthesis and export induce antibodies reacting in an indirect ELISA with smooth lipopolysaccharide and are less effective than Rev 1 vaccine against *Brucella melitensis* infection of sheep. *Vaccine.* Mar 10; 27(11): 1741-9.
20. Beh K.J. (1973). Distribution of *Brucella* Antibody among Immunoglobulin Classes and a Low Molecular Weight Antibody Fraction in Serum and Whey of Cattle *Res. vet. Sci.* 14: 381.
21. Biberstein E.L., McGowan B., Olander H., Kennedy P.C. (1964). Epididymitis in rams. Studies on pathogenesis. *Cornell Vet.*, 54: 27-41.
22. Biberstein E.L., McGowan Jr., B., Robinson E.A., Harrold D.R. (1962). Epididymitis in rams. Studies on immunity. *Cornell Vet.*, 52: 214-227.
23. Blasco J.M. (1990). *Brucella ovis*. In: Nielsen K, Duncan JR, editors. *Animal Brucellosis*. Boca Raton: CRC Press; pp. 351–78.
24. Blasco J.M. (2010). *Brucella ovis* infection. In: Lefeuvre P.C., Blancou J., Chermette R., Uilenberg G., editors. *Infectious and Parasitic Diseases of Livestock. Volume 2*. Lavoisier; Paris, France: pp. 1047–1063.
25. Blasco J.M., Gamazo C., Winter A.J., Jiménez de Bagüés M.P., Marín C., Barberán M., Moriyón I., Alonso-Urmeneta B., Díaz R. (1993). Evaluation of whole cell and

- subcellular vaccines against *Brucella ovis* in rams. *Vet Immunol Immunopathol.* Aug;37(3-4):257-70.
26. Blasco J.M., Molina-Flores B. (2011). Control and eradication of *Brucella melitensis* infection in sheep and goats. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* Mar;27(1):95-104.
 27. Blasco, J.M. (1990). *Brucella ovis*. In: Nielsen K, Duncan JR, editors. *Animal Brucellosis*. Boca Raton, FL, USA: CRC Press; pp. 351-378.
 28. Branscom L.A., Cornish T.E., Sondgeroth K.S. (2019). Evaluation of serologic testing of rams in the management of *Brucella ovis* in a domestic sheep flock. *J Vet Diagn Invest*, 31(1): 86-89. doi: 10.1177/1040638718814591. Epub 2018 Dec 12.
 29. Bricker B.J., Ewalt D.R., Olsen S.C., Jensen A.E. (2003). Evaluation of the *Brucella abortus* species-specific polymerase chain reaction assay, an improved version of the *Brucella* AMOS polymerase chain reaction assay for cattle. *J Vet Diagn Invest.* Jul;15(4):374-8.
 30. Bricker B.J., Halling S.M. (1994). Differentiation of *Brucella abortus* bv. 1, 2, and 4, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis*, and *Brucella suis* bv. 1 by PCR. *J Clin Microbiol.* Nov;32(11):2660-6.
 31. Bricker B.J., Halling S.M. (1995). Enhancement of the *Brucella* AMOS PCR assay for differentiation of *Brucella abortus* vaccine strains S19 and RB51. *J Clin Microbiol.* Jun;33(6):1640-2.
 32. Brinley-Morgan W.J., McCullough N.B. (1974). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Williams and Wilkins Co., Baltimore, MD, 8th edn., pp. 280--282.
 33. Brown G.M., Pietz D.E., Price D.A. (1973). Studies on the transmission of *Brucella ovis* infection in rams. *Cornell Vet.*, 63: 29--40.
 34. Bruss M.L., Bulgin M.S., Anderson B.C. (1981). Ram epididymitis caused by *Hemophilus*-like bacteria. In *Proc 2nd Annu West Conf Food Anim Vet Med*, p 28.
 35. Buddle M.B. (1955). Observation on the transmission of *Brucella* infection in sheep. *NZ Vet J*, 3:10.
 36. Buddle M.B. (1956). Studies on *Brucella ovis* (N. Sp.), a cause of genital disease of sheep in New Zealand and Australia. *J Hyg.*, 54: 351--364.
 37. Buddle M.B., Boyles B.W. (1953). A *Brucella* mutant causing genital disease of sheep in New Zealand. *Aust Vet J*, 29(6):145--153. doi: 10.1111/j.1751-0813.1953.tb05257.x.
 38. Bulgin M.S. (1990). *Brucella ovis* excretion in semen of sero-negative rams classically normal breeding. *Am J Vet Med*, 196:313-315.
 39. Bulgin M.S. (1990). Epididymitis in rams and lambs. *Advances in sheep and goat medicine*, pp. 0749-0720/90.
 40. Bulgin M.S., Anderson B.C. (1983). Association of sexual experience with isolation of various bacteria in cases of ovine epididymitis. *J Am Vet Med Assoc*, 182:372-374.
 41. Burges G.W. (1982). Ovine contagious epididymitis of rams. *Veterinary Microbiology*, pp. 551-575.

42. Buyukcangaz E., Alasonyalilar D.A., Erdenlig S., Misirlioglu S.D. (2013). Epididymitis and orchitis caused by *Brucella melitensis* biovar. 3 in a merino ram. Turk J Vet Anim Sci. 37:358-361.
43. CABI (2019). Brucellosis, *Brucella ovis*. <https://doi.org/10.1079/cabicompendium.90731>.
44. CABI (2019). *Fallopia japonica*. In: Invasive Species Compendium. Wallingford, UK: CAB International. www.cabi.org/isc.
45. Callaghan D., Cazevieille C., Allardet-servent A., Boschioli M.L., Bourg G., Foulongne V., et al. (1999). A homologue of the *Agrobacterium tumefaciens* VirB and *Bordetella pertussis* Ptl type IV secretion systems is essential for intracellular survival of *Brucella suis*. Mol Microbiol, 33:121
46. Cameron R.D.A., Lauerman Jr. L.H. (1976). Characteristics of semen changes during *Brucella ovis* infection in rams. Vet. Rec., 99: 231--233.
47. Carvalho C.A. Jr., Moustacas V.S., Xavier M.N., Costa E.A., Costa L.F., et al. (2012). Andrological, pathologic, morphometric, and ultrasonographic findings in rams experimentally infected with *Brucella ovis*. Small Rumin Res. 102:213–22.
48. Celeghini E.C.C., Gregory L., Pinheiro E.S., Piva F.M., Cameiro P.A.B., Parapinski-Santos B., Bianchi M., Benesi F.J. (2013). Orchiepididymitis in ram by *Salmonella enterica sub. diarizonae*: first case in South America. Arg. Brasil. Med. Ve. Zoot. 65, 139-144.
49. Celli J., De Chastellier C., Franchini D.M., Pizarro-Cerda J., Moreno E., Gorvel J.P. (2003). *Brucella* evades macrophage killing via VirB-dependent sustained interactions with the endoplasmic reticulum. J Exp Med. 198: 545–556. PMID: 12925673.
50. Cheville N.F. (2006). Introduction to Veterinary Pathology, 3rd Edition, Blackwell Publishing
51. Clapp K.H. A comparison of various antigens used in the complement fixation test for ovine brucellosis. (1961). Aust. vet. J. 37: 188.
52. Clapp K.H., Keogh J., Richards M.H. (1962). Epidemiology of ovine brucellosis in South Australia. Aust. Vet. J., 38: 482--486.
53. Claxton P.D. (1968). A comparison of two commercial vaccines and two methods of vaccination. Aust. Vet. J., 44: 48--54.
54. Commission Delegated Regulation (EU) 2018/1629 of 25 July 2018 Amending the List of Diseases Set Out in Annex II to Regulation (EU) 2016/429 of the European Parliament and of the Council on Transmissible Animal Diseases and Amending and Repealing Certain Acts in the Area of Animal Health (Animal Health Law). Brussels, Belgium: 2018.
55. Cook L., Starr K., Boonyaratanakornkit J., Hayden R., Sam S.S., Caliendo A.M. (2018). Does Size Matter? Comparison of Extraction Yields for Different-Sized DNA Fragments by Seven Different Routine and Four New Circulating Cell-Free Extraction Methods. J

- Clin Microbiol. 56(12):e01061-18. doi: 10.1128/JCM.01061-18. PMID: 30282788; PMCID: PMC6258844.
56. Costa L.F., Pessoa M.S., Guimarães L.B., Faria A.K., Morão R.P., Mol J.P., Garcia L.N., Almeida A.C., Gouveia A.M., Silva M.X., Paixão T.A., Santos R.L. (2016). Serologic and molecular evidence of *Brucella ovis* infection in ovine and caprine flocks in the State of Minas Gerais, Brazil. BMC Res Notes. 9:190. doi: 10.1186/s13104-016-1998-2. PMID: 27017445; PMCID: PMC4808293.
 57. Cox J.C., Gorrie C.J.R., Nairn R.C., Ward H.A. (1977). A comparison of methods for the serological diagnosis of *Brucella ovis* infection. Br. vet. J. 133: 442.
 58. Cuba-Caparo A., Myers D.M. (1973). Pathogenesis of epididymitis caused by *Brucella ovis* in laboratory animals. Am. J. Vet. Res., 34: 1077--1085.
 59. Cvetnić Ž., Zdelar-Tuk M., Duvnjak S., Benić M., Mihaljević Ž., Habrun B., Reil I., Cvetnić M., Špičić S. (2017). Infectious epididymitis caused by *Brucella ovis* in Croatian sheep flocks. Turk J Vet Anim Sci, 41:679-685. doi:10.3906/vet-1703-4.
 60. Da Costa Martins R., Irache J.M., Blasco J.M., Muñoz M.P., Marín C.M., Grilló M.J., De Miguel M.J., Barberán M., Gamazo, C. (2010). Evaluation of particulate acellular vaccines against *Brucella ovis* infection in rams. Vaccine. 28(17):3038-46.
 61. Dargatz D.A., Smith H.A., Knight A.P., et al. Antimicrobial therapy for *B. ovis* infection of the urogenital tracts of rams. American Veterinary Medical Journal, 196 (in press).
 62. De la Puente-Redondo V.A., Garcia del Blanco N., Perez-Martinez C., Gonzalez-Rodriguez M.C., Rodriguez-Ferri E.F., Gutierrez-Martin C.B. (2000). Isolation of *Actinobacillus seminis* from the genital tract of rams in Spain. Journal of Comparative Pathology, 122: 217-222.
 63. De Ley J., Manheim W., Segers P., Lievens A., Deninij M., Vanhoucke M., Gillis M. (1987). Ribosomal ribonucleic acid cistron similarities and taxonomic neighborhood of *Brucella* and CDC group Vd. International Journal of Systematic Bacteriology, 37: 35-42.
 64. De Long W.J., Waldhalm D.G., Hall R.F. (1979). Bacterial isolates associated with epididymitis in rams from Idaho and eastern Oregon flocks. American Journal of Veterinary Research, 40: 101-102.
 65. De Miguel M.J., Marín C.M., Muñoz P.M., Dieste L., Grilló M.J., Blasco J.M. (2011). Development of a selective culture medium for primary isolation of main *Brucella* species. doi: 10.1128/JCM.02301-10.
 66. Denes B, Glavitz R. (1994). Bacteriologically confirmed cases of ovine epididymo-orchitis caused by *Brucella ovis* in Sub-Carpathia. Acta Veterinaria Hungarica, 42: 25-33.
 67. Direnko P.M., Rudenko A.F. (1976). Experimental *Brucella ovis* infection in sheep. Veterinariya, Kiev, 1966 (44): 26-31.
 68. Dobrean V., Opris A., Daraban S. (2002). An epidemiological and surveillance overview of brucellosis in Romania. Veterinary Microbiology, 90: 157-163.

69. Dodd D.C., Hartley W.J. (1955). A specific suppurative epididymitis of rams. *New Zealand Veterinary Journal*, 3: 105.
70. Dorneles E.M.S., Guimarães A.S., Gouveia A.M.G., Coura F.M., Carmo F.B., Pauletti R.B., Azevedo V., Lilenbaum W., Vitor R.W.A., Pinheiro R.R., Ferreira A.C.R., Dasso M.G., Lage A.P., Heinemann M.B. (2020) Seroprevalence of *Brucella ovis*-epididymitis, smooth-*Brucella*, leptospirosis, toxoplasmosis, and Maedi-Visna in sheep slaughtered in Minas Gerais State, Brazil. *Braz J Vet Res Anim Sci.* 57(2):e164278.
71. Ducrotoy M.J., Conde-Álvarez R., Blasco J.M., Moriyón I. (2016). A review of the basis of the immunological diagnosis of ruminant brucellosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 171: 81-102.
72. Edgar D.G. (1959). The detection of *Brucella ovis* infection in rams. *New Zealand Veterinary Journal*, 7: 64-66.
73. Ekdahl M.O., Money D.F.L., Martin C.A. (1968). Some aspects of epididymitis of rams in New Zealand. *New Zealand Veterinary Journal*, 16: 81-82.
74. Elderbrook M., Schumaker B., Cornish T., Peck D. (2019). Sondgeroth: Seroprevalence and risk factors of *Brucella ovis* in domestic sheep in Wyoming, USA. *BMC Veterinary Research* 15:246, <https://doi.org/10.1186/s12917-019-1995-5>
75. European Union. (1991). Council Directive of 28 January 1991 on animal health conditions governing intra-Community trade in ovine and caprine animals (91/68/EEC). 1991L0068- EN- 03092008–012001. pp. 1–34.
76. Farina R., Cerri D., Andreani G., Renzoni P., Gaudachini F., Lombardi G. (1995). Prima segnalazione sulla presenza di *Brucella ovis* in Italia. *Sel Vet*, 36: 285-291 (in Italian).
77. Farrell I.D. (1974). The development of a new selective medium for the isolation of *Brucella abortus* from contaminated sources. *Res. Vet. Sci.* 16:280–286.
78. Ficapal A., Alonso-Urmeneta B., Velasco J., Moriyon I., Blasco J.M. (1995). Diagnosis of *Brucella ovis* infection of rams with an ELISA using protein G as conjugate.
79. Foster R.A. (2016). Male Genital System, in Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology of domestic animals, sixth edition, Elsevier
80. Foster R.A., Ladds P.W. (2007). Male genital system, 5th ed. In: Maxie G. (Ed), Jubb Kennedy i Palmer's Pathology of Domestic Animals, vol 3. Elsevier, Amsterdam, pp. 556-617.
81. Foster R.A., Premanandan C. (2022). Male Reproductive System, in Pathologic basis of veterinary disease editor Zachary JF, seventh edition, Elsevier
82. Gall D., Nielsen K., Vigliocco A., Smith P., Perez B., Rojas X., Robles C. (2003). Evaluation of an indirect enzyme-linked immunoassay for presumptive serodiagnosis of *Brucella ovis* in sheep. *Small Ruminant Research*, 48(3): 173–179. doi: 10.1016/S0921-4488(03)00013-0.
83. Galloway D.B. (1966). Some aspects of reproductive wastage in rams. *Aust. Vet. J.*, 42: 79--83.

84. Galluzzo P., Migliore S., Cascio S., Barreca S., Alfano M., Tagliarini A., Candela A., Piraino C., Galuppo L., Condorelli L., Hussein H.A., Tittarelli M., Chiarenza G. (2021). Diagnostic Findings in a Confirmed Outbreak of *Brucella ovis* Infection in a Traditional Sheep Farm in Sicily (South-Italy). *Pathogens*, 10(11): 1472. doi: 10.3390/pathogens10111472.
85. García-Pastor L., Blasco J.M., Barberan M. (2009). Pasteurellosis as a cause of genital lesions in rams. A descriptive study. *Small Rumin. Res.*, 87: 111-115.
86. García-Yoldi D., Marín C.M., de Miguel M.J., Muñoz P.M., Vizmanos J.L., López-Goñi I. (2006). Multiplex PCR assay for the identification and differentiation of all *Brucella* species and the vaccine strains *Brucella abortus* S19 and RB51 and *Brucella melitensis* Rev1. *Clin Chem.*, 52(4):779-81.
87. Gdovin T., Hrudka F., Chladecky F., Koppel Z. (1955). Infectious epididymitis in rams in Slovakia. *Sb. Cesk. Akad. Zool. Ved, Zivocisna Vyroba*, 28: 222--225.
88. George L.W., Carmichael L.E. (1978). Development of a rose bengal stained plate-test antigen for the rapid diagnosis of *Brucella canis* infection. *Cornell Vet.*, 68: 530--543.
89. Godfroid F., Cloeckert A., Taminiou B., Danese I., Tibor A., de Bolle X., Mertens P., Letesson J.J. (2000). Genetic organisation of the lipopolysaccharide O-antigen biosynthesis region of *Brucella melitensis* 16 M (wbk) *Res Microbiol.* 151: 655--668. doi: 10.1016/S0923-2508(00)90130-X.
90. González D., Grilló M.J., De Miguel M.J., Ali T., Arce-Gorvel V., Delrue R.M., Conde-Alvarez R., Muñoz P.M., López-Goñi I., Iriarte M., Marín C.M., Weintraub A., Widmalm G., Zygmunt M., Letesson J.J., Gorvel J.P., Blasco J.M., Moriyón I. (2008). Brucellosis vaccines: assessment of *Brucella melitensis* lipopolysaccharide rough mutants defective in core and O-polysaccharide synthesis and export. *PLoS ONE*. 3: e2760. doi: 10.1371/journal.pone.0002760.
91. Gorrie C.J.R. (1957). Ovine brucellosis. *Proc. 15th Annu. Gen. Meet. Aust. Vet. Assoc. (Victoria)*, pp. 40--42.
92. Gorvel J-P., Moreno E. (2002). *Brucella* intracellular life: from invasion to intracellular replication. *Vet Microbiol.* 90: 281--297. doi: 10.1016/S0378-1135(02)00214-6.
93. Gouletsou P.G., Fthenakis G.C. (2010). Clinical evaluation of reproductive ability of rams. *Small Rumin.* 92: 45-51.
94. Gouletsou P.G., Fthenakis G.C. (2015). Microbial diseases of the genital system of rams or bucks, *CVETMIC*. 7035: 6.
95. Gouletsou P.G., Fthenakis G.C., Tzora A., Gripps P.J., Saratsis P. (2006). Isolation of *Arcanobacterium pyogenes* from the scrotal skin and prepuce of healthy rams or rams with testicular abnormalities. *Small Rumin. Res.* 63: 177-182.
96. Gradweil D.V., Van Zyl F.E. (1975). Effectivity of Rev. 1 vaccine in rams against *Brucella ovis* infection. *J.S. Afr. Vet. Assoc.*, 46: 349--351.

97. Grgić Ž., Vidić B., Cavić S., Milovanović A. (2009). Ispitivanje prisustva infekcije sa *Brucella ovis* (ovine epididimitis) kod ovaca. Arhiv veterinarske medicine, vol. 2, br. 2, 17-25. UDK 619:616.981.42:636.3
98. Grilló M.J., Marín C.M., Barberán M., de Miguel M.J., Laroucau K., Jacques I., Blasco J.M. (2009). Efficacy of bp26 and bp26/omp31 *B. melitensis* Rev. 1 deletion mutants against *Brucella ovis* in rams. Vaccine. 27: 187–191. doi: 10.1016/j.vaccine.2008.10.065.
99. Hajtos I., Kiraly L., Tekes L. (1994). Chemotherapeutic trial for subclinical brucellosis (*B. ovis* infection) in breeding rams. Magy Allatorvosok, 49: 157-160.
100. Hall W.T.K. (1955). Epididymitis of rams - studies on skin sensitivity and pathology. Aust. Vet. J., 31: 7--9.
101. Hartley W.J., Jebson J.L., McFarlane D. (1954). The artificial infection of sheep with a *brucella*-like organism. Part I: The artificial infection of ewes. N.Z. Vet. J., 2: 80--85.
102. Hartley W.J., Jebson J.L., McFarlane D. (1955). Some observations on natural transmission of ovine brucellosis. NZ Vet J, 3: 5-10.
103. Haughey K.G., Hughes K.L., Hartley W.J. (1968). *Brucella ovis* infection. 2. The infection status in breeding flocks as measured by examination of rams and the perinatal lamb mortality. Aust. Vet. J., 44: 531--535.
104. Hicks J.D., Burr G.R., Marshall D.R., Vidler B.M. (1978). CFT inaccurate for epididymitis .N.Z. vet J, 24: 34.
105. Hinić V., Brodard I., Thomann A., Cvetnić Z., Makaya PV., Frey J., Abril C. (2008). Novel identification and differentiation of *Brucella melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. canis*, and *B. neotomae* suitable for both conventional and real-time PCR systems. J Microbiol Methods. 75(2): 375-8. doi: 10.1016/j.mimet.2008.07.002.
106. Hold F., Zerobin K. (1993). *Brucella ovis* infection in rams of the "white Alp" breed. Schweiz Arch Tierheil, 135: 44-50.
107. Hopkinson W.I., Lloyd J., Mickey B.M. (1979). *Brucella ovis* in Merino rams in Western Australia. Aust Vet J, 55: 200-201.
108. Hughes K.L. (1972a). Experimental *Brucella ovis* infection in ewes. 1. Breeding performance of infected ewes. Aust. Vet. J., 48: 12--17.
109. Hughes K.L. (1972b). Experimental *Brucella ovis* infection in ewes, 2. Correlation of infection and complement fixation titres. Aust. Vet. J., 48: 18--22.
110. Hughes K.L., Claxton P.D. (1968). *Brucella ovis* infection. 1. An evaluation of microbiological, serological and clinical methods of diagnosis in the ram. Aust. Vet. J., 44: 41--47.
111. Ionescu I., Ciortea G., Barzo I., Predoiu I., Dacila E., Diaconu M. (1973). Preparation of purified antigen for the diagnosis of infectious epididymitis in rams. Lucr. Inst. Cercet. Vet. Bioprep. 'Pasteur', 10: 29--46.
112. Ivanov I., Masalski N. (1974). Outbreak of epididymitis and orchitis in rams caused by *Corynebacterium pseudotuberculosis ovis*. Vet. Sb. Bulg., 72: 12--14.

113. Jebson J.L., Hartley W.J., McFarlane D. (1954). The artificial infection of sheep with a *Brucella*-like organism. Part II: The artificial infection of rams. N.Z. Vet. J., 2: 85-89.
114. Jones L.M., Dubray G., Marley J. (1975). Comparison of methods of diagnosis of *Brucella ovis* infection of rams. Ann. Rech. Vet., 6: 11--22.
115. Jost B.H., Billington S.J. (2004). *Corynebacterium* and *Arcanobacterium*. In: Gyles C.L., Prescott J.F., Songer J.G. Thoen C.O. (eds), Pathogenesis of bacterial infection in animals 3rd ed. Blackwell, Oxford, pp. 77-86.
116. Kalinovski A.I., Repina L.P., Innokenteeva T.I. (1995). Bruceellosis in Siberia and Far East. Med Parazitol (Moskva), 4: 42-45.
117. Kennedy P.C., Frazier L.M., McGowan B. (1956). Epididymitis in rams: pathology and bacteriology. Cornell Vet., 46: 303--319.
118. Kimberling C.L. (1988). Jensen and Swift's Diseases of Sheep, ed 3. Philadelphia, Lea & Febiger, pp. 7-11.
119. Komissarova L.I. (1975). Pathological and histological changes in rams and ewes infected with *Brucella ovis*. Sb. Rab. Leningr. Vet. Inst., 40: 240--245.
120. Krt B. (1992). Evaluation of similar serological methods for the diagnosis of ovine brucellosis - infection with *Brucella ovis*. Master's thesis, Faculty of Veterinary Medicine, University of Ljubljana, Ljubljana, Slovenia.
121. Lawrence W.E. (1961). Ovine brucellosis: A review of the disease in sheep manifested by epididymitis and abortion. Br. Vet. J., 117: 435--447.
122. Laws L., Elder J.K. (1969). Ovine epididymo-orchitis caused by *Actinobacillus lignieresii*. Aust. Vet. J., 45: 384.
123. Laws L., Simmons G.C., Ludford C.G. (1972). Experimental *Brucella ovis* infection in rams. Aust. Vet. J., 48: 313--317.
124. Livingston C.W. Jr., Hardy W.T. (1961). Isolation of *Actinobacillus seminis* from ovine epididymitis. Am J Vet Res, 25:660-663.
125. Machado G., Santos D.V., Kohek I., Stein M.C., Hein H.E., Poeta A.S., Vidor A.C.M., Corbellini L.G. (2015). Seroprevalence of *Brucella ovis* in rams and associated flock level risk factors in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. Preventive Veterinary Medicine 121 183–187. <http://dx.doi.org/10.1016/j.prevetmed.2015.05.009>
126. Manterola L., Tejero-Garcés A., Ficapal A., Shopayeva G., Blasco J.M., Marín C.M., Lopez-Goni I. (2003). Evaluation of a PCR test for the diagnosis of *Brucella ovis* in semen samples from rams. Vet. Microbiol., 92: 65-72.
127. Manterolaa L., Tejero-Garce´s A., Ficapalb A., Shopayevaa G., Blascoc J.M., Marinc C.M., Lo´pez-Goni I. (2002). Evaluation of a PCR test for the diagnosis of *Brucella ovis* infection in semen samples from rams.
128. Marín C.M., Alabart J.L., Blasco J.M. (1996). Effect of antibiotics contained in two *Brucella* selective media on growth of *Brucella abortus*, *Brucella melitensis*, and *Brucella ovis*. J. Clin. Microbiol., 34: 426–428.

129. Marín C.M., Jiménez de Bagués M.P., Blasco J.M., Gamazo C., Moriyón I., Díaz R. (1989). Comparison of three serological tests for *Brucella ovis* infection of rams using different antigenic extracts. *Vet Rec.*, 125(20): 504-508.
130. Matthews T.R., Trueblood M.S. (1967). *Cornell Vet.*, 57: 410.
131. McCollum M., Rhyan J., Coburn S., Ewalt D., Lahr C., Nol P., Keefe T., Kimberling C., Salman M. (2013). Clinical, culture, serology, and histopathology outcomes of bighorn sheep experimentally infected with *Brucella ovis*. *Journal of Wildlife Diseases*, 49(4), pp. 900–910.
132. McDermott J.J., Grace D., Zinsstag J. (2013). Economics of brucellosis impact and control in low-income countries. *Rev Sci Tech Off.*, 32: 249–261. doi: 10.20506/rst.32.1.2197
133. McFarlane D., Salisbury R.M., Osborne H.G., et al. (1952). Investigation into sheep abortion in New Zealand during the 1950 lambing season. *Aust Vet I*, 28: 221-226.
134. McGillivray D.I., Webber J.J., Dean H.F. (1986). Characterization of *Histophilus ovis* and related organisms by restriction endonuclease analysis. *Aust Vet I*, 63: 389-393.
135. McGowan B., Biberstein E.L., Harrold B.S., Robinson E.A. (1961). Epididymitis in rams: the effect of the ram epididymitis organism (REO) on the pregnant ewe. *Proc. U.S. Livest. Sanit. Assoc.*, 65: 291--296.
136. McGowan B., Shultz G. (1956). Epididymitis of rams: clinical description and field aspects. *Cornell Vet.*, 46: 277–281.
137. Meinershagen W.A., Frank F., Waldham D.G. (1974). *Brucella ovis* as a cause of abortion in ewes. *Am I Vet Res*, 35: 723-724.
138. Menzies P.I. (2012). Vaccination programs for reproductive disorders of small ruminants. *Anim. Reprod. Sci.*, 130: 162-172.
139. Miller S.A., Dykes D.D., Polesky H.F. (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.*, 16(3): 1215. doi: 10.1093/nar/16.3.1215.
140. Miller M.A., Tiffany L.L.T., Zachary J.F. (2022). Mechanisms and Morphology of Cellular Injury, Adaptation, and Death, in *Pathologic basis of veterinary disease* editor Zachary JF, seventh edition, Elsevier
141. Mitka S., Anetaki S.C., Souliou E., Diza E., Kansouzidou A. (2007). Evaluation of different PCR assays for the early detection of acute and relapsing human brucellosis in comparison with conventional methods. *J Clin Microbiol*, 45: 1211-1218.
142. Mol J.P.S., Costa E.A., Carvalho A.F., Sun Y.H., Tsolis R.M., Paixão T.A., et al. (2014). Early transcriptional responses of bovine chorioallantoic membrane explants to wild type, virB2 or btpB *Brucella abortus* infection. *PLoS One*, 9: e108606. doi: 10.1371/journal.pone.0108606. PMID: 25259715.
143. Molello J.A., Jensen R., Flint J.C., Collier J.R. (1963). Placental pathology. 1. Placental lesions of sheep experimentally infected with *Brucella ovis*. *Am. J. Vet. Res.*, 24: 897--904.

144. Moreno E., Stackebrandt E., Dorsch M., Wolters J., Busch M., Mayer H. (1990). *Brucella abortus* 16S rRNA and lipid A reveal a phylogenetic relationship with members of the alpha-2 subdivision of the class *Proteobacteria*. *J Bacteriol.*, 172: 3569–3576. doi: 10.1128/jb.172.7.3569-3576.1990.
145. Muhammed S.I., Lauerma L.H., Meslin G.M., et al. (1975). Duration of *Brucella ovis* infection in ewes. *Cornell Vet.*, 65: 221-227.
146. Muñoz P.M., Marin C.M., Monreal D., Gonzalez D., Garin-Bastuji B., Diaz R., Mainar-Jaime R.C., Moriyon I., Blasco J.M. (2005). Efficacy of several serological tests and antigens for diagnosis of bovine brucellosis in the presence of false-positive serological results due to *Yersinia enterocolitica* O:9. *Clin Vaccine Immunol.*, 12: 141–151. doi: 10.1128/CDLI.12.1.141-151.2005.
147. Myers D.M., Siniuk A.A. (1970). Preliminary report on the development of a diffusion-in-gel method for the diagnosis of ram epididymitis *Appl. Microbiol.*, 19: 335.
148. Myers D.M., Varela-Diaz V.M. (1979). Serodiagnosis of ram epididymitis by counterimmunoelectrophoresis using *Brucella ovis* surface R antigen. *J. Clin. Microbiol.*, 10: 451–453.
149. Navarro E., Casao M.A., Solera J. (2004). Diagnosis of human brucellosis using PCR. *Expert Rev Mol Diagn.*, 4(1): 115-123.
150. Nielsen K. (2002). Diagnosis of brucellosis by serology. *Vet Microbiol.*, 90: 447-459.
151. Olsen S.C., Palmer M.V. (2014). Advancement of knowledge of *Brucella* over the past 50 years. *Vet Pathol.*, 51(6): 1076-1089.
152. Olsen S.C., Thoen C.O., Cheville N.F. (2004). *Brucella*. In: Gyles C.L., Prescott J.F., Songer J.G., Thoen C.O. (Eds), *Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals*. 3rd ed. Blackwell, Oxford, pp. 309-319.
153. Osburn B.I., Kennedy P.C. (1966). Pathologic and immunologic responses of the fetal lamb to *Brucella ovis*. *Pathol Vet.*, 3: 110–136.
154. Paolichi F.A., Casaro P.A., Gimeno E.J., Kortebani L.G., Mazzolli A.B. (2000). Antisperm response in rams experimentally infected with *Brucella ovis*. *Small Rumin Res.*, 36: 7-15.
155. Pérez-Etayo L., de Miguel M.J., Conde-Álvarez R., Muñoz P.M., Khames M., Iriarte M., Moriyón I., Zúñiga-Ripa A. (2018). The CO₂-dependence of *Brucella ovis* and *Brucella abortus* biovars is caused by defective carbonic anhydrases. *Vet Res.*, 49(1): 85.
156. Pérez-Sancho M., Adone R., García-Seco T., Tarantino M., Diez-Guerrier A., Drumo R., Francia M., Domínguez L., Pasquali P., Álvarez J. (2014). Evaluation of the immunogenicity and safety of *Brucella melitensis* B115 vaccination in pregnant sheep. *Vaccine.*, 32: 1877–1881. doi: 10.1016/j.vaccine.2014.01.070.

157. Petrović M., Špičić S., Potkonjak A., Lako B., Kostov M., Cvetnić Ž. (2014). First evidence of *Brucella ovis* infection in rams in the Pirot Municipality, Serbia. *Vet Ital.*, 50: 259-268.
158. Picard-Hagen N., Berthelot X., Champion J.L., Eon L., Lyazrhi F., Marois M., Peglion M., Schuster A., Trouche C., Garin-Bastuji B. (2015). Contagious epididymitis due to *Brucella ovis*: relationship between sexual function, serology and bacterial shedding in semen. *BMC Vet Res.*, 11: 125.
159. Poester F.P., Nielsen K., Samartino L.E. (2010). Diagnosis of brucellosis. *Open Veterinary Science Journal*, 4: 46-60.
160. Polydorou K. (1979). Brucellosis in sheep and goats in Cyprus. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 2: 99--106.
161. Praud A., Champion J.L., Corde Y., Drapeau A., Meyer L., Garin-Bastuji B. (2012). Assessment of the diagnosis sensitivity and specificity of an indirect I-ELISA kit for the diagnosis of *Brucella ovis* infection in rams. *BMC Veterinary Research*, 8: 68.
162. Radostits O.M., Blood D.C., Gay C.C., Hinchcliff K.W. (2007). *Veterinary Medicine: A Textbook of the Diseases of Cattle, Sheep, Pigs, Goats and Horses*. 10th ed. Philadelphia, Saunders.
163. Ridler A.L., Smith S.L., West D.M. (2014). Seroconversion and semen shedding in rams experimentally infected with *Brucella ovis*. *New Zealand Veterinary Journal*, 62: 47-50.
164. Ridler A.L., West D.M. (2011). Control of *Brucella ovis* infection in sheep. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 27: 61-66.
165. Ridler A.L., West D.M., Collett M.G. (2012). Pathology of *Brucella ovis* infection in red deer stags (*Cervus elaphus*), *New Zealand Veterinary Journal* 60(2), 146-149
166. Ridler A.L., West D.M., Stafford K.J., Wilson P.R. (2006). Persistence, serodiagnosis and effects on semen characteristics of artificial *Brucella ovis* infection in deer stags. *New Zealand Veterinary Journal*, 54: 85-90.
167. Ris D.R. (1970). The bacteriology and serology of ewes inoculated with viable *Brucella ovis* organisms. *New Zealand Veterinary Journal*, 18: 2-6.
168. Ris, D.R. and TePunga, W.A. (1963). An indirect haemagglutination test for the detection of *Brucella ovis* antibodies. *New Zealand Veterinary Journal*, 11: 94.
169. Rovid A. Brucellosis: *Brucella ovis*, 2018. Retrieved from <http://www.cfsph.iastate.edu/DiseasesInfo/factsheets.php>
170. Rudenko A.F. (1976a). Experimental *Brucella ovis* infection in laboratory animals. I. Guinea-pigs. *Veterinariya (Kiev)*, 43: 22--28.
171. Rudenko A.F. (1976b). Experimental *Brucella ovis* infection in laboratory animals. II. Mice. *Veterinariya (Kiev)*, 43: 72--75.
172. Ryan F.B. (1964). Eradication of ovine brucellosis. *Australian Veterinary Journal*, 40: 162.

173. Sanchis R., Giauffret, A. (1976). Mise au point d'une microtechnique de fixation du complement appliquee au serodiagnostic de l'epididymite contagieuse du belier. *Recueil de Medecine Veterinaire*, 152: 305.
174. Scholz H.C., Hubalek Z., Sedláček I., Vergnaud G., Tomaso H., Al Dahouk S., Melzer F., Kämpfer P., Neubauer H., Cloeckeaert A., et al. (2008). *Brucella microti* sp. nov., isolated from the common vole *Microtus arvalis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58(Pt 2): 375-382.
175. Scholz H.C., Nöckler K., Göllner C., Bahn P., Vergnaud G., Tomaso H., Al Dahouk S., Kämpfer P., Cloeckeaert A., Maquart M., et al. (2010). *Brucella inopinata* sp. nov., isolated from a breast implant infection. *Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60(Pt 4): 801-808.
176. Scholz H.C., Revilla-Fernández S., Al Dahouk S., Hammerl J.A., Zygmunt M.S., Cloeckeaert A., Koylass M., Whatmore A.M., Blom J., Vergnaud G., et al. (2016). *Brucella vulpis* sp. nov., isolated from mandibular lymph nodes of red foxes (*Vulpes vulpes*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66: 2090–2098.
177. Schöpf K., Khaschabi D. (1997). Experiences in the eradication of *Brucella ovis* infections in sheep in Tyrol. *Tierärztliche Praxis. Ausgabe G, Grosstiere/Nutztiere*, 25(5): 413-416.
178. Searson J.E. (1982). Sensitivity and specificity of two microtitre complement fixation tests for the diagnosis of *Brucella ovis* infection in rams. *Australian Veterinary Journal*, 58(1): 5-7.
179. Sergeant E.S. (1994). Seroprevalence of *Brucella ovis* infection in a commercial ram flock in the Tamworth area. *New Zealand Veterinary Journal*, 42: 97-100.
180. Sieira R., Comerci D.J., Sanchez D.O., Ugalde R.A. (2000). A homologue of an operon required for DNA transfer in *Agrobacterium* is required in *Brucella abortus* for virulence and intracellular multiplication. *Journal of Bacteriology*, 182: 4849–4855. PMID: 10940027.
181. Silva A.P., Macêdo A.A., Costa L.F., Rocha C.E., Garcia L.N., Farias J.R., Gomes P.P., Teixeira G.C., Fonseca K.W., Maia A.R., Neves G.G., Romão E.L., Silva T.M., Mol J.P., Oliveira R.M., Araújo M.S., Nascimento E.F., Martins-Filho O.A., Brandão H.M., Paixão T.A., Santos R.L. (2015). Encapsulated *Brucella ovis* Lacking a Putative ATP-Binding Cassette Transporter (Δ abcBA) Protects against Wild Type *Brucella ovis* in rams. *PLoS One*, 10(8): e0136865.
182. Silva A.P., Macêdo A.A., Costa L.F., Turchetti A.P., Bull V., Pessoa M.S. (2013). *Brucella ovis* lacking a species-specific putative ATP-binding cassette transporter is attenuated but immunogenic in rams. *Veterinary Microbiology*, 167: 546–553. doi: 10.1016/j.vetmic.2013.09.003 PMID: 2407535.

183. Silva A.P., Macêdo A.A., Silva T.M., Ximenes L.C., Brandão H.M., Paixão T.A., Santos R.L. (2015). Protection Provided by an Encapsulated Live Attenuated $\Delta abcBA$ Strain of *Brucella ovis* against Experimental Challenge in a Murine Model. *Clinical and Vaccine Immunology*, 22(7): 789-797.
184. Silva T.M.A., Mol J.P.S., Winter M.G., Atruli V., Xavier M.N., Pires S.F., et al. (2014). The predicted ABC transporter AbcEDCBA is required for type IV secretion system expression and lysosomal evasion by *Brucella ovis*. *Plos One*, 9(12): e114532.
185. Silva T.M.A., Paixão T.A., Costa E.A., Xavier M.N., Sá J.C., Moustacas V.S., et al. (2011). Putative ATP-binding cassette transporter is essential for *Brucella ovis* pathogenesis in mice. *Infection and Immunity*, 79: 1706–1717. doi: 10.1128/IAI.01109-10 PMID: 21300772.
186. Simmons G.C., Hall W.T.K. (1953). Epididymitis of rams. *Australian Veterinary Journal*, 29(2): 33–40. doi: 10.1111/j.1751-0813.1953.tb05206.x.
187. Smith I.D. (1962). Reproductive wastage in a Merino flock in central western Queensland. *Australian Veterinary Journal*, 38: 500–507.
188. Soler-Lloréns P., Gil-Ramírez Y., Zabalza-Baranguá A., Iriarte M., Conde-Álvarez R., Zúñiga-Ripa A., San Román B., Zygmunt M.S., Vizcaíno N., Cloeckert A., Grilló M.J., Moriyón I., López-Goñi I. (2014). Mutants in the lipopolysaccharide of *Brucella ovis* are attenuated and protect against *B. ovis* infection in mice. *Veterinary Research*, 45: 72.
189. Starr T., Ng T.W., Wehrly T.D., Knodler L.A., Celli J. (2008). *Brucella* Intracellular replication requires trafficking through the late endosomal/lysosomal compartment. *Traffic*, 9: 678–694.
190. Stević N., Mišić D., Bogunović D., Matović K., Valčić M., Milovanović M., Radojičić S. (2017). Examining the possibility of detecting *Brucella canis* from tissue samples using bruce-ladder multiplex PCR assay. *Acta Veterinaria-Beograd*, 67, 4, 551-561
191. Špičić S., Marjanović S., Zdelar-Tuk M., Cvetnić Z. (2009). First evidence of *Brucella ovis* infection in Republic of Croatia. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*, 116: 209-213.
192. Thayer J.D., Martin J.E. Jr (1964). A selective medium for the cultivation of *N. gonorrhoeae* and *N. meningitidis*. *Public Health Reports*, 79: 49–57.
193. Thayer J.D., Martin J.E. Jr (1966). Improved medium selective for cultivation of *N. gonorrhoeae* and *N. meningitidis*. *Public Health Rep* (1896). 1966 Jun, 81(6):559-62. PMID: 4957043; PMCID: PMC1919807.
194. Tsolis R.M., Sechadri R., Santos R.L., Sangari F.J., Lobo J.M., de Jong M.F., et al. (2009). Genome degradation in *Brucella ovis* corresponds with narrowing of its host range and tissue tropism. *PLOS ONE*, 4: e5519.

195. Tzora A., Leontides L.S., Amiridis G.S., Manos G., Fthenakis G.C. (2002). Bacteriological and epidemiological findings during examination of the uterine content of ewes with retention of fetal membranes. *Theriogenology*, 57: 1809-1817.
196. Van Rensburg S.W.J., Van Heerden K.M., Le Roux D.J., Snyders A.J. (1958). Infectious infertility in sheep. *Journal of the South African Veterinary Medical Association*, 29: 223--233.
197. Van Tonder E.M. (1979). *Actinobacillus seminis* infection in sheep in the Republic of South Africa. II. Incidence and geographical distribution. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 46: 135--140.
198. Vigliocco AM, Silva Paulo PS, Mestre J, Briones GC, Draghi G, Tossi M, Nielsen K: Development and validation of the indirect enzyme immunoassay for the detection of ovine antibody to *Brucella ovis*. *Vet. Micro.* 1997, 54, 357– 368
199. Velasco J., Romero C., Lopez-Goni I., Diaz R., Moriyon, I. (1998). Evaluation of the relatedness of *Brucella spp.* and *Ochrobactrum anthropi* and description of *Ochrobactrum intermedium sp. nov.* a new species with a closer relationship to *Brucella spp.* *International Journal of Systematic Bacteriology*, 48: 759-768.
200. Wallker R.L., Biberstein E.L., Pritchett L.R.F., et al. (1983). Deoxyribonucleic acid relatedness among *Hemophilus somnus*, *Hemophilus agni*, *Histophilus ovis*, *Actinobacillus seminis*, and *Hemophilus seminis*. I. *Clinical Microbiology*, 17: 728-737.
201. Webb R.F. (1983). Bacteriological characteristics of *Histophilus ovis* and its relationship to similar bacteria. *Research in Veterinary Science*, 35: 25.
202. Webb R.F., Quinn C.A., Cockram F.A., Husband A.J. (1980). Evaluation of procedures for the diagnosis of *Brucella ovis* infection in rams. *Australian Veterinary Journal*, 56: 172-175.
203. Webb R.F., Quinn C.A., Cockram F.A., Husbandt A.J. (1980). Evaluation of procedures for the diagnosis of *Brucella ovis* infection in rams.
204. Whatmore A.M., Davison N., Cloeckert A., Al Dahouk S., Zygmunt M.S., Brew S.D., Perrett L.L., Koylass M.S., Vergnaud G., Quance C., Scholz H.C., Dick Jr, E.J., Hubbard G., Schlabritz-Loutsevitch N.E. (2014). *Brucella papions sp. nov.*, isolated from baboons (*Papio spp.*). *Int J Syst Evol Microbiol.* Dec 1; 64(Pt 12): 4120–4128. doi: 10.1099/ijs.0.065482-0.
205. Wiedbrauk D.L., Werner J.C., Drevon A.M. (1995). Inhibition of PCR by aqueous and vitreous fluids. *Journal of Clinical Microbiology*, 33: 2643-2646.
206. WOAHP (World Organisation for Animal Health). (2018). Ovine epididymitis (*Brucella ovis*) in *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. OIE; Paris, France.
207. Worthington R.W., Bosman P.P. (1968). Isolation of *Actinobacillus seminis* in South Africa. *Journal of the South African Veterinary Medical Association*, 39: 81.

208. Worthington R.W., Mulders M.S.G., McFarlane I.S., Becker D. (1973). Serological titres following vaccination of sheep and goats with *Brucella melitensis* Rev. 1 vaccine. Onderstepoort Journal of Veterinary Research, 40: 1-5.
209. Xavier M.N., Silva T.M.A., Costa E.A.C., Paixão T.A., Moustacas V.S., et al. (2010). Development and evaluation of a species-specific PCR assay for the detection of *Brucella ovis* infection in rams. Veterinary Microbiology, 145(1-2): 158-164.
210. Yang G, Erdman D.E., Kodani M., Kools J., Bowen M.D., Fields B.S. (2011). Comparison of commercial systems for extraction of nucleic acids from DNA/RNA respiratory pathogens. Journal of Virological Methods, 171(1): 195-199.
211. Young J.M. (2001). Implications of alternative classifications and horizontal gene transfer for bacterial taxonomy. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 51: 945-953.
212. Yu W.L., Nielsen K. (2010). Review of detection of *Brucella spp.* by polymerase chain reaction. Croatian Medical Journal, 51(4): 306-313.
213. Zabalza-Baranguá A., San-Román B., Chacón-Díaz C., de Miguel M-J., Muñoz P-M., Iriarte M., Blasco J.M., Grilló M.J. (2019). GFP tagging of *Brucella melitensis* Rev1 allows the identification of vaccinated sheep. Transboundary and Emerging Diseases, 66: 505–516.
214. Zamora J., Chahuan E., Polette M., Alonso O., Rojas X., Kruze J., & Herve M. (1977). *Brucella ovis* and other aetiological agents in infectious epididymitis and orchitis in rams. Archivos de Medicina Veterinaria, Chile, 9: 94-99.
215. Zeki S., Kumar K.G.R., Keshavamurthy B.S. (1981). Isolation of *Hemophilus agni* from cases of purulent orchitis in rams. Indian Journal of Comparative Microbiology, Immunology and Infectious Diseases, 2: 30-31.