

UNIVERZITET U BEOGRADU
FAKULTET VETERINARSKE MEDICINE

ZORANA A. ZUROVAC SAPUNDŽIĆ

**UTVRĐIVANJE PRISUSTVA I RAŠIRENOSTI
BRUCELLA VRSTA KOD DIVLJIH SVINJA NA
TERITORIJI REPUBLIKE SRBIJE**

DOKTORSKA DISERTACIJA

BEOGRAD, 2026. GODINA

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE

ZORANA A. ZUROVAC SAPUNDŽIĆ

**DETERMINING THE PRESENCE AND
DISTRIBUTION OF *BRUCELLA* SPECIES IN
WILD BOAR ON THE TERRITORY OF THE
REPUBLIC OF SERBIA**

DOCTORAL DISSERTATION

BELGRADE, 2026

MENTORI

Dr Sonja Radojičić, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine

Dr Jadranka Žutić, naučni savetnik
Naučni institut za veterinarstvo Srbije

ČLANOVI KOMISIJE

Dr Nataša Stević, vanredni profesor, predsednik komisije
Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine

Dr Dejan Krnjaić, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine

Dr Dušan Milivojević, viši naučni saradnik
Univerzitet u Beogradu, Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo

Datum odbrane:

Ovu disertaciju posvećujem mojoj majci Ljiljani,

koja je beskrajna ljubav, požrtvovanost i snaga

ZAHVALNICA

Izrada ove disertacije predstavljala je višegodišnje i zahtevno naučno putovanje. Istovremeno, taj period moga života bio je obeležen brojnim izazovima, ali i najlepšim trenucima – rođenjem mojih sinova.

Najveću zahvalnost za izradu ove disertacije dugujem svojim mentorkama, prof. dr Sonji Radojičić i dr sci.vet.med. Jadranki Žutić.

Bez podrške prve mentorke, dr Sonje Radojičić, završetak ove disertacije ne bi bio moguć. Pored stručnog vođstva, iskustva i neprocenjivog znanja koje ste nesebično delili sa mnom, posebnu zahvalnost dugujem Vam na razumevanju i ohrabrenju, koji su predstavljali temelj istrajnosti tokom rada na ovoj disertaciji.

Veliko hvala drugoj mentorki, dr Jadranki Žutić, idejnom tvorcu ovog istraživanja i važnom osloncu u mom stručnom usavršavanju, na uloženom vremenu, strpljenju i stručnim savetima koji su značajno doprineli izradi disertacije.

Velika zahvalnost pripada dr Nataši Stević na nesebičnom zalaganju i posvećenosti pri izvođenju izolacije bakterija, bez čijeg bi doprinosa ovo istraživanje bilo znatno drugačije.

Zahvaljujem dr Dejanu Krnjaiću na korisnim sugestijama tokom završne faze izrade disertacije, kao i dr Dušanu Milivojeviću na pomoći u interpretaciji rezultata genetičkih ispitivanja i stručnim smernicama koje su unapredile kvalitet ovog rada.

Posebnu zahvalnost dugujem dr Vesni Milićević iz Naučnog instituta za veterinarstvo Srbije na dragocenom angažovanju prilikom izvođenja molekularnih ispitivanja. Tvoje bezrezervno poverenje i prijateljstvo su od neizmerne vrednosti.

Hvala dr Slavoljubu Stanojeviću iz Direkcije za nacionalne referentne laboratorije za izvođenje statističkih analiza, Tamari Radovanović, asistentu na Katedri za zarazne bolesti životinja i bolesti pčela Fakulteta veterinarske medicine, na pomoći u laboratorijskom radu, kao i kolegama iz Veterinarskih specijalističkih instituta u Pančevu i Zaječaru na prikupljanju uzoraka.

Zahvaljujem rukovodstvu Naučnog instituta za veterinarstvo Srbije na obezbeđenim uslovima za realizaciju ovog istraživanja.

Neizrecivo hvala mojim roditeljima i sestri što su uvek bili uz mene.

Naposletku, hvala mom suprugu i sinovima Todoru i Vukašinu, mom posebnom svetu, okruženom bedemima ljubavi i sigurnosti, iz kojeg sam crpela svu snagu i motivaciju do kraja ovoga puta.

UTVRĐIVANJE PRISUSTVA I RAŠIRENOSTI *BRUCELLA* VRSTA KOD DIVLJIH SVINJA NA TERITORIJI REPUBLIKE SRBIJE

Kratak sadržaj

Bruceloza predstavlja jednu od najznačajnijih zoonoza na globalnom nivou. Ova bolest je poznata još iz antičkog doba, ali se o njenom prisustvu i raširenosti u populacijama divljih životinja i dalje nedovoljno zna. Nakon izolacije *B. suis* biotip 2 kod ulovljene divlje svinje u Belgiji 1994. godine, zaraza je potvrđena u brojnim zemljama Centralne i Zapadne Evrope. Porast brojnosti divljih svinja i sve češći kontakti sa domaćim svinjama, ali i drugim domaćim životinjama, naglašavaju značaj ovih divljih životinja u epizootologiji bruceloze. Dugogodišnji programi monitoringa i kontrole bruceloze u našoj zemlji doprineli su smanjenju prevalencije zaraze, pa se kod domaćih životinja danas uglavnom dijagnostikuju sporadični slučajevi. Bruceloza kod divljih svinja u Srbiji po prvi put je predmet istraživanja u okviru ove disertacije.

Serološkim testovima (Rose Bengal Test i cELISA) ispitano je 480 krvnih seruma poreklom od divljih svinja sa teritorije šest upravnih okruga. Utvrđena seroprevalencija bruceloze iznosi 9,38%, dok se po ispitanim okruzima ona kreće u intervalu od 0 do 22,73%. Primena kombinacije ovih seroloških testova pokazala se pouzdanom u dijagnostici bruceloze kod divljih svinja. Analizom rizika utvrđeno je da je starost divljih svinja od 1,5 do 2,5 godine povezana sa najvećom verovatnoćom serokonverzije, dok pol jedinki nije imao statistički značajan uticaj na pojavu infekcije.

Za potrebe izolacije uzročnika i molekularnih ispitivanja, od 85 ulovljenih divljih svinja prikupljeni su uzorci testisa sa epididimisima, cervikalnih limfnih čvorova, materice, krvi i tonzila. Pored navedenih uzoraka, u ispitivanje je uključeno i 200 uzoraka slezina poreklom od divljih svinja, koji su metodom real-time PCR ispitani na prisustvo genoma *Brucella* spp. Nakon analize zbirnih uzoraka i naknadne identifikacije pojedinačnih pozitivnih uzoraka, dve slezine poreklom od dva vepra uključene su u dalja bakteriološka i molekularna ispitivanja. Konačan broj analiziranih uzoraka iznosio je 116, poreklom od 87 divljih svinja sa područja šest upravnih okruga.

Brucella suis biotip 2 izolovana je iz krvi i cervikalnog limfnog čvora divljeg vepra starosti 15-18 meseci, sa teritorije Južnobanatskog okruga, što je prvi dokaz prisustva ovog patogena u populaciji divljih svinja u Srbiji. Sekvenciranjem celog genoma izolata i filogenetskom analizom utvrđena je najveća genska srodnost sa referentnim sojevima biotipa 2 (92-63 i Thomsen). SNP analizom potvrđena je bliska srodnost sa izolatom poreklom iz Nemačke, dok je MLST-9 analizom utvrđena pripadnost sekvencionom tipu ST16. Genetička srodnost sa izolatima poreklom od divljih svinja sa teritorije Evrope utvrđena je primenom MLVA-16 analize.

Jedan od zadataka ovog istraživanja bio je i definisanje najpogodnijeg protokola ekstrakcije DNK brucela iz uzoraka poreklom od divljih svinja. U tu svrhu nukleinska kiselina je izolovana na tri načina: primenom komercijalnog kita, ekstrakcijom sa guanidin-izotiocijanatom (TRIzol™

Reagent) i metodom grejanja i hlađenja u tečnom azotu. Statističkom analizom dobijenih rezultata nije utvrđena značajna razlika između primenjenih metoda ekstrakcije ($p=0,89$), te se sagledavanjem svih prednosti izvođenja komercijalni kit pokazao najpogodnijim.

U cilju utvrđivanja prisustva genoma *Brucella* spp. rađen je real-time PCR, a pozitivna reakcija utvrđena je kod 17,24% ispitanih divljih svinja. Po okruzima, genom *Brucella* spp. utvrđen je u opsegu od 0 do 21,05% ispitanih uzoraka. Najboljim uzorkom za detekciju genoma *Brucella* spp. pokazali su se testisi sa epididimisima, dok je u uzorcima krvi, cervikalnih limfnih čvorova, slezini i tonzilama genom ređe utvrđen.

Dobijeni rezultati ukazuju na postojanje stabilne prirodne cirkulacije bruceloze u populaciji divljih svinja u našoj zemlji, što potvrđuje njihov značajan epizootiološki doprinos u održavanju i potencijalnom širenju uzročnika.

Ključne reči: bruceloza, divlje svinje, Srbija, *B. suis* biotip 2, RBT, cELISA, protokoli ekstrakcije, real-time PCR, filogenetska analiza

Naučna oblast: Veterinarska medicina

Uža naučna oblast: Epizootiologija, zarazne bolesti životinja i bolesti pčela i sviloprelja

UDK:

DETERMINING THE PRESENCE AND DISTRIBUTION OF *BRUCELLA* SPECIES IN WILD BOAR ON THE TERRITORY OF THE REPUBLIC OF SERBIA

Abstract

Brucellosis is one of the most significant zoonoses worldwide. Although the disease has been known since ancient times, its occurrence in wildlife populations is still insufficiently understood. Following the isolation of *B. suis* biovar 2 from a hunted wild boar in Belgium in 1994, the disease has since been confirmed in numerous countries across central and western Europe. The increasing population of wild boars and their more frequent contact with domestic pigs and other domestic animals highlight the importance of this wildlife species in the epizootiology of brucellosis. Long-term brucellosis monitoring and control programs in our country have contributed to a reduction in disease prevalence, while currently in domestic animals only sporadic cases are diagnosed. Brucellosis in wild boars in Serbia has been investigated for the first time within this dissertation.

Serological assays (Rose Bengal Test and cELISA) were used to examine 480 sera samples from wild boars originating from six administrative districts. The overall seroprevalence of brucellosis was 9.38%, ranging from 0 to 22.73% across the studied districts. The combined application of the two serological tests proved to be reliable for diagnosis of brucellosis in wild boars. Risk factor analysis showed that wild boars aged 1.5 to 2.5 years had the highest probability of seroconversion, while sex had no statistically significant effect on disease occurrence.

For the purpose of pathogen isolation and molecular investigations, samples of testes with epididymides, cervical lymph nodes, uterus, blood, and tonsils were collected from 85 hunted wild boars. In addition to the aforementioned samples, 200 spleen samples originating from wild boars were included in the study and tested by real-time PCR for the presence of *Brucella* spp. genome. Following the analysis of pooled samples and subsequent identification of individual positive samples, two spleen samples originating from two male wild boars were included in further bacteriological and molecular investigations. The final number of analyzed samples was 116, originating from 87 wild boars from six administrative districts.

Brucella suis biovar 2 was isolated from blood and the cervical lymph node of a 15–18-month-old wild boar from Južnobanatski district, representing the first confirmed evidence of this pathogen in wild boars in Serbia. Whole-genome sequencing and phylogenetic analysis showed the highest genetic similarity with reference strains of biovar 2 (92-63 and Thomsen). SNP analysis confirmed close relatedness to isolates originating from Germany, while MLST-9 analysis assigned the isolate to sequence type ST16. Genetic relatedness to European wild boar isolates was further confirmed using MLVA-16 analysis.

One of the objectives of this study was to determine the most suitable protocol for extracting *Brucella* DNA from wild boar samples. Nucleic acids were extracted using three methods: a commercial kit, guanidine isothiocyanate-based extraction (TRIzol™ Reagent), and a freeze–thaw method using liquid nitrogen. Statistical analysis showed no significant difference between the

applied extraction methods ($p=0.89$); however, considering all practical advantages, the commercial kit proved to be the most suitable approach.

Real-time PCR was used to detect *Brucella* spp. genome, with positive reactions detected in 17.24% of the wild boars examined. Across districts, genome detection ranged from 0 to 21.05% of examined samples. The most suitable samples for *Brucella* spp. genome detection were testes with epididymides, while blood, cervical lymph nodes, spleen, and tonsils showed lower detection rates.

The obtained results indicate the existence of a stable natural cycle of brucellosis in the wild boar population in Serbia, confirming their important epizootiological role in maintaining and potentially spreading the pathogen.

Keywords: brucellosis, wild boars, Serbia, *B. suis* biovar 2, RBT, cELISA, extraction protocols, real-time PCR, phylogenetic analysis

Science area: Veterinary medicine

Field area: Epizootiology, infectious diseases of animals and diseases of bees and silkworms

UDK:

SADRŽAJ

UVOD	1
PREGLED LITERATURE	3
Rod <i>Brucella</i>	3
<i>Brucella suis</i>	5
<i>Brucella suis</i> biotip 2	6
Zoonozni potencijal <i>B. suis</i> biotip 2	6
Etiologija bruceloze kod divljih svinja	7
Rasprostranjenost bruceloze kod divljih svinja	7
Epizootiologija	8
Patogeneza	10
Klinička slika i patomorfološke promene	11
Dijagnostika bruceloze	11
Serološka dijagnostika bruceloze	12
Rose Bengal test	12
Reakcija vezivanja komplementa	13
Test fluorescentne polarizacije	13
ELISA testovi	13
Dijagnostika bruceloze bakteriološkim metodama	13
Molekularna dijagnostika bruceloze	14
Značaj ekstrakcije DNK brucela u PCR dijagnostici bruceloze	15
Značaj divljih svinja u Srbiji	16
<i>Jedno zdravlje</i>	17
Bruceloza divljih svinja u okviru koncepta <i>Jedno zdravlje</i>	19
CILJ I ZADACI ISTRAŽIVANJA	22
MATERIJAL I METODE	23
Materijal	23
Materijal za serološka ispitivanja	23
Materijal za bakteriološka i molekularna ispitivanja	24
Priprema uzoraka za ispitivanja	25
Referentni materijali	25
Metode ispitivanja	26
Metode serološke dijagnostike	26
Rose Bengal test	26
cELISA	27
Izolacija <i>Brucella</i> spp. i potvrda izolata multiplex PCR metodom	28
Molekularna dijagnostika	29
Ekstrakcija DNK izolata komercijalnim kitom	29
Bruce-ladder multiplex PCR	30
Konvencionalni PCR i prečišćavanje produkata	31

Genomska i filogenetska analiza izolata	33
Komparativna analiza sekvenci i BLASTn poređenje	33
Sekvenciranje celog genoma (WGS) i bioinformatička obrada	33
Taksonomska identifikacija i <i>in silico</i> tipizacija	33
Filogenetska analiza i konstrukcija stabla.....	34
Multilokusna tipizacija sekvenci (MLST-9)	34
Analiza tandemskih ponavljanja varijabilnog broja na više lokusa (MLVA-16)	34
Ekstrakcija DNK iz uzoraka divljih svinja primenom tri protokola	34
Ekstrakcija DNK komercijalnim kitom	34
Ekstrakcija DNK sa guanidin-izotiocijanatom (TRIzol™ Reagent)	35
Ekstrakcija DNK grejanjem i hlađenjem u tečnom azotu	35
Real-time PCR	37
Statistička analiza	38
REZULTATI	39
Rezultati seroloških ispitivanja	39
Rezultati seroloških ispitivanja divljih svinja prema starosnim kategorijama i polu uz procenu rizika od pojave bruceloze	41
Procena pogodnosti seroloških testova za dijagnostiku bruceloze kod divljih svinja	43
Izolacija uzročnika bruceloze iz uzoraka divljih svinja	45
Identifikacija izolata primenom Bruce-ladder multiplex PCR	45
Rezultati molekularnih ispitivanja	46
Sekvenciranje izolata <i>B. suis</i> i genska analiza	46
Komparativna analiza sekvenci i BLASTn poređenje	47
Sekvenciranje celog genoma (WGS) i bioinformatička obrada	48
Taksonomska identifikacija i <i>in silico</i> tipizacija	48
Analiza polimorfizama pojedinačnih nukleotida (SNP) i filogenija na nivou soja	49
Multilokusna tipizacija sekvenci (MLST-9)	52
Analiza tandemskih ponavljanja varijabilnog broja na više lokusa (MLVA-16).....	52
Utvrdjivanje prisustva genoma <i>Brucella</i> spp. real-time PCR metodom	53
DISKUSIJA	57
ZAKLJUČCI	68
LITERATURA	70
PRILOG 1	87

UVOD

Jedno zdravlje (eng. *One Health*) predstavlja integrisani, multidisciplinarni pristup usmeren na očuvanje ravnoteže između zdravlja ljudi, životinja i životne sredine. Razumevanje međusobnih odnosa ovih komponenti ključno je za efikasnu kontrolu zaraznih bolesti — od prevencije i ranog otkrivanja do odgovora i upravljanja epizootijama i epidemijama.

Oko 60% svih infektivnih bolesti i oko 75% novonastalih infekcija kod ljudi ima zoonozno poreklo. Promene u životnoj sredini uslovljene urbanizacijom, krčenjem šuma i klimatskim faktorima dovode do sve učestalijeg preklapanja prostora u kome se kreću ljudi, domaće i divlje životinje, čime se povećava mogućnost prenosa patogena između različitih vrsta. Stoga je jedan od osnovnih ciljeva koncepta *Jednog zdravlja* zaštita javnog zdravlja kroz kontrolu zoonoznih patogena kod životinja i smanjenje rizika od njihovog prenosa na ljude.

Bruceloza je jedna od najrasprostranjenijih zoonoza na globalnom nivou. Najraniji zapisi o zarazi datiraju još iz antičkog doba, a njen uzročnik identifikovan je tek krajem 19. veka, nakon čega bruceloza kontinuirano privlači značajnu pažnju i postaje predmet brojnih istraživanja. Kod životinja, oboljenje se najčešće manifestuje pobačajima i reproduktivnim poremećajima. Kod ljudi, bruceloza se manifestuje produženom febrilnošću praćenom nizom nespecifičnih kliničkih simptoma, što naglašava njen značaj sa aspekta javnog zdravlja. Zbog svog izraženog epizootiološkog i javnozdravstvenog značaja, bruceloza je svrstana u grupu zaraznih bolesti čije je prijavljivanje zakonski obavezno. Pored rizika po zdravlje ljudi i životinja, značaj ove infekcije dodatno naglašavaju i ekonomske štete koje prouzrokuje, usled gubitaka u proizvodnji, ograničenja u trgovini i troškova sprovođenja mera kontrole i eradikacije. Ovi gubici se procenjuju na 6,5 € po govedu, 0,7 € po ovci, 0,5 € po kozi i 0,6 € po svinji. Troškovi iskorenjivanja bruceloze goveda u italijanskoj pokrajini Lacio tokom 2007–2011. iznosili su oko 6 miliona evra, dok su nakon postizanja statusa slobodne regije gubici prepolovljeni. U zemljama sa visokom prevalencijom bruceloze, poput Indije, gubici dostižu 3,4 milijarde dolara.

Eradikacioni programi sprovode se širom sveta, a njihova efikasnost u velikoj meri zavisi od epizootiološke situacije na određenom području. U Srbiji je bruceloza prisutna više godina, ali su višedecenijski programi nadzora i kontrole značajno smanjili njenu prevalenciju. Ipak, sporadični slučajevi zaraze kod goveda, ovaca i svinja potvrđuju da eradikacija nije postignuta. Ključne aktivnosti ostaju identifikacija zaraženih životinja i prirodnih rezervoara uzročnika, razumevanje puteva prenosa i unapređenje laboratorijske dijagnostike, u skladu sa principima *Jednog zdravlja*.

Uzročnici bruceloze su intracelularne, gram-negativne bakterije iz roda *Brucella*, koje mogu inficirati veliki broj domaćih i divljih životinja, kao i čoveka. Infekcija se najčešće prenosi alimentarnim i polnim putem, kao i kontaktom sa kontaminiranim materijalom. Divlje životinje, a naročito divlje svinje (*Sus scrofa*), predstavljaju značajne prirodne rezervoare ovih bakterija. Bruceloza divljih svinja predstavlja ozbiljan izazov za stočarsku proizvodnju, s obzirom na to da ove životinje često služe kao asimptomatski nosioci *Brucella suis* biotipa 2 (*B. suis* biotip 2), uz mogućnost prenosa infekcije na domaće svinje i druge osetljive vrste. Iako se bruceloza kod divljih svinja intenzivno proučava, mnogi aspekti epizootiologije i održavanja zaraze u prirodi i dalje su nedovoljno razjašnjeni. Relativno čest prenos uzročnika iz populacije divljih na domaće svinje ograničava uspešnost eradikacionih programa. Ovaj problem naročito dolazi do izražaja u

zemljama u kojima je bruceloza kod goveda, malih preživara i domaćih svinja iskorenjena ili su programi eradikacije u završnoj fazi.

Na nivou Evrope, prevalencija bruceloze kod divljih svinja pokazuje značajne varijacije u zavisnosti od geografskog područja, gustine populacije, uzorkovanja i primenjenog dijagnostičkog postupka. Rezultati meta-analize dostupnih literaturnih podataka ukazuju da je učestalost zaraze u ovoj populaciji znatno viša (prosečno oko 15%) u poređenju sa domaćim svinjama, kod kojih se prevalencija procenjuje na približno 1%. U pojedinim regionima, infekcija je utvrđena kod skoro 60% ispitanih divljih svinja. Takođe, smatra se da je pojava bruceloze kod domaćih svinja gotovo isključivo posledica prenosa uzročnika zaraze iz populacije divljih svinja, što dodatno potvrđuje značaj ove vrste kao rezervoara i izvora infekcije u prirodi.

Dijagnostika bruceloze zasniva se na primeni seroloških i molekularnih metoda, dok izolacija uzročnika, iako često otežana i neizvesna, i dalje predstavlja zlatni standard za potvrdu infekcije. Savremene molekularne metode značajno su unapredile razumevanje zaraze, omogućavajući preciznu identifikaciju i genetičku karakterizaciju uzročnika, kao i detaljniji uvid u puteve prenosa i epizootiologiju bolesti.

Ispitivanje bruceloze kod divljih svinja u Republici Srbiji ima poseban značaj s obzirom na to da podaci o prisustvu i rasprostranjenosti zaraze u ovoj populaciji ne postoje. Kako brojnost divljih svinja u našoj zemlji beleži stalni trend porasta, uz sve učestaliji kontakt sa domaćim životinjama, potencijalni rizik od širenja zaraze u potpunosti je opravdan. Uzimajući u obzir ograničene, ali značajne podatke o brucelozi kod domaćih svinja, prenos zaraze iz populacije divljih svinja čini se i veoma verovatnim.

Potreba za ispitivanjem bruceloze u populaciji divljih svinja na teritoriji Srbije nastala je kao rezultat svega prethodno navedenog.

PREGLED LITERATURE

Rod *Brucella*

Rod *Brucella* obuhvata grupu malih, gram negativnih bakterija u okviru klase *Alphaproteobacteria*, reda *Rhizobiales* i familije *Brucellaceae*. Pripadnici ovog roda predstavljaju važne patogene mikroorganizme kod životinja i ljudi, koji su etiološki agensi bruceloze.

Škotski mikrobiolog i patolog, Dejvid Brus (*David Bruce*) (1855-1931), zajedno sa grupom malteških lekara 1887. godine prvi je izolovao uzročnika bruceloze kod ljudi. Uzročnik je po njemu nazvan *Brucella melitensis*, a rod je kasnije dobio ime *Brucella*. Bruceloza, odnosno malteška ili mediteranska groznica, kako se zaraza još naziva, usmrtila je mnoštvo britanskih vojnika i civilnog stanovništva, a uprkos razjašnjenju etiologiji, izvor zaraze za ljude dugo je bio nepoznat. Tačnije sve do 1905. godine, kada je malteški doktor i arheolog Temistokle Zamit (*Themistocles Zammit*) utvrdio sponu između konzumacije sirovog kozjeg mleka i nastanka bolesti kod ljudi (Corbel, 1997).

Brucele su fakultativno intracelularni kokobacili dužine 0,6-1,5 µm i 0,5-0,7 µm širine. Sposobne su da rastu i razmnožavaju se unutar ćelija domaćina, ispoljavajući afinitet prema ćelijama fagocitnog sistema. Ove bakterije nemaju sposobnost formiranja spora ni kapsula, dok ih nedostatak flagela čini nepokretnim. Rastu na obogaćenim podlogama na optimalnoj temperaturi od 37 °C. Striktni su aerobi, pri čemu neke vrste za svoj rast zahtevaju prisustvo 5-10% CO₂.

Prvih šest vrsta brucela, koje su klinički i epizootički najznačajnije, obuhvataju *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. canis* i *B. neotomae* (tabela 1). Ove klasične brucele, kako se još nazivaju, primarno izazivaju oboljenje kod određenih životinjskih vrsta na koje su adaptirane, pri čemu neke od njih (*B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*) karakteriše i značajan zoonozni potencijal. Nukleotidni identitet između ovih vrsta iznosi preko 90%, dok identične 16S rRNK i sekvence *recA* gena potvrđuju blisku evolucijsku povezanost (Whatmore, 2009).

Nove (atipične) vrste brucela identifikovane su početkom XXI veka i razlikuju se od klasičnih po fenotipskim karakteristikama kao što su varijante u strukturi lipopolisaharida (LPS), pokretljivosti, metaboličkoj aktivnosti i bržem rastu (Occhialini i sar., 2022). U ovu grupu ubrajaju se *B. ceti* i *B. pinnipedialis* (Foster i sar., 2007), *B. microti* (Scholz i sar., 2008a, 2008b, 2009), *B. inopinata* (Scholz i sar., 2010), *B. papionis* (Whatmore i sar., 2014) i *B. vulpis* (Scholz i sar., 2016) (tabela 1).

Nekoliko izolata brucela identifikovanih kod glodara, žaba, gmizavaca, riba, slepih miševa i ljudi, još uvek čekaju formalni taksonomski opis (About i sar., 2023).

Tabela 1. Sistematski pregled vrsta roda *Brucella* sa prikazom biotipova, domaćina i zoonoznim potencijalom

Vrsta	Biotip	Domaćin/izvor	Patogenost za ljude
<i>B. melitensis</i>	1-3	Ovce, koze	Visoka
<i>B. abortus</i>	1-6, 9	Goveda	Visoka
<i>B. suis</i>	1, 3	Svinje	Visoka
	2	Divlje svinje, zec	Niska
	4	Irvasi	Visoka
	5	Glodari	-
<i>B. ovis</i>	-	Ovce	-
<i>B. canis</i>	-	Psi	Niska
<i>B. neotomae</i>	-	Glodari vrste <i>Neotoma lepida</i>	Umerena
<i>B. ceti</i>	-	Kitovi, delfini	Umerena
<i>B. pinnipedialis</i>	-	Foke	Umerena
<i>B. microti</i>	-	Poljska voluharica, crvena lisica, zemljište	Nepoznata
<i>B. inopinata</i>	-	Izolovana iz grudnog implanta žene	Umerena
<i>B. papionis</i>	-	Babuni	Nepoznata
<i>B. vulpis</i>	-	Crvena lisica (<i>Vulpes vulpes</i>)	Nepoznata

Fenotipski, brucele se u zavisnosti od strukture LPS-a, glavne komponente spoljašnje membrane gram negativnih bakterija, mogu podeliti na „glatke“ S (*smooth*) i „hrapave“ R (*rough*). LPS S brucela poseduje O-bočni lanac (takođe nazvan O-polisaharid ili O antigen), koji je značajan faktor virulencije ovih vrsta, dok je kod R-LPS ovaj polisaharidni deo odsutan. Kulture S brucela rastu u obliku glatkih, sjajnih i prozirnih kolonija i tipične su za većinu vrsta. R forma karakteristična je za dve vrste, *B. ovis* i *B. canis*, čije su kolonije mutne i hrapave. Razlike između dve fenotipske varijante nisu samo morfološke, već utiču i na sposobnost bakterija da prežive unutar ćelija domaćina i izazovu imunološki odgovor. Tranzicija iz S u R kolonije takođe je moguća i može se javiti spontano tokom laboratorijske kultivacije, ili kako sugerišu novija istraživanja, u toku infekcije, pri čemu nastaju R varijante (Turse i sar., 2011). Ova izmena nastaje kao posledica gubitka O-polisaharida, usled mutacija ili rekombinacija u genima koji kodiraju sintezu LPS-a (Mancilla, 2016).

Znatna genomska homogenost između različitih vrsta i biotipova brucela predstavljala je izazov za taksonomsku klasifikaciju unutar roda, uprkos jasnim razlikama u pogledu primarnih domaćina, patogenosti i fenotipskim karakteristikama. Ove karakteristike uključuju rast u prisustvu CO₂, proizvodnju vodonik-sulfida (H₂S), aktivnost ureaze, osetljivost prema bojama bazni fuksin i

tionin, lizu specifičnim bakteriofagima, oksidativni metabolički profil i aglutinaciju monospecifičnim serumima (anti A i M specifični serumi) (Alton i sar., 1988).

Savremene molekularne i filogenetske analize doprinele su razumevanju evolutivnih odnosa unutar roda, ukazujući na njegovu blisku srodnost sa pretežno saprofitskim bakterijama iz roda *Ochrobactrum*. Ova saznanja otvorila su pitanje redefinisavanja taksonomskog statusa ovih bakterija, uključujući i predloge o njihovoj potencijalnoj integraciji u jedinstven rod. Međutim, zbog izraženih razlika u patogenosti i kliničkom značaju, kao i potencijalne konfuzije u dijagnostici, ovakvi predlozi ostaju predmet naučne debate i nisu široko prihvaćeni (Moreno i sar., 2023).

Brucella suis

Džekob Traum (*Jacob Traum*) je prvi izolovao *B. suis* iz pobačenog ploda svinje u Indijani, Sjedinjene Američke Države (SAD) 1914. godine (Traum, 1914), dok je patogenost ove bakterije za svinje potvrđena dve godine kasnije. Ograničenja tadašnjih mikrobioloških tehnika dovela su do pogrešne identifikacije bakterija, tada klasifikovane kao *B. abortus*, koje su tek 1929. godine prepoznate kao zasebne *Brucella* vrste (Huddleson, 1929).

Kolonije *B. suis* su sitne, glatke i prozirne, karakteristične za S brucele. Ovaj fenotipski tip povezan je sa prisustvom kompletnog LPS kompleksa, koji sadrži A i M antigenske determinante. Morfološki, kolonije *B. suis* se ne mogu pouzdano razlikovati od drugih vrsta brucela koje rastu u istoj formi, zbog čega vizuelna diferencijacija kolonija nije pouzdana za identifikaciju vrste.

U poređenju sa ostalim klasičnim vrstama brucela, najveći intraspecijski genski diverzitet primetan je kod *B. suis* u okviru koje je definisano 5 biotipova. Biotipovi 1 i 3 karakteristični su za domaće svinje, biotip 2 za divlje svinje i zečeve, biotip 4 za irvase, a biotip 5 za glodare. Deponovani kompletni genomi *B. suis* u banci gena Nacionalnog centra za biotehnoške informacije (*NCBI GenBank*, Maryland, SAD) potvrđuju značajnu zastupljenost ove vrste u genomskim resursima roda *Brucella*. Sa izuzetkom biotipa 3 koji poseduje jedan hromozom veličine ~3,1 Mbp, ostali biotipovi *B. suis* sadrže dva kružna hromozoma veličine ~2,1 i 1,2 Mbp. Sadržaj guanina i citozina u dva kružna hromozoma gotovo je identičan, sa prosečnim sadržajem 58-59%, koji kodiraju 3200-3400 otvorenih okvira za čitanje (open reading frames). Izuzimajući biotip 5, genomi svih izolata *B. suis* grupisani su zajedno u jedan klaster, a između sojeva identifikovano je 16756 jednonukleotidnih polimorfizama (single-nucleotide polymorphism, SNPs), uključujući biotip specifične (Sankarasubramanian i sar., 2016).

Brucella suis izaziva brucelozu kod svinja (fam. *Suidae*), koje predstavljaju primarne domaćine ove bakterije. Smatra se da jedino *B. suis* biotipovi 1, 2 i 3 kod svinja izazivaju sistemsku infekciju i kliničke simptome bruceloze (Helke i sar., 2015). Infekcije izazvane biotipovima 1 i 3 razlikuju se od one izazvane biotipom 2 u pogledu domaćina i geografske rasprostranjenosti. Biotipovi 1 i 3 karakteristični su za domaće, a biotip 2 za divlje svinje (Garin-Bastuji i sar., 2000; Mailles i sar., 2017).

Sa aspekta javnog zdravlja *B. suis* biotip 2 je slabo patogen, dok biotipovi 1 i 3 imaju značajan zoonozni potencijal i dovode do ozbiljnih zdravstvenih poremećaja kod ljudi.

Najpatogeniji *B. suis* biotip 1, pretežno je zastupljen u zemljama Latinske Amerike i Azije. Biotip 2 prisutan je u Evropi i drugim regionima u kojima se nalaze njegovi prirodni domaćini (divlje svinje i zečevi), dok se biotip 3 uglavnom detektuje u zemljama istočne Evrope, odnosno zajedno sa biotipom 2.

***Brucella suis* biotip 2**

Glavni rezervoari *B. suis* biotipa 2 u prirodi su divlje svinje (*Sus scrofa*) i evropski zec (*Lepus europaeus*). Održavanje i širenje ovih bakterija predstavljaju složen i dinamičan proces koji je u neposrednoj vezi sa populacionom dinamikom i geografskom ekspanzijom rezervoara, dok se širenje na veće udaljenosti dodatno povezuje sa antropogenim aktivnostima.

Ferreira i saradnici (2017a) su primenom analize tandemskih ponavljanja varijabilnog broja na više lokusa (*multiple-locus variable-number tandem repeat analysis*, MLVA) grupisali izolate *B. suis* biotipa 2 na teritoriji Evrope u dva jasno definisana klastera: pirinejski (Portugalija i Španija) i centralnoevropski. Pretpostavlja se da je ograničeno kretanje populacija divljih svinja između pojedinih regiona doprinelo evolutivnom razdvajanju ovih klastera, pri čemu je pirinejski klaster verovatno proistekao iz centralnoevropskog (Ferreira i sar., 2017b). Utvrđena genska srodnost između izolata *B. suis* kod divljih svinja iz Hrvatske, Mađarske, Nemačke i Slovenije sugerise postojanje kontinuirane cirkulacije bliskih sojeva na nivou centralne Evrope (Kreizinger i sar., 2014; Papić i sar., 2023).

Iako evropski zec (*L. europaeus*) predstavlja značajan rezervoar biotipa 2 *B. suis*, podaci o rasprostranjenosti infekcije u ovoj populaciji i dalje su ograničeni. U pojedinim lovištima Austrije seroprevalencija bruceloze u populaciji zečeva dostiže 7,14% (Winkelmayer i sar., 2005), u Češkoj 1,62% (Tremel i sar., 2007). Nasuprot tome, u Nemačkoj tokom perioda 1998–2000. bruceloza kod evropskog zeca nije potvrđena (Frändölich i sar., 2003), dok je u Poljskoj prisustvo *B. suis* biotipa 2 dokazano molekularnim metodama (Szulowski i sar., 2013a).

Brucella suis biotip 2 poreklom od evropskog zeca, pokazuje specifične genske karakteristike i formira zasebne genotipske klastere u odnosu na izolate iz divljih svinja. Analize genske srodnosti izolata poreklom od zečeva, divljih i domaćih svinja ukazuju na izraženiju prilagođenost pojedinih sojeva zečevima (Kreizinger i sar., 2014; Papić i sar., 2023).

Zoonozni potencijal *B. suis* biotip 2

Za razliku od biotipova 1 i 3 *B. suis*, koji imaju značajan zoonozni potencijal, biotip 2 smatra se nisko patogenim za ljude. Tokom XX veka u literaturi su opisana svega dva slučaja infekcije ljudi ovim biotipom (Paton i sar., 2001; Teyssou i sar., 1989). Prvi slučaj zabeležen je kod uzgajivača svinja u Francuskoj (Teyssou i sar., 1989), a drugi u Singapuru kod 78-godišnje žene, nakon inkubacionog perioda dužeg od 20 godina (Paton i sar., 2001). Nizak zoonozni potencijal *B. suis*

biotipa 2 dodatno potvrđuju rezultati istraživanja u Francuskoj, gde infekcija nije utvrđena ni kod jedne od 58 osoba koje su bile u bliskom kontaktu sa zaraženim svinjama (Vaillant i sar., 2005).

Ipak, infekcija kod ljudi se sporadično registruje. Mailles i saradnici (2017) u svojoj studiji opisuju sedam slučajeva infekcije u Francuskoj u periodu od 2004. do 2016. godine, što predstavlja najveći broj do tada prijavljenih slučajeva. Svi oboleli bili su u kontaktu sa divljim svinjama: šest pacijenata bili su aktivni lovci, dok je sedmi imao samo jedan kontakt sa mesom divlje svinje, tokom pripreme za kuvanje. Pet od sedam pacijenata imalo je različite komorbiditete, a preostala dva pacijenta nisu bila imunokompromitovana, što ukazuje da se infekcija *B. suis* biotipom 2 može razviti i kod potpuno zdravih osoba. Analizom ovih slučajeva utvrđeni su faktori koji su mogli doprineti nastanku infekcije, pri čemu je kontakt sa zaraženim divljim svinjama ili njihovim mesom od najvećeg značaja, naročito kod osoba sa pridruženim oboljenjima.

Interesantno je da su svi slučajevi infekcije ljudi, izuzev pacijentkinje iz Singapura, zabeleženi u Francuskoj. S obzirom da je *B. suis* biotip 2 prisutan u mnogim zemljama, autori pretpostavljaju da je stvarna učestalost infekcije kod ljudi veća od prijavljene i da značajan broj slučajeva ostaje neprepoznat usled izostanka sistematskog pristupa u dijagnostici bruceloze kod ljudi, podrazumevajući identifikaciju vrste i biotipa brucela (Mailles i sar., 2017).

Etiologija bruceloze kod divljih svinja

Bruceloza kod divljih svinja izaziva *B. suis* biotip 2. Ređe se identifikuju drugi pripadnici roda *Brucella*, koji imaju sporadičan epizootiološki značaj, ali ih svakako ne treba u potpunosti isključiti iz razmatranja. Cvetnić i saradnici (2009) izolovali su *B. suis* biotip 3, karakterističan za domaće svinje, kod divljih svinja u Hrvatskoj, što ukazuje na mogućnost prenosa između vrsta i ima značajne implikacije po javno zdravlje. U enzootskim područjima bruceloze, a naročito onima sa velikim brojem zaraženih goveda i malih preživara, divlje svinje mogu biti nosioci *B. abortus* i *B. melitensis*. Prisustvo terenskih i vakcinalnih sojeva *B. abortus* kod divljih svinja ukazuje na to da ove životinje mogu biti rezervoari infekcije (Higgins i sar., 2012; Stoffregen i sar., 2007).

Zanimljiv je nalaz *B. microti* kod divlje krmače, koji su opisali Rónai i saradnici (2015). Izolacija ovog uzročnika iz submandibularnog limfnog čvora ukazuje na neuobičajenu epizootiološku situaciju, s obzirom na to da je primarni domaćin *B. microti* poljska voluharica (*Microtus arvalis*), a može se naći kod crvenih lisica (*Vulpes vulpes*) i u zemljištu (Scholz i sar., 2008a, 2008b, 2009). Pretpostavlja se da je u konkretnom slučaju divlja svinja imala ulogu u održavanju i potencijalnom daljem širenju ovog patogena u prirodnom okruženju.

Rasprostranjenost bruceloze kod divljih svinja

Bruceloza kod divljih svinja registrovana je širom sveta, uključujući Evropu, Australiju i Sjedinjene Američke Države. U Kini postoje indicije o prisustvu bruceloze kod divljih svinja, iako detaljni podaci o rasprostranjenosti i epizootiološkim karakteristikama infekcije još uvek nisu dostupni (He, 2014).

Na teritoriji Evrope bruceloza se smatra jednom od najznačajnijih enzootskih bolesti divljih svinja. Do sada je opisana u nekoliko država: Hrvatskoj (Cvetnić i sar., 2017), Švajcarskoj (Leuenberger i sar., 2007), Italiji (De Massis i sar., 2012), Poljskoj (Weiner i sar., 2009), Portugaliji (Muñoz i sar., 2010), Španiji (Closa-Sebastià i sar., 2010), Belgiji (Grégoire i sar., 2012), Mađarskoj (Kreizinger i sar., 2014), Francuskoj (Muñoz i sar., 2019), Nemačkoj (Macías Luaces i sar., 2023), Letoniji (Grantina-Ievina i sar., 2018), Finskoj (Fredriksson-Ahomaa i sar., 2020), Holadiji (van Tulden i sar., 2020), Sloveniji (Papić i sar., 2023) i Ukrajini (Pyskun i sar., 2019).

Prevalencija bruceloze kod divljih svinja širom Evrope varira u zavisnosti od geografskog područja, tipa staništa, gustine populacije i kontakata između divljih i domaćih životinja, a procene se kreću u različitom opsegu, od jednocifrenih do nepunih 60% (Cilia i sar., 2021; Grégoire i sar., 2012).

Epizootiologija

Preživljavanje brucela u prirodi ima ograničen epizootiološki značaj. U spoljašnjoj sredini bakterije mogu preživeti nekoliko meseci na niskim temperaturama i u prisustvu vlage, pokazuju otpornost na sušenje i zamrzavanje, a određeno vreme opstaju u pobačenim fetusima, stajnjaku, senu, prašini, na opremi i odeći. Faktori koji skraćuju vreme preživljavanja brucela uključuju direktno sunčevo svetlo, visoke temperature (pasterizacija ili kuvanje), kao i primenu standardnih dezinfekcionih sredstava. Nakon izbijanja bruceloze na jednoj farmi svinja, DNK *B. suis* (biotip 2) bilo je moguće potvrditi u objektima do 2 godine (Rebollada-Merino i sar., 2022).

Održavanje uzročnika u populaciji svinja zahteva kontinuiranu cirkulaciju infekcije, što je omogućeno direktnim ili bliskim kontaktom zaraženih i zdravih jedinki, ili preko pobačenih plodova i placente.

Većina zaraženih divljih svinja su asimptomatski nosioci uzročnika, što omogućava održavanje i neprimetno širenje infekcije u populaciji životinja. Najveći rizik od unosa bruceloze u prijemčivu populaciju predstavlja uvođenje zaraženih svinja. Nakon unošenja, *B. suis* se može relativno brzo širiti, pri čemu prevalencija infekcije u pogođenim populacijama može dostići 70–80% (Olsen i sar., 2019). Klinički, epizootije bruceloze se najčešće karakterišu pobačajima, sterilitetom i povećanim mortalitetom novorođene prasadi, dok su kod enzootija simptomi slabije izraženi i zaraza često ostaje neprimećena.

Iako se brucelozi generalno pripisuje višestruki negativan uticaj na reproduktivne performanse, uključujući stopu ovulacije i broj prasadi po leglu, savremena istraživanja ne potvrđuju dosledno ovakve efekte, ni na individualnom nivou kod krmača (Ruiz-Fons i sar., 2006), niti u okviru populacije, koja uprkos visokoj prevalenciji zaraze beleži kontinuirani rast (Wu i sar., 2011).

Kao posledica infekcije, kod zaraženih veprova dolazi do formiranja granulomatoznih promena u reproduktivnim organima, što omogućava dugotrajno izlučivanje bakterija putem semena, u trajanju od tri do četiri godine (Manthei, 1964), dok se kod krmača tokom pobačaja registruje intenzivno izlučivanje brucela, naročito preko vaginalnog iscetka, pobačenih fetusa i placente. Izlučivanje brucela putem vaginalnog iscetka najintenzivnije je u periodu 30–40 dana nakon pobačaja, mada kod pojedinih krmača može potrajati i duže, do 36 meseci (Manthei i Deyoe, 1970). Ova faza infekcije predstavlja značajan epizootiološki rizik za širenje infekcije unutar populacije.

Rezultati istraživanja sprovedenog u Španiji utvrdili su da je 82,1% vaginalnih briseva krmača koje su pobacile usled infekcije *B. suis* biotipom 2 bilo PCR pozitivno. Međutim, naknadna testiranja pokazala su negativne rezultate, što ukazuje na to da je izlučivanje brucela najizraženije tokom akutne faze infekcije, dok se u kasnijem toku bolesti značajno smanjuje (Rebollada-Merino i sar., 2022).

Starost životinja smatra se značajnim faktorom koji utiče na kliničke manifestacije infekcije. Zaražavanje je retko kod mladih, polno nezrelih jedinki, dok kod polno zrelih svinja bolest često poprima hronični karakter (Bergagna i sar., 2009; Risco i sar., 2014). Eksperimentalna istraživanja pokazala su da se *B. suis* kod polno zrelih veprova zadržava u tkivima do šest meseci kod 66,7% zaraženih životinja, a kod 50% infekcija može perzistirati i do 42 meseca. Kod krmača je 25% jedinki ostalo pozitivno u periodu od šest do 42 meseca, što ukazuje na sposobnost brucela da dugotrajno opstanu u organizmu (Deyoe, 1972).

Pored polnog puta, infekcija se može preneti i alimentarno, konzumiranjem hrane ili vode kontaminirane sadržajem placente, vaginalnim iscedkom inficiranih krmača, kao i ingestijom pobačenih plodova i fetalnih membrana. Eksperimentalno je dokazano da se svinje mogu inficirati putem konjunktivalne i intranazalne aplikacije, kao i preko oštećene kože (Olsen i sar., 2019).

Vertikalni prenos infekcije *in utero* može rezultirati rađanjem klinički zdravih, ali slabih prasadi sa povećanim mortalitetom. Takva prasada mogu postati latentni nosioci infekcije, šireći bakterije bez ispoljavanja kliničkih simptoma ili imunološkog odgovora (Acha i Szyfres, 2003). Kod 8% prasadi zaraženih *in utero* hemokultura je bila pozitivna duže od tri meseca, dok su se kod 2,5% jedinki brucele zadržavale u tkivima i do dve godine (Manthei i sar., 1952). Slično izlučivanju putem semene tečnosti kod veprova, zaražene krmače mogu izlučivati brucele mlekom, usled formiranja granulomatoznih lezija u mlečnoj žlezdi, čime se ostvaruje dodatni put infekcije za prasad.

Indirektni prenos brucela putem mehaničkih vektora, kao što su psi, mačke, divlji mesožderi i migratorne ptice, još uvek nije u potpunosti potvrđen (European Food Safety Authority, EFSA, 2009).

Istraživanja o ulozi artropoda u prenosu bruceloze intenzivirana su sredinom XX veka. Rane eksperimentalne studije su pokazale da se infekcija razvija kod polovine zdravih zamoraca nakon što su se na njima hranili krpelji koji su prethodno parazitirali na zamorcima zaraženim sa *B. abortus* (Tovar, 1947). Pored eksperimentalnih istraživanja na laboratorijskim životinjama, brucele su dokazane kod 16 vrsta krpelja izolacijom i molekularnim metodama (Ma i sar., 2024). Takođe, kod pojedinih vrsta krpelja potvrđen je i transovarijalni prenos, što ukazuje na mogućnost održavanja i prenosa bakterija kroz generacije (Huang i sar., 2020). U španskim lovištima sa potvrđenom brucelozom kod divljih svinja, kod 5,17% krpelja roda *Dermacentor* skinutih sa inficiranih svinja utvrđeno je prisustvo genoma *Brucella* spp. Tokom šestogodišnjeg praćenja, brucele su dokazane isključivo kod krpelja sakupljenih sa divljih svinja, dok kod krpelja sakupljenih sa drugih vrsta papkara (jelena, muflona i jelena lopatara) nije detektovano prisustvo ovih patogena (Rebollada-Merino i sar., 2024). Iako se među artropodama krpelji smatraju najvažnijim potencijalnim vektorima, dugotrajnim nosiocima i rezervoarima brucela, pojedini drugi ektoparaziti, uključujući stenice (*Cimex* spp.), goveđu vaš (*Haematopinus tuberculatus*) i

mačju buvu (*Ctenocephalides felis*), takođe mogu učestvovati u prenosu ovih bakterija (Douglas i sar., 2020; Neglia i sar., 2013; Tovar, 1947).

Patogeneza

Patogeneza bruceloze je složen proces koji se zasniva na sposobnosti brucela da prežive i razmnožavaju se unutar ćelija imunološkog sistema domaćina. Minimalna infektivna doza *B. suis* nije precizno definisana, ali se smatra da 10^3 – 10^4 bakterija može izazvati infekciju kod svinja (Alton, 1990). Tok infekcije zavisi od ulaznih vrata, virulencije soja, količine bakterija, prijemčivosti i imunološkog statusa domaćina (Enright, 1990).

Glavni put ulaska *B. suis* u prijemčivog domaćina je preko sluzokože digestivnog ili reproduktivnog sistema, mada prodor bakterija može biti i kroz oštećeni epitel. Nakon ulaska, brucele bivaju fagocitovane od strane makrofaga i dendritskih ćelija koji ih prenose do regionalnih limfnih čvorova, gde se odvija primarno umnožavanje (Ackermann i sar., 1988). Prodor slobodnih bakterija ili makrofaga ispunjenih brucelama u krvotok izaziva bakterijemiju koja u proseku traje oko pet nedelja, a kod krmača se može produžiti i do 34 meseca (Deyoe, 1967). Tokom sekundarne bakterijemije, brucele kolonizuju različite organe i limfne čvorove, uključujući submandibularne, gastrointestinalne, ilijačne, retrofaringealne i supramamarne (Deyoe i Manthei, 1967).

Ključna strategija preživljavanja brucela podrazumeva slabu aktivaciju *Toll-like* receptora i ograničenu proizvodnju proinflamatornih citokina (Ahmed i sar., 2016). Glatki lipopolisaharid (S-LPS) brucela slab je endotoksin, a njegova relativna otpornost ka kompleментом posredovanoj lizi i baktericidni katjonski peptidi doprinose inhibiciji apoptoze inficiranih ćelija i izbegavanju imunološkog odgovora. Sve ovo omogućava bakterijama da se nesmetano umnožavaju u unutrašnjosti ćelija retikuloendotelnog sistema (Lapaque i sar., 2005).

Iako makrofagi fagocituju 70–85% brucela, bakterije se služe složenim mehanizmima u cilju preživljavanja, uključujući inhibiciju fuzije fagozoma sa lizozomom, formiranje specifičnih vakuola (*Brucella-containing vacuoles*, BCV) i kontrolisanu acidifikaciju fagozoma (Celli i sar., 2003; Porte i sar., 2003). Unutarćelijsko preživljavanje dodatno je potpomognuto lučenjem enzima kao što su superoksid-dismutaza (SOD), koja neutralizuje superoksidne radikale, i alkil-hidroperoksid reduktaza C (AhpC), koja razgrađuje vodonik-peroksid i druge oksidativne molekule, čime bakterije stiču otpornost na oksidativni stres (Gee i sar., 2005; Steele i sar., 2010).

Pored toga, sistem sekrecije tipa IV (T4SS), kodiran *virB* operonom, modifikuje intracelularni transport i omogućava formiranje replikativne niše u endoplazmatskom retikulumu (ER) (Celli i sar., 2003), dok faktori virulencije poput regulatornog sistema BvrS/BvrR, cikličnih β -glukana i transkripcionog regulatora VjbR, dodatno doprinose adaptaciji brucela unutar ćelija (Altamirano-Silva i sar., 2018).

Klinička slika i patomorfološke promene

Bruceloza kod divljih svinja najčešće protiče supklinički, tako da većina zaraženih jedinki ne ispoljava kliničke simptome. Uprkos tome, zaražene svinje postaju rezervoari infekcije i doprinose njenom daljem širenju unutar populacije.

Ukoliko su klinički simptomi ipak prisutni, najčešće su posledica promena na reproduktivnim organima ili se ispoljavaju u vidu lokalizovanih upalnih procesa, dok su sistemske manifestacije i mortalitet kao posledica infekcije retki.

Kako starost jedinki predstavlja značajan faktor u razvoju infekcije, klinički simptomi se češće uočavaju kod polno zrelih jedinki (Risco i sar., 2014).

Kod zaraženih veprova brucele se mogu dugo zadržavati u reproduktivnim organima, što dovodi do formiranja hroničnih žarišta infekcije, rezultirajući otokom testisa i disfunkcijom reproduktivnog sistema. Patomorfološke promene uključuju jednostrani ili obostrani orhitis i/ili epididimitis, sa formiranjem mikroapscesa i prisustvom inflamatornog infiltrata. U jednoj studiji, kod tri od četiri zaražena divlja vepa dijagnostikovano je bilateralni orhitis, sa priraslicama i purulentnim eksudatom u skrotumu (Risco i sar., 2014).

Kod zaraženih krmača simptomi bruceloze uključuju pobačaje, metritis, smanjenu fertilitet i povećanu stopu uginuća novorođene prasadi. Pobačaji se najčešće javljaju u kasnijim fazama graviditeta, pri čemu se *B. suis* izlučuje putem placente, pobačenih fetusa i vaginalnog iscedka (MacMillan, 1999).

Od patomorfoloških promena uočavaju se proliferacija endometrijuma, hiperemija, edem i multifokalna nekroza sluzokože materice. Na pobačenim plodovima primetni su znaci generalizovane upale, sa hemoragijama u koži, mišićima i visceralnim organima, dok se na placenti nalazi nekrotizirajući placentitis sa multifokalnim područjima nekroze i ćelijskim infiltratom (Rebollada-Merino i sar., 2023).

Dijagnostika bruceloze

Dijagnostika bruceloze predstavlja temelj za efikasno praćenje i kontrolu ove značajne zoonoze. Pravovremeno i precizno otkrivanje zaraženih životinja omogućava ne samo identifikaciju izvora infekcije, već i procenu rizika od širenja bolesti unutar populacija divljih i domaćih životinja. Dijagnostički pristup se zasniva na kombinaciji epizootioloških podataka, seroloških testova, izolacije uzročnika i savremenih molekularnih metoda, pri čemu svaka od navedenih ima svoje prednosti, ograničenja i specifičnu primenu u praksi. Iako izolacija uzročnika predstavlja zlatni standard u dijagnostici bruceloze, status inficiranosti najčešće se procenjuje na osnovu rezultata seroloških ispitivanja. Savremene molekularne metode, kao što je PCR, omogućavaju brzu, osetljivu i specifičnu detekciju bakterija iz roda *Brucella*, što je doprinelo njihovoj sve širjoj primeni u istraživanjima i programima nadzora divljih životinja.

Serološka dijagnostika bruceloze

Serološka dijagnostika bruceloze počela je pre više od 120 godina uvođenjem jednostavnog testa aglutinacije kojim se dokazuje prisustvo specifičnih antitela protiv uzročnika zaraze. Test su prvi primenili Almroth Rajt (*Almroth Wright*) i Francis Smit (*Francis Smith*) 1897. godine u dijagnostici bruceloze kod ljudi, a zahvaljujući jednostavnosti, brzini izvođenja i ekonomičnosti, ubrzo je postao široko primenjiv u laboratorijskoj praksi. Iako je bio veoma osetljiv, davao je i značajan broj lažno pozitivnih rezultata, pa su u cilju povećanja specifičnosti tokom vremena vršene brojne modifikacije. Rastući značaj bruceloze, uz identifikaciju novih vrsta brucela, zahtevao je unapređenje postojećih i razvoja novih testova u cilju što preciznije dijagnostike (Radojičić, 2005).

Za proizvodnju seroloških testova kao antigen koristi se glatki LPS O bočni lanac *B. abortus* koji je po hemijskoj strukturi 4,6-dideoksi-4-formamid-alfa-d-manoza, povezan 1,2-glikozidnim vezama (Bundel i sar., 1987). Kako ovaj homopolimer poseduje epitope koji su zajednički za *B. abortus*, *B. suis* i *B. melitensis*, razlike koje postoje između ovih vrsta ne ograničavaju primenu seroloških testova za dijagnostiku antitela protiv S brucela (Douglas i Palmer, 1988).

Slične LPS epitope poseduju i druge bakterije, od kojih je najznačajnija *Yersinia enterocolitica* O:9, što dodatno umanjuje specifičnost testova u serološkoj dijagnostici bruceloze svinja. *Yersinia enterocolitica* je patogen široko rasprostranjen u populaciji svinja i najčešći je uzrok lažno pozitivnih rezultata u standardnim serološkim testovima za brucelozu (EFSA, 2009). Lažno negativne reakcije predstavljaju veći rizik, pospešujući širenje infekcije, uzrokujući veće ekonomske gubitke i povećanje rizika za javno zdravlje. Početak infekcije, infekcija kod gravidnih ženki kada se bakterije ne zadržavaju dovoljno dugo u krvi što bi izazvalo stvaranje merljivog titra antitela, prozon efekat i subjektivnost pri proceni rezultata, posebno kod aglutinacionih testova, neki su od faktora koji doprinose lažno negativnim rezultatima.

U skladu sa preporukama Svetske organizacije za zdravlje životinja (World Organisation for Animal Health, WOAH), serološka dijagnostika bruceloze sprovodi se kroz dvostepeni pristup: prvo se primenjuju brzi i visokoosetljivi trijažni (*screening*) testovi za identifikaciju potencijalno pozitivnih jedinki, nakon čega se rezultati potvrđuju testovima veće specifičnosti.

Serološki testovi koji su najčešće u upotrebi su:

- brza serumska aglutinacija (Rose Bengal test);
- reakcija vezivanja komplementa (RVK);
- test fluorescentne polarizacije (FP);
- imunoenzimski test (ELISA).

Rose Bengal test

Rose Bengal test (RBT) se danas široko primenjuje kao skrining metoda za identifikaciju potencijalno zaraženih jedinki. Naziv testa potiče od boje korišćene u pripremi antigena, a metoda se zasniva na reakciji aglutinacije u puferizovanom, kiselom medijumu (pH $3,65 \pm 0,05$), pri čemu je antigen prethodno inaktivisan zagrevanjem i fenolom, zatim obojen i razređen u odgovarajućem puferu. Ukoliko su u ispitujućem serumu prisutna specifična antitela protiv brucela, u reakciji dolazi do njihovog vezivanja za aglutinogen (inaktivisanu suspenziju *B. abortus* soj 99 ili 1119-

3), što dovodi do formiranja okom vidljivih aglutinata čija se pojava definiše kao pozitivna reakcija. RBT je preporučeni test u dijagnostici bruceloze kod svih vrsta divljih životinja (WOAH, 2024).

Reakcija vezivanja komplementa

Reakcija vezivanja komplementa (RVK) se često koristi u serološkoj dijagnostici bruceloze, iako je sam postupak tehnički zahtevan i podrazumeva dobro opremljenu laboratoriju i stručno osoblje. RVK karakteriše visoka specifičnost, dok je osetljivost niža u poređenju sa RBT i ELISA testovima, naročito kod svinja. Razlog ovome je prokomplementarna aktivnost koja nastaje kao posledica interakcije između komplementa svinja i zamorca. Usled nemogućnosti eliminacije lažno pozitivnih rezultata, RVK ima ograničenu primenu u dijagnostici infekcija izazvanih *B. suis* i preporučuje se kao dopunska metoda (WOAH, 2024).

Test fluorescentne polarizacije

Ova polukvantitativna metoda zasniva se na principu fluorescentne polarizacije. Kao antigen se koristi niskomolekularni fragment O-polisaharida (prosečne molekulske mase oko 22 kDa) poreklom iz *B. abortus* koji je konjugovan fluorescentnom bojom (fluorescein izotiocijanat, FITC). U prisustvu specifičnih antitela u serumu dolazi do promene u stepenu polarizacije emitovane svetlosti, koja je proporcionalna koncentraciji antitela. Praud i sar. (2012) jasno su dokazali da ovaj test ne rešava problem lažno pozitivnih reakcija u dijagnostici bruceloze kod svinja, zbog čega je neophodna potvrda rezultata drugim metodama.

ELISA testovi

Usled boljih dijagnostičkih performansi, ELISA testovi se u dijagnostici bruceloze koriste za potvrdu rezultata skrining testa. U upotrebi su indirektni (iELISA) i kompetitivni (cELISA) testovi. Unakrsna reaktivnost do koje dolazi usled sličnih epitopa između različitih bakterija (*Brucella*, *Yersinia enterocolitica* O:9, *Salmonella*, *Francisella tularensis*, *E. coli* O157) može se primenom ovih testova prevazići.

U dijagnostici bruceloze kod svinja cELISA se ističe većom osetljivošću i specifičnošću u odnosu na druge testove (iELISA, FP i RBT) (Praud i sar., 2012, 2013).

Pored toga, cELISA predstavlja metodu izbora za serološka ispitivanja bruceloze kod divljih životinja, čiji su serumski neretko lošeg kvaliteta i skloni hemolizi (WOAH, 2024).

Dijagnostika bruceloze bakteriološkim metodama

Iako su molekularne i serološke metode značajno unapredile dijagnostiku bruceloze, izolacija brucela i dalje ima ključnu ulogu u potvrdi bolesti (WOAH, 2024). Uspešna izolacija uslovljena je brojnim faktorima, uključujući spor rast brucela u laboratorijskim uslovima, umanjenu sposobnost oporavka bakterija kod hronično inficiranih jedinki, kao i potrebu za dobro obučanim kadrom i strogo kontrolisanim uslovima rada. Dodatno, prisutan je i rizik od laboratorijskih infekcija, uz značajne troškove i relativno česte neuspehe, zbog čega se ova metoda ređe koristi u rutinskoj dijagnostici. Kontaminacija materijala poreklom od divljih svinja (najčešće ulovljenih) do koje dolazi prilikom uzorkovanja, ključni je faktor neizvesne izolacije brucela.

Sumnja na brucelozu se može postaviti bojenjem razmaza vaginalnih briseva modifikovanom metodom po Stampu (*Stamp*), dok je za postavljanje konačne dijagnoze neophodna izolacija i precizna identifikacija bakterija. Tkivo izbora za izolaciju brucela su limfni čvorovi, testisi, epididimisi, akcesorne polne žlezde, slezina, materica, mlečna žlezda, fetalne membrane i uzorci poreklom od pobačenih fetusa; sadržaj stomaka, slezina, pluća. Od živih jedinki najpogodniji su vaginalni bris, mleko, sperma i krv u fazi bakterijemije.

Za izolaciju brucela koriste se različite obogaćene hranljive podloge, sa ili bez dodatka seruma ili selektivne podloge kao što su Farelova (*Farrell*), modifikovana Tajner-Martinova (*Thayer-Martin*) ili CITA podloga sa dodatkom antibiotika (kolistin, vankomicin, nitrofurantoin, nistatin i amfotericin B).

Zasejane podloge inkubiraju se u aerobnim uslovima na 37 °C, sa ili bez 5-10% CO₂. Zbog čestog prerastanja brucela od strane drugih bakterijskih kontaminenata prisutnih u materijalu koji se zasejava, preporučuje se upotreba medijuma sa dodatkom selektivnih dodataka (seruma, antibiotika i slično) i inkubacija u atmosferi sa 5-10% CO₂. Ovi uslovi inkubiranja pospešuju rast različitih vrsta brucela koje mogu biti prisutne u zasejanom materijalu. Brucele karakteriše spor rast, te se preporučuje inkubacija od najmanje 8 dana, pri čemu se prve kolonije najranije očekuju nakon 3-4 dana. Kolonije *B. suis* su okrugle, providne, boje meda, glatkih rubova, 1-2 mm u dijametru, i ne izazivaju hemolizu na krvnom agaru.

Brucella suis biotip 2 teži je za izolaciju u poređenju sa biotipovima 1 i 3, a diferencijacija biotipova se može postaviti aglutinacijom na pločici sa monospecifičnim antiserumima u kombinaciji sa dodatnim bakteriološkim testovima (Alton, 1990). Precizna diferencijacija biotipa *B. suis* zavisi od osetljivosti na određene bakteriofage, sposobnosti proizvodnje vodonik sulfida (H₂S) i rasta u prisustvu boja bazni fuksin i tionin. Oksidativni metabolički test se takođe može koristiti, iako se ređe primenjuje. S obzirom na homologiju između rodova, automatizovani identifikacioni sistemi mogu pogrešno identifikovati izolate *B. suis* kao *Ochrobactrum* sp. (Vila i sar., 2016).

Molekularna dijagnostika bruceloze

Molekularna dijagnostika bruceloze zasniva se na detekciji genoma *Brucella* spp. i analizi karakterističnih DNK sekvenci, što omogućava preciznu identifikaciju vrste i biotipa uzročnika. Metode koje se najčešće primenjuju zasnovane su na lančanoj reakciji polimeraze (PCR), uključujući konvencionalni i real-time PCR, i ciljaju konzervirane gene, poput *bcsp31*, *omp2* i *IS711*, prisutne kod svih vrsta roda *Brucella*. Ovi testovi pouzdano potvrđuju prisustvo genoma brucela, ali su ograničeni u diferencijaciji pojedinačnih vrsta i biotipova.

Zbog ovih ograničenja razvijene su naprednije multipleks metode, kao što je Bruce-ladder PCR. Predstavljen od strane García-Yoldi i saradnika (2006), ovaj pristup zasniva se na osam parova prajmera specifičnih za različite *Brucella* spp. i omogućava simultanu identifikaciju i diferencijaciju klasičnih vrsta, uključujući vakcinalne sojeve S19, RB51 i Rev1.

Identifikacija *B. suis* zasniva se na prisustvu sedam amplikona različitih dužina (1682, 1071, 794, 587, 450, 272 i 152 bp), pri čemu je karakteristično prisustvo fragmenta od 272 bp, koji se javlja kod *B. canis* i *B. neotomae*. Jedan od glavnih nedostataka metode bio je mogućnost pogrešne

identifikacije pojedinih sojeva *B. canis* kao *B. suis*, što su López-Goñi i saradnici (2011) prevazišli modifikacijom odgovarajućeg para prajmera, razvijajući tako unapređeni protokol Bruce-ladder multiplex PCR v2.0.

Ista istraživačka grupa razvila je i specijalizovani multiplex PCR, nazvan Suis-ladder, koji omogućava brzu i pouzdanu identifikaciju svih biotipova *B. suis*, kao i diferencijaciju između *B. suis*, *B. canis* i *B. microti* (López-Goñi i sar., 2011).

Pored PCR metoda zasnovanih na detekciji specifičnih gena, molekularna dijagnostika uključuje i naprednije pristupe zasnovane na sekvenciranju DNK, koji omogućavaju detaljniju gensku karakterizaciju brucela.

Sekvenciranjem 16S rRNK kod brucela omogućava se potvrda pripadnosti bakterija rodu *Brucella*, dok sekvenciranje celog genoma (whole genome sequencing, WGS) pruža najpouzdaniju i najdetaljniju karakterizaciju izolata, uključujući uvid u genske varijacije i filogenetske veze.

Za epizootiološka ispitivanja bruceloze, koja se često sprovode kada je u pitanju infekcija kod divljih svinja, naročito je značajna MLVA. Ova analiza omogućava preciznu molekularnu diskriminaciju između izolata, što je ključno za identifikaciju izvora zaraze, praćenje puteva prenosa i analizu genske srodnosti brucela iz različitih geografskih područja i među različitim domaćinima (García-Yoldi i sar., 2007). Posebno MLVA zasnovana na analizi 16 lokusa (MLVA-16) pruža veću rezoluciju u odnosu na konvencionalno biotipiziranje, omogućavajući precizno razlikovanje blisko srodnih sojeva unutar istog biotipa (npr. u okviru *B. suis* biotip 2) (Ferreira i sar., 2017a)

Multilokusna tipizacija sekvenci (multilocus sequence typing, MLST) omogućava karakterizaciju izolata na osnovu sekvenci više konstitutivnih gena, pružajući uvid u filogenetske veze i evolutivnu raznolikost *Brucella* spp. (Whatmore i sar., 2007), dok analiza pojedinačnih nukleotidnih polimorfizama (SNP) omogućava praćenje finih genskih varijacija i detaljno mapiranje specifičnih evolutivnih linija između izolata (Foster i sar., 2009).

Značaj ekstrakcije DNK brucela u PCR dijagnostici bruceloze

Iako se molekularna dijagnostika odlikuje dobrim dijagnostičkim performansama, njena osetljivost može biti umanjena prisustvom supstanci koje inhibiraju amplifikaciju DNK, kao što su serumski proteini, ostaci somatskih ćelija, polisaharidi i druge komponente tkiva i telesne tečnosti (Wilson, 1997). Ovi inhibitori predstavljaju jedan od glavnih uzroka lažno negativnih rezultata, posebno u ispitivanjima kliničkih uzoraka poput homogenata različitih organa, koji ih često sadrže u značajnim količinama. Kako primenjeni protokol ekstrakcije utiče na količinu i kvalitet izdvojene nukleinske kiseline i ima značajnu ulogu u uklanjanju inhibitornih supstanci, njegov izbor se direktno odražava na konačni rezultat i smanjenje broja lažno negativnih PCR nalaza. Treba napomenuti i to da je broj brucela u tkivima često veoma mali, te da prinos ekstrahovane DNK može da bude ispod limita detekcije.

U cilju prevazilaženja ovih ograničenja, razvijen je veliki broj metoda za ekstrakciju nukleinskih kiselina. Ipak, uprkos značaju primenjene metode ekstrakcije DNK za osetljivost PCR dijagnostike

relativno mali broj studija bavio se procenom različitih načina ekstrakcije DNK brucela iz kliničkih uzoraka u cilju dijagnostike bruceloze.

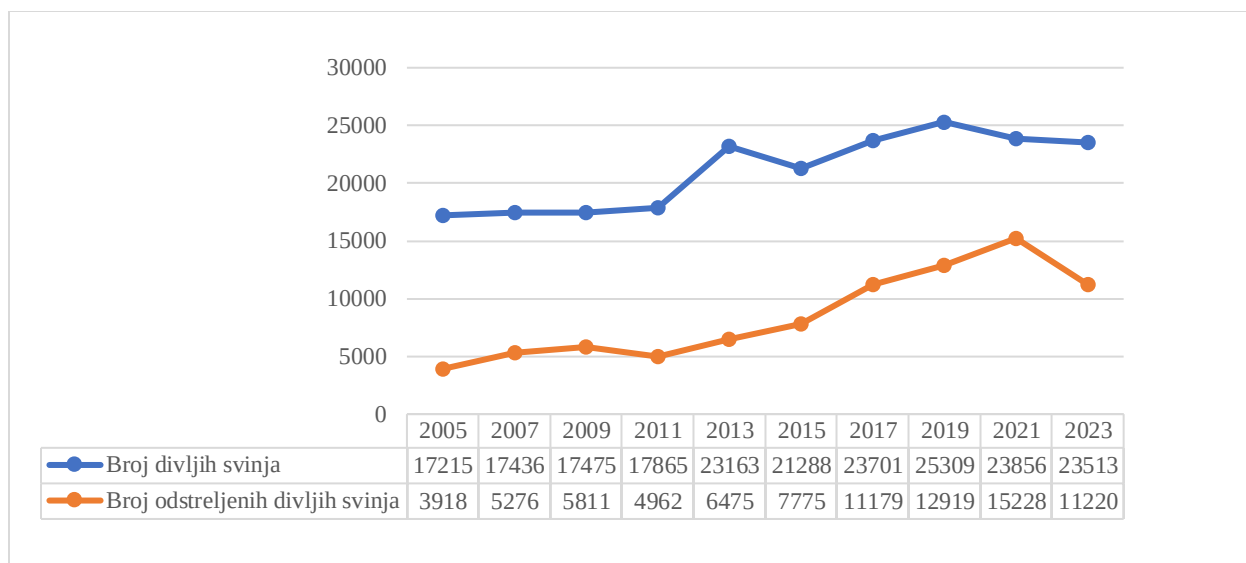
Među protokolima koji su pokazali dobre rezultate u molekularnoj dijagnostici *B. abortus* iz uzoraka organa izdvaja se metoda zasnovana na upotrebi proteinaze K koja pospešuje ćelijsku lizu. Ovaj metod je prvobitno predložen za detekciju *B. melitensis* u uzorcima krvi koza (Leal-Klevezas i sar., 1995), a kasnije se pokazao pogodnim i u eksperimentalnoj dijagnostici bruceloze iz veštački kontaminiranih uzoraka pobačenih fetusa kod goveda (Cortez i sar., 2001). Pored ovoga, protokol sa guanidin-izotiocijanatom omogućava pouzdanu, brzu i istovremenu izolaciju DNK, RNK i proteina iz tkiva i ćelija (Chomczynski, 1993), a na sličnom principu zasniva se i metod koji su predložili Boom i saradnici (1990), koji kombinuje dejstvo guanidin-izotiocijanata i adsorpcije DNK na čvrsti nosač (dijatomejsku zemlju). Među protokolima koji se zasnivaju na mehaničkom razaranju ćelija u cilju oslobađanja nukleinskih kiselina, izdvaja se protokol opisan od strane Santos i saradnika (1995), koji obuhvata korake kuvanja, a potom brzog zamrzavanja u tečnom azotu.

Sa razvojem tehnologije razvijeni su i komercijalni kitovi za ekstrakciju DNK, koji se u poređenju sa klasičnim laboratorijskim protokolima smatraju jednostavnijim za izvođenje, ali i pogodnijim za standardizaciju i širu primenu.

Značaj divljih svinja u Srbiji

Divlja svinja u Srbiji jedna je od četiri autohtone vrste papkara i predstavlja ekonomski najznačajniju vrstu za domaće lovstvo. Zahvaljujući povoljnim geografskim i reljefnim uslovima, našu zemlju karakteriše veliki broj lovišta. Tačnije, broj lovišta koja se prostiru na preko 7 miliona hektara prelazi 350, a divlja svinja se uzgaja u $\frac{3}{4}$ lovišta (Lavadinović i sar., 2020). Ukusno i kvalitetno meso, atraktivni trofeji i raznovrsni načini lova čine divlju svinju najtraženijom krupnom divljači, sa drugim najpopularnijim načinom lova među domaćim lovcima (Lavadinović i sar., 2020). Lov doprinosi očuvanju biodiverziteta jer lovci, kao upravljači populacijama divljači, regulišu njihovu brojnost. Istovremeno, odstrel divljih svinja predstavlja efikasan način kontrole populacije i smanjenja šteta koje ove životinje mogu izazvati.

U odnosu na period od pre 20 godina, broj divljih svinja na teritoriji Srbije se značajno povećao. Na slici 1 predstavljena je populacija divljih svinja i broj odstreljenih jedinki po godinama, sa приметnim trendom rasta oba parametra (sa izuzetkom veličine odstrela tokom 2023. godine usled nepovoljne epizootičke situacije sa afričkom kugom svinja i zabrane lova). Odnos polova unutar populacije približno je 1:1, a slično je i među odstreljenim jedinkama (mužjaci su zastupljeni sa 25%, a ženke sa 23%). U ukupnom odstrelu na nacionalnom nivou udeo mladih iznosi 52% (Lavadinović i sar., 2020).



Slika 1. Populacija divljih svinja i broj odstreljenih jedinki po godinama (podaci preuzeti od Republičkog zavoda za statistiku Srbije).

Prema podacima Ministarstva poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede procenjena gustina divljih svinja iznosi oko 0,33 jedinke po km², dok u pojedinim regionima dostiže 1-3 divlje svinje/km². Ove vrednosti su niže u poređenju sa podacima iz Evrope, gde gustina može dostići i do 15 jedinki/km² (ENETWILD-consortium, 2022).

Značaj divljih svinja u Srbiji ogleda se ne samo u njihovoj ekološkoj i lovno-privrednoj ulozi, već i u njihovom sve izraženijem značaju u kontekstu javnog zdravlja, posebno u uslovima njihove češće prisutnosti u blizini naseljenih mesta.

Poslednjih godina raste interesovanje i za mesom divljih svinja koje se smatra delikatesom i predstavlja kvalitetan izvor životinjskih proteina. Trupovi divljih svinja imaju manju masu u poređenju sa domaćim svinjama, dok meso karakteriše viša pH vrednost, veći sadržaj intramuskularne masti i udeo omega-3 nezasićenih masnih kiselina (Sampels i sar., 2023). Divlje svinje se ne tretiraju antibioticima ni hormonima, što predstavlja dodatnu prednost u odnosu na domaće životinje. Iako meso divljih svinja nije široko zastupljeno u ishrani stanovništva, tradicionalno se koristi u različitim proizvodima poput fermentisanih kobasica, koje ne podležu termičkoj obradi i samim tim mogu predstavljati rizik od zoonoznih bolesti (tuberkuloza, bruceloza, leptospiroza, trihinelozna i druge). Za razliku od mesa domaćih svinja, čija je primarna proizvodnja strogo kontrolisana, način lova i obrada odstreljenih divljih svinja na lovištima često ne zadovoljavaju higijenske standarde, što povećava rizik od kontaminacije trupova različitim patogenima.

Jedno zdravlje

Koncept *Jedno zdravlje* predstavlja integrisani i multidisciplinarni okvir usmeren na očuvanje i unapređenje ravnoteže između zdravlja ljudi, životinja i ekosistema (World Health Organization, WHO, 2023). Zasniva se na spoznaji da su navedeni sistemi međuzavisni i da poremećaji u jednom od njih mogu imati neposredne posledice po druge komponente.

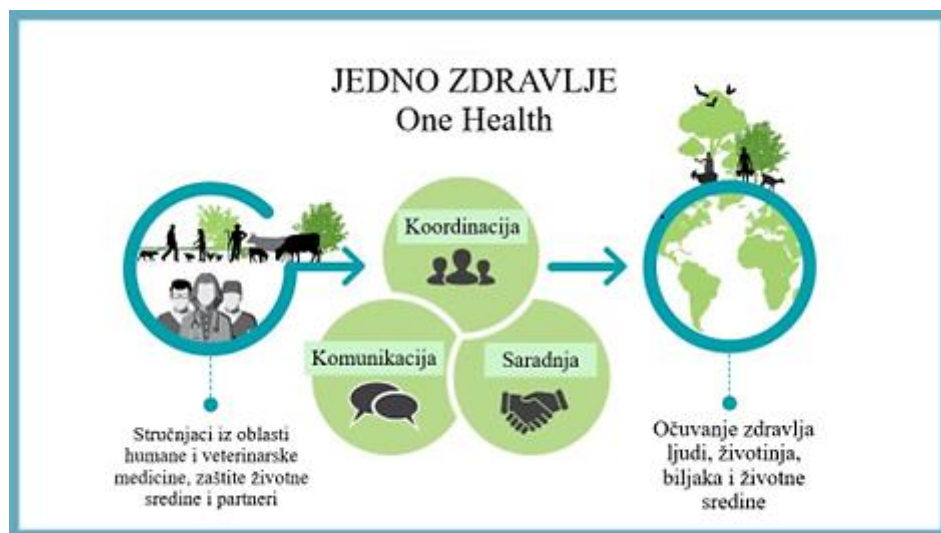
Iako se u savremenom kontekstu često smatra novim pristupom, ideja koja stoji u osnovi koncepta *Jedno zdravlje* poznata je više od jednog veka. Još je Hipokrat ukazivao na neraskidivu povezanost čoveka i njegove okoline, ističući da se ljudsko zdravlje ne može posmatrati odvojeno od spoljašnjih uticaja. Tokom XIX veka, Rudolf Virchov (*Rudolf Virchow*) otkrio je životni ciklus parazita *Trichinella spiralis*, čime je dokazao uzročno-posledičnu vezu između bolesti životinja i ljudi i uveo termin „zoonoza“. Na osnovama rada Rudolfa Virchova, Kalvin Švab (*Calvin Schwabe*) razvio je koncept „Jedne medicine“ (*One Medicine*), koji je podrazumevao integrisanu saradnju humane i veterinarske medicine u prevenciji i kontroli zoonoznih bolesti (Mackenzie i sar., 2014). Bruceloza je u ovom kontekstu imala ključnu ulogu, jer je na primeru ove zaraze Švab jasno demonstrirao potrebu za zajedničkim delovanjem različitih disciplina u dijagnostici, prevenciji i suzbijanju zoonoza.

Koncept je tokom vremena evoluirao u širi i savremeniji pristup *Jedno zdravlje*, koji danas obuhvata ne samo zoonoze, već i druge globalne izazove - antimikrobnu rezistenciju, bezbednost hrane, zagađenje životne sredine, klimatske promene, kao i pojavu i širenje vektorima prenosivih i zanemarenih tropskih bolesti (WHO, 2023). Suština ovog pristupa ogleda se u integraciji zdravlja ljudi, životinja i ekosistema radi zajedničkog delovanja različitih sektora u prevenciji, ranom otkrivanju i suzbijanju globalnih zdravstvenih pretnji.

Globalni značaj koncepta potvrđen je tokom epidemija i pandemija zoonoznog porekla, kao što su teški akutni respiratorni sindrom (SARS), ebola, ptičji grip, svinjski grip i druge. Ovi događaji jasno su ukazali na činjenicu da su zdravlje ljudi, životinja i životne sredine neraskidivo povezani, te da destabilizacija jednog segmenta može imati dalekosežne posledice po globalnu zdravstvenu bezbednost.

Prema procenama, približno 60% svih zaraznih bolesti kod ljudi ima zoonozno poreklo, dok više od 70% novih ili patogena koji se ponovo pojavljuju potiče od domaćih ili divljih životinja (Taylor i sar., 2001). Antropogene aktivnosti, kao što su intenzivna poljoprivreda, urbanizacija, narušavanje prirodnih staništa i klimatske promene, doprinose destruktiji ekosistema i stvaranju uslova pogodnih za pojavu i širenje novih zaraznih bolesti.

Kako pojave bolesti kod životinja često predstavljaju indikatore rizika za ljudsku populaciju, njihovo praćenje ima ključnu ulogu u sistemu ranog upozoravanja i prevencije. Stoga se bolesti životinja moraju posmatrati u širem ekološko-epidemiološkom kontekstu, a ne izolovano. Efikasna primena principa *Jednog zdravlja* podrazumeva aktivnu saradnju stručnjaka iz oblasti humane i veterinarske medicine, javnog zdravlja, ekologije i poljoprivrede, kao i koordinisano delovanje institucija i donosilaca odluka na lokalnom, nacionalnom i globalnom nivou (slika 2).



Slika 2. Koordinacija, komunikacija i saradnja između relevantnih segmenata u cilju zaštite i unapređenja zdravlja ljudi, životinja i životne sredine

Preuzeto i modifikovano sa: <https://www.cdc.gov/one-health/> (CDC U.S. Centers for Disease Control and Prevention)

Bruceloza divljih svinja u okvirima koncepta *Jedno zdravlje*

Bruceloza predstavlja jednu od najrasprostranjenijih zoonoza sa globalnim značajem. Iako je bolest poznata od davnina, brojna pitanja koja se odnose na njenu epizootiologiju, patogenezu i mehanizme održavanja u prirodi i dalje ostaju otvorena. Dinamika pojave i širenja bruceloze kod ljudi neposredno zavisi od prisustva i kretanja infekcije u populacijama životinja, dok je zdravlje životinja neraskidivo povezano sa promenama koje se odvijaju unutar složenih društveno–ekoloških sistema. Najefikasniji i najracionalniji pristup prevenciji bruceloze kod ljudi zasniva se na suzbijanju i eradikaciji uzročnika bolesti u prirodnim rezervoarima, odnosno u populacijama životinja (Corbel, 1997).

Savremena istraživanja ukazuju da su odstupanja od poznatih epizootioloških obrazaca bruceloze česta, što potvrđuje složenost interakcija između različitih životinjskih populacija. Posebno je značajna pojava tzv. *spillover* infekcija, odnosno prenos patogena sa divljih na domaće životinje, koje potom mogu predstavljati izvor zaraze za ljude (Godfroid i sar., 2011). Ova pojava posebno dobija na značaju u zemljama u kojima je bruceloza domaćih životinja iskorenjena ili se programi eradikacije nalaze u završnoj fazi sprovođenja.

Divlja svinja (*Sus scrofa*) ubraja se među najbrojnije i najrasprostranjenije vrste divljači u Evropi. Njena populacija beleži kontinuirani rast, što je posledica visokog reproduktivnog potencijala, odsustva prirodnih predatora i uticaja antropogenih faktora koji pogoduju širenju areala. Klimatske promene, naročito blaže zime, doprinele su produženju sezone parenja i povećanju preživljavanja mladunaca, dok je planska prihrana u lovištima dodatno stimulisala rast populacije. U brojnim evropskim državama broj divljih svinja višestruko je uvećan u odnosu na prethodne decenije; u Francuskoj je, na primer, populacija porasla četiri puta u poslednjih dvadeset godina. U Italiji je uveden program drastičnog smanjenja brojnosti divljih svinja koji uključuje angažovanje vojske,

sa ciljem smanjenja populacije za 80% u narednih pet godina radi suzbijanja afričke kuge svinja i zaštite poljoprivrede (Le Monde, 2024).

Divlje svinje predstavljaju važne rezervoare brojnih zaraznih bolesti, čiji su uzročnici patogeni različite etiologije: bakterijske, virusne i parazitske, među kojima se posebno izdvaja bruceloza (Ruiz-Fons, 2017). Iako se bruceloza divljih svinja intenzivno proučava, patogenost vrste *B. suis* biotip 2, za koju su ove životinje prirodni rezervoari, još uvek nije u potpunosti razjašnjena (Godfroid, 2002a). Supklinički tok bolesti, u kombinaciji sa specifičnim obrascima ponašanja i ekološkim osobinama divljih svinja, otežava potpuno razumevanje epizootiologije ove infekcije. Budući da je mortalitet izazvan brucelozom u ovoj populaciji minimalan, njen značaj se prvenstveno ogleda u održavanju uzročnika u prirodi i riziku od prenosa infekcije na domaće svinje, i ređe na druge domaće životinje i ljude (Garin-Bastuji i sar., 2000; Mailles i sar., 2017).

U razvijenim zemljama Zapadne i Centralne Evrope, kao i u Australiji i Americi, bruceloza domaćih svinja je praktično iskorenjena zahvaljujući primeni kontrolnih programa i strogih biosigurnosnih mera na farmama. U tim regionima, divlje svinje i evropski zec predstavljaju glavne izvore infekcije za domaće svinje. Genska sličnost izolata *B. suis* biotipa 2 poreklom od domaćih i divljih svinja potvrđuje horizontalni prenos patogena između ovih populacija (Kreizinger i sar., 2014).

Rizik od kontakta između divljih i domaćih svinja, a time i mogućnost prenosa infekcije, zavisi od više faktora, uključujući gustinu populacije, udaljenost farmi od naseljenih mesta i šumskih područja, kao i tip i visinu ograde. Istraživanje sprovedeno u Švajcarskoj pokazalo je da je 25% vlasnika svinja prijavilo prisustvo divljih svinja u blizini gazdinstava, dok je na 5% zabeleženo i parenje između divljih i domaćih svinja, što je rezultiralo rađanjem hibrida (Wu i sar., 2012).

Slučajevi izbijanja bruceloze kod svinja držanih na otvorenom nakon kontakta sa divljim svinjama dokumentovani su u Francuskoj, Nemačkoj, Belgiji i Hrvatskoj (Garin-Bastuji i sar., 2000; Melzer i sar., 2006; Špičić i sar., 2016).

Ekstenzivan način držanja svinja na malim gazdinstvima sa niskom biosigurnošću predstavlja važan faktor rizika za kontakt sa divljim svinjama i posledično prenos različitih patogena, naročito u područjima gde su staništa divljih svinja u neposrednoj blizini farmi na otvorenom.

Pored svinja, infekcije izazvane *B. suis* biotipom 2 povremeno su registrovane i kod goveda u regionima sa visokom brojnošću divljih svinja i zečeva (Fretin i sar., 2013; Szulowski i sar., 2013b). Iako su ove infekcije uglavnom samoograničavajuće, one mogu predstavljati dijagnostički izazov zbog mogućnosti lažno pozitivnih seroloških reakcija u testovima namenjenim otkrivanju *B. abortus*, što može umanjiti efikasnost programa nadzora i eradikacije bruceloze.

Infekcije pasa izazvane *B. suis* kao posledica kontakta sa divljim svinjama ili njihovim ekskretima tokom lovnih aktivnosti zabeležene su u više zemalja sveta (Ramamoorthy i sar., 2011; Mor i sar., 2016). U Australiji je zabeležena serokonverzija kod 6,6% ispitanih pasa (Kneipp i sar., 2021), dok je u Francuskoj 2020. godine po prvi put izolovan biotip 2 kod dva psa za koje se pretpostavlja da su bili u kontaktu sa divljim svinjama, zečevima ili njihovim ekskretima (Girault i sar., 2023). Pored toga, *B. suis* biotip 2 izolovan je i kod srndaća (*Capreolus capreolus*) sa unilateralnim orhitisom, pri čemu se pretpostavlja prenos infekcije sa divljih svinja (Gobbi i sar., 2023).

Iako se *B. suis* biotip 2 smatra vrstom sa niskim zoonoznim potencijalom, sporadični slučajevi infekcije kod ljudi potvrđuju njegov značaj, naročito kod imunokompromitovanih osoba i pojedinaca profesionalno ili rekreativno izloženih kontaktu sa divljači (Mailles i sar., 2017).

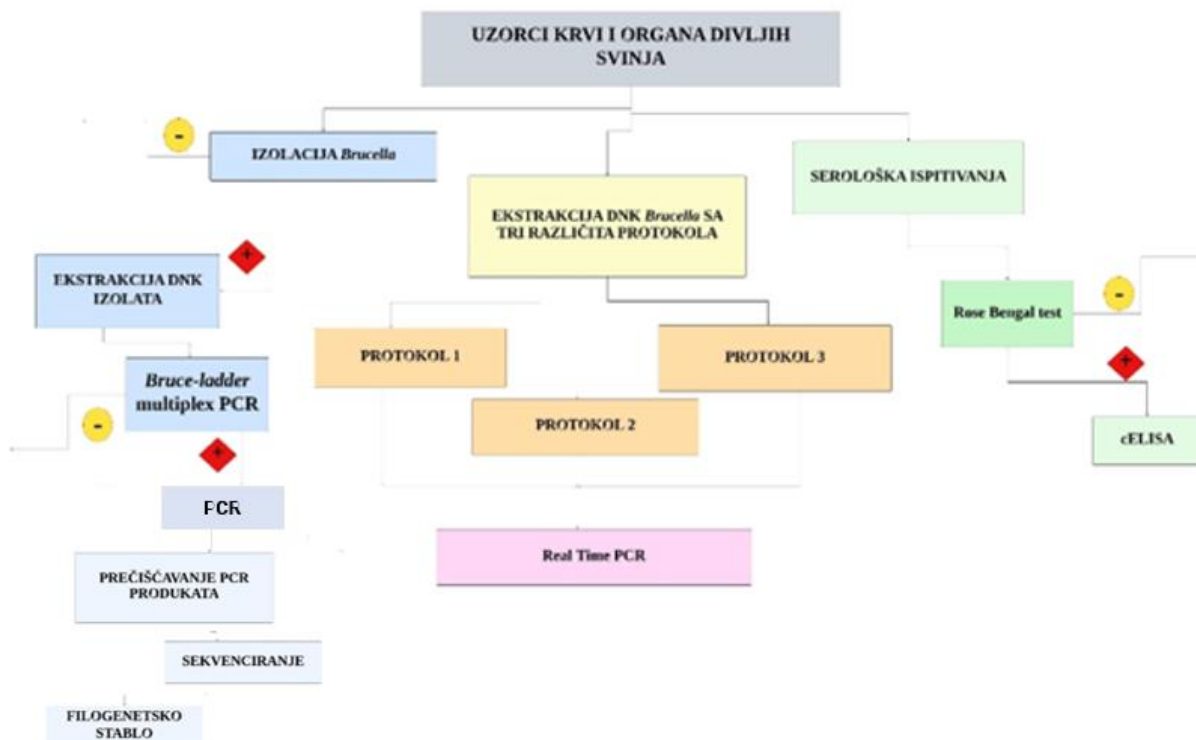
Pored *B. suis* biotip 2, koji je najčešće identifikovan kod divljih svinja, u ovoj populaciji su izolovane i druge vrste brucela: *B. abortus*, *B. melitensis* i *B. microti*, čiji epizootiološki značaj još uvek nije u potpunosti utvrđen (Rónai i sar., 2015; Ruano i sar., 2025; Stoffregen i sar., 2007).

Iz perspektive koncepta *Jedno zdravlje*, jasno je da nadzor i kontrola bruceloze u populaciji divljih svinja predstavljaju ključne komponente strategije suzbijanja ove zaraze. Efikasna primena takvog pristupa od suštinskog je značaja za sprečavanje širenja infekcije na domaće životinje i ljude, čime se doprinosi očuvanju javnog zdravlja i stabilnosti ekosistema.

CILJ I ZADACI ISTRAŽIVANJA

Cilj ove doktorske disertacije je da se utvrdi prisustvo i raširenost vrsta *Brucella* i biotipova kao i da se ustanovi postojanje serološkog odgovora u populaciji divljih svinja na teritoriji Republike Srbije. Uz to, molekularnim metodama potrebno je izvršiti karakterizaciju izolata *Brucella* spp., definisati najpovoljniji protokol za ekstrakciju DNK brucela, kao i procenu validnosti upotrebljenih seroloških testova u dijagnostici bruceloze kod divljih svinja. U skladu sa postavljenim ciljevima definisani su sledeći zadaci:

1. Prikupljanje krvi i organa divljih svinja;
2. Obrada uzoraka za ispitivanje: odvajanje krvnog seruma, homogenizacija organa, pakovanje i odlaganje uzoraka do dalje obrade;
3. Serološko ispitivanje krvnih seruma RBT i cELISA testom;
4. Bakteriološko ispitivanje - izolacija *Brucella* spp. iz prikupljenih uzoraka na bifaznom Kastaneda medijumu;
5. Molekularno ispitivanje izolata Bruce-ladder multiplex PCR testom;
6. Sekvenciranje genoma i genotipizacija izolata *Brucella* spp.;
7. Ekstrakcija bakterijske DNK iz uzoraka divljih svinja sa tri različita protokola;
8. Molekularno ispitivanje DNK ekstrahovane sa tri različita protokola metodom real-time PCR u cilju dokazivanja prisustva genoma *Brucella* spp.;
9. Statistička obrada rezultata i procena pogodnosti i validnosti primenjenih seroloških testova u dijagnostici bruceloze divljih svinja;
10. Definisanje najpovoljnijeg protokola za ekstrakciju DNK *Brucella* spp. iz tkiva;
11. Procena sveukupne epizootiološke situacije sa definisanjem rizičnih područja.



MATERIJAL I METODE

Materijal

Za potrebe istraživanja prikupljen je materijal koji je obuhvatao krv i organe divljih svinja odstreljenih tokom lovnih sezona u periodu 2020-2022. godine.

Istraživanje je odobreno od strane Etičke komisije za zaštitu dobrobiti oglednih životinja pri Fakultetu veterinarske medicine, Univerziteta u Beogradu, na sednici održanoj 08.11.2021. godine utvrđivanjem etičke opravdanosti sprovođenja eksperimenta (Mišljenje broj 26/2021).

Materijal za serološka ispitivanja

Krv divljih svinja za serološka ispitivanja sakupljena je u okviru monitoringa na klasičnu i afričku kugu svinja (u skladu sa Pravilnikom o utvrđivanju Programa mera zdravstvene zaštite životinja Ministarstva poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede), tokom lovnih sezona 2020-2021. i 2021-2022. godine. Uzorci krvi poticali su od jedinki sa teritorije šest upravnih okruga Srbije: Braničevskog, Borskog, Južnobanatskog, Zaječarskog, Pomoravskog i Šumadijskog, koji obuhvataju ukupnu površinu od 20241 km² (tabela 2).

Nakon odstrela, krv je uzorkovana iz srca ili grudne šupljine pomoću šprica i igle u sterilne epruvete sa aktivatorom koagulacije, obeležena i transportovana u Naučni institut za veterinarstvo Srbije radi dalje obrade.

Ukupno je sakupljeno 480 uzoraka krvi, 176 od krmača (36,67%) i 304 od veprova (63,33%).

Tabela 2. Uzorci krvi divljih svinja za serološka ispitivanja

Upravni okrug	Godina	Broj sakupljenih uzoraka krvi	Ukupno
Braničevski	2020	43	182
	2021	139	
Borski	2020	22	39
	2021	17	
Južnobanatski	2020	38	139
	2021	101	
Zaječarski	2020	23	64
	2021	41	
Pomoravski	2020	32	44
	2021	12	
Šumadijski	2020	0	12
	2021	12	
Ukupno			480

Materijal za bakteriološka i molekularna ispitivanja

Za izolaciju *Brucella* spp. i molekularna ispitivanja prikupljeni su organi i krv od divljih svinja odstreljenih u okviru monitoringa na klasičnu i afričku kugu svinja (u skladu sa Pravilnikom o utvrđivanju Programa mera zdravstvene zaštite životinja Ministarstva poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede) tokom lovne sezone 2021-2022. god. sa teritorije šest upravnih okruga Srbije: Južnobanatskog, Zaječarskog, Borskog, Šumadijskog, Beogradskog i Kolubarskog, ukupne površine od 19463 km².

Organi su pakovani pojedinačno u sterilne biohazard kese, a krv uzorkovana iz srca ili grudne šupljine u sterilne epruvete zapremine 10 mL. Za svaki uzorak popunjen je obrazac (prilog 1) sa podacima o odstreljenoj jedinki (pol, starost) i mestu ulova (geo koordinate), nakon čega su uzorci transportovani u Naučni institut za veterinarstvo Srbije, radi dalje obrade.

Od ukupno 85 divljih svinja (82 vepa i 3 krmače) prikupljeno je 114 uzoraka, uključujući testise sa epididimisima, cervikalne limfne čvorove, matericu, tonzile i krv (tabela 3).

Pored navedenih uzoraka, u ispitivanje je uključeno i 200 uzoraka slezina poreklom od divljih svinja prikupljenih u okviru programa monitoringa klasične i afričke kuge svinja (u skladu sa Pravilnikom o utvrđivanju Programa mera zdravstvene zaštite životinja Ministarstva poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede), tokom iste lovne sezone (2021-2022. god.) i sa teritorija istih upravnih okruga prethodno navedenih. Jedino su uzorci slezina od ovih životinja bili dostupni, dok drugi organi i krv nisu bili raspoloživi za analizu. Uzorci slezina ispitani su metodom real-time PCR za utvrđivanje genoma *Brucella* spp., prema protokolu opisanom u poglavlju Molekularna dijagnostika: real-time PCR (str. 36) pri čemu su formirani zbirni uzorci od po tri slezine.

U slučajevima kada je u zbirnim uzorcima slezina utvrđena pozitivna reakcija, izvršena je identifikacija pojedinačnih uzoraka koji su pokazali pozitivan nalaz. Slezine poreklom od dva vepa, u kojima je u pojedinačnom real-time PCR ispitivanju utvrđena pozitivna reakcija, izdvojene su za dalja bakteriološka i molekularna ispitivanja.

Na ovaj način, ukupno je prikupljeno i ispitano 116 uzoraka poreklom od 87 divljih svinja (tabela 3).

S obzirom na to da zbog nedostupnosti ili lošeg kvaliteta uzoraka krvi nije bilo moguće dobiti odgovarajući uzorak krvnog seruma od svih 87 divljih svinja, sakupljeno je ukupno 48 krvnih seruma, koji su uračunati u ukupan broj ispitanih krvnih seruma (materijal za serološka ispitivanja).

Najviše uzorkovanih veprova bilo je starije od 2,5 godine (35 jedinki), dok je u kategoriji starosti 1,5-2,5 godine uzorkovano njih 28, a u grupi 6-18 meseci 21 jedinka. Sve uzorkovane krmače (n=3) bile su starije od 2,5 godine.

Tabela 3. Uzorci divljih svinja za bakteriološka i molekularna ispitivanja

Uzorak	Upravni okrug						Ukupno uzoraka
	JB	BG	KO	ŠU	BO	ZA	
Testisi sa epididimisima	31	2	6	13	14	16	82
Cervikalni limfni čvor	5	0	0	0	0	4	9
Tonzile	7	0	0	0	0	3	10
Materica	0	1	0	0	2	0	3
Slezina*	0	0	1*	0	1*	0	2
Krv	4	0	0	1	2	3	10
Ukupno							116

JB-Južnobanatski, BG-Beogradski, KO-Kolubarski, ŠU-Šumadijski, BO-Borski, ZA-Zaječarski

*uzorci izdvojeni za bakteriološka i molekularna ispitivanja

Priprema uzoraka za ispitivanja

U zavisnosti od tipa uzorka i vršenih analiza, priprema je vršena na sledeći način:

- Za serološka ispitivanja, krv je nakon spontane koagulacije centrifugirana na 1500 x g u trajanju od 10 minuta. Izdvojeni serumi su prebačeni u Eppendorf mikrotube i čuvani na -20 °C, do momenta izvođenja analiza.
- Uzorci krvi za bakteriološka i molekularna ispitivanja zamrznuti su bez prethodne obrade na -20 °C, do izvođenja analiza.
- Organi su usitnjeni pomoću sterilnih makazica i pincete, zatim homogenizovani tučkom i tarionikom, nakon čega je pravljena 10% suspenzija u fosfatnom puferu (*Phosphate Buffered Saline*, PBS). Suspenzija je centrifugirana na 1500 x g 10 min. Supernatant je odvojen i zamrznut na -20 °C do daljih analiza.

Referentni materijali

U serološkim ispitivanjima kao kontrole, korišćeni su referentni serumi za brucelozu poreklom od goveda i svinja (tabela 4).

Za izvođenje Bruce-ladder multipleks PCR metode u cilju tipizacije izolata koja je vršena na Katedri za zarazne bolesti životinja i bolesti pčela Fakulteta veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu, pored referentnog soja *B. suis*, korišćene su i DNK *B. canis*, *B. melitensis* biotip 3 i *B. suis* biotip 2 izolovane na Katedri za zarazne bolesti životinja i bolesti pčela Fakulteta veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu. Svi korišćeni izolati potvrđeni su u referentnoj laboratoriji ANSES u Francuskoj.

Molekularna ispitivanja (Bruce-ladder multipleks PCR, konvencionalni i real-time PCR) koja su vršena u Naučnom institutu za veterinarstvo Srbije podrazumevala su upotrebu pozitivne kontrole soja *B. suis* biotip 2 izolovanog u Nacionalnoj referentnoj laboratoriji za brucelozu Naučnog instituta za veterinarstvo Srbije (NRL za brucelozu NIVS) čije su sekvence deponovane u NCBI

GenBank, pristupni broj KT309077.1. Takođe je korišćena i DNK referentnih sojeva *B. canis* RM6/66, *B. melitensis* REV 1 (vakcinalni soj), *B. suis* BVI 1330 i *B. abortus* S19 koje su dobijene od PT provajdera APHA Scientific iz Velike Britanije.

Tabela 4. Referentni serum i korišćeni u serološkim ispitivanjima

Referentni serum	Oznaka	Proizvođač
Goveđi		
Bruceloza pozitivan	<i>Brucellosis reference serum positive</i>	MRI-BRU
Bruceloza negativan	<i>Brucellosis negative serum</i>	MRINEG-BRU
Svinjski		
Bruceloza pozitivan	<i>Swine brucellosis positive serum</i>	MRI-BRU-SUIS
Bruceloza lažno pozitivan	<i>Swine brucellosis false positive</i>	MRI-BRU-SUIS-FP
Bruceloza negativan	<i>Swine brucellosis negative serum</i>	MRINEG-BRU-SUIS

Metode ispitivanja

Krvni serum i divljih svinja ispitani su serološkim testovima (RBT i cELISA), a krv i homogenizovani organi bakteriološkim metodama u cilju izolacije *Brucella* spp. Dobijeni izolati potvrđeni su Bruce-ladder multipleks PCR reakcijom. U cilju dokazivanja prisustva genoma *Brucella* spp. u obrađenim tkivima divljih svinja rađen je real-time PCR, nakon ekstrahovanja DNK sa tri različita protokola.

Metode serološke dijagnostike

Za serološka ispitivanja korišćena su dva testa, a ispitano je ukupno 480 krvnih seruma divljih svinja. Inicijalno su svi serum i pregledani skrining Rose Bengal testom, a potom su uzorci koji su reagovali pozitivno ispitani potvrdnim cELISA testom. Samo u slučaju kada su na oba testa dali pozitivnu reakciju, uzorci su smatrani pozitivnim.

Rose Bengal test

Rose Bengal test je izvođen upotrebom komercijalno dostupnog antigena (Rose Bengal, ID.vet, Francuska), koji predstavlja suspenziju *B. abortus* biotip 1 soj Weybridge 99, prema proceduri opisanoj od Alton i saradnika (1988). Jednake zapremine (po 25 µL) antigena i ispitujućeg seruma divljih svinja mešane su na staklenoj ploči, formirajući krug prečnika 2 cm. Ploča se postavlja iznad svetlosnog izvora i nežnim pokretima rotira tokom 4 minuta. Nakon isteka zadatog vremena reakcija je očitana, pri čemu se svaka pojava aglutinacije smatra pozitivnom.

cELISA

Komercijalni kit SVANOVIR® Brucella-Ab C-ELISA (Svanova, Švedska) je kompetitivni imunoenzimski test korišćen za dokazivanje prisustva specifičnih antitela protiv uzročnika bruceloze. Test se primenjuje u serološkoj dijagnostici bruceloze kod više vrsta životinja, uključujući svinje. Zasniva se na principu „takmičenja“ antitela protiv brucela sa monoklonskim antitelima miša (mAb), specifičnim za epitope O-polisaharidnog dela S-LPS-a, u vezivanju za antigen (S-LPS *Brucella*) kojim su obloženi bunari mikrotitar ploče. Ukoliko su specifična antitela protiv brucela prisutna u ispitujućem serumu, ona se vezuju za antigene u bunarima i onemogućavaju vezivanje mAb, dok se u njihovom odsustvu mAb slobodno vezuju.

Nakon inkubacije i ispiranja, dodaju se kozja anti-mišja antitela konjugovana peroksidazom, koja se vežu za mAb, u slučaju odsustva specifičnih antitela u uzorku. Nevezani materijali uklanjaju se ispiranjem, a dodavanjem supstrata pojavljuje se plava boja kao rezultat konverzije od strane konjugata, što označava negativan rezultat. Reakcija se zaustavlja dodavanjem stop rastvora, pri čemu boja prelazi u žutu.

Rezultat se čita spektrofotometrijski na talasnoj dužini od 450 nm.

Korišćena oprema: ispirać mikrotitar ploča proizvođača BioRad (PW40, Francuska) i spektrofotometar proizvođača Tecan (Sunrise™, Austrija).

Test je izveden prema uputstvu proizvođača na sledeći način:

- U odgovarajuće bunare mikrotitar ploče uliveno je po 45 µl razređivača i dodato po 5 µl ispitujućeg seruma i kontrola (pozitivna, slabo pozitivna i negativna kontrola).
- U bunare određene za kontrolu konjugata sipano je dodatnih 5 µl razređivača.
- Kontrole i kontrola konjugata izvedeni su u duplikatu.
- Nakon dodavanja 50 µl monoklonskog antitela u sve bunare, mikrotitar ploča je prelepljena samolepljivom folijom i pažljivo mešana tokom 5 minuta.
- Ploča je inkubirana na sobnoj temperaturi (18-25 °C) tokom 30 min.
- Nakon ispiranja (4x) dodato je 100 µl konjugata, a ploča je prelepljena samolepljivom folijom i inkubirana 30 min na sobnoj temperaturi.
- Postupak ispiranja je ponovljen 6 puta i dodato je 100 µl supstrata.
- Nakon inkubacije od 10 min na sobnoj temperaturi, reakcija je zaustavljena ulivanjem 50 µl stop rastvora, a vrednosti optičke gustine (optic density, OD) očitane su na 450 nm.

Kriterijumi validacije testa bili su:

- OD vrednost kontrole konjugata u intervalu 0,75-2,0
- procenat inhibicije pozitivne kontrole 80-100
- procenat inhibicije slabo pozitivne kontrole 30-70

- procenat inhibicije negativne kontrole (-10)-15

Za svaki ispitujući serum je izračunat procenat inhibicije (PI) prema formuli:

$$PI = 100 - \frac{(OD \text{ uzorka} \times 100)}{OD \text{ kontrole konjugata}}$$

Rezultati su interpretirani na sledeći način:

- PI<30% negativno, odnosno u ispitnom uzorku nisu prisutna specifična antitela i
- PI≥30% pozitivno, odnosno u ispitnom uzorku su prisutna specifična antitela.

Izolacija *Brucella* spp. i potvrda izolata multiplex PCR metodom

U cilju izolacije *Brucella* spp. prikupljeni uzorci divljih svinja zasejavani su na selektivni, bifazni Kastaneda medijum razliven u Demetrovim bocama. Za tu svrhu korišćeni su: *Brucella* Selective Supplement (Oxoid, UK), Tryptone soya agar (Oxoid, UK), Tryptone soya broth (Oxoid, UK), Dekstroza (Torlak, Srbija), Horse serum (Capricorn scientific, Nemačka), Metanol (Centrohem, Srbija).

Za održavanje brucela i njihovu vizuelizaciju korišćeni su inkubator Thermo Scientific Heraeus B12 (Nemačka) i svetlosni mikroskop Olympus TX 21 (Japan).

Bifazni Kastaneda medijum pripreman je razlivanjem 20 ml triptoznog agara (Tryptone Soya Agar, Oxoid, UK), uz dodatak selektivnog suplementa (*Brucella* Selective Supplement, Oxoid, UK), 10% konjskog seruma (Horse Serum, Capricorn Scientific, Nemačka) i 5% dekstroze. Nakon hlađenja agara, u boce je uliveno 15 ml triptoznog bujona, u koji su prethodno dodati isti selektivni dodatak, konjski serum i dekstroza. Sterilnost podloga proveravana je inkubacijom na 37 °C tokom 48 h. Po 1 ml homogenizovanih organa, odnosno krvi, zasejano je na podlogu pomoću automatske pipete Socorex Acura Manual 810 (Socorex, Švajcarska). Zasejane podloge inkubirane su na temperaturi od 37 °C u aerobnim uslovima tokom 10 dana. Ukoliko nakon ovog perioda nije došlo do rasta specifičnih kolonija inkubacija je prekidana. Ukupno je zasejano 116 uzoraka (testisi sa epididimisima, materica, cervikalni limfni čvor, tonzile, slezina, krv) poreklom od 87 divljih svinja.

Kolonije koje su morfološki odgovarale brucelama (okrugle, sitne, glatke, sjajne, providne) bojene su po Gramu, dok su izolati čije su karakteristike bile tipične za rod (crveni gram negativni kokobacili) dalje analizirani Bruce-ladder multiplex PCR reakcijom. Ekstrakcija DNK vršena je kitom za ekstrakciju IndiSpin® Pathogen Kit (Indical Bioscience, Nemačka). Korišćena je centrifuga M-24A (Boeco, Nemačka), LP Vortex Mixer (Thermo Fisher Scientific, SAD), kao i Eppendorf mikropipete različitog varijabilnog volumena. Za izvođenje Bruce-ladder PCR korišćeni su odgovarajući prajmeri, dNTP mix 20 mM each (Solis BioDyne, Estonija), 10x Reaction Buffer BD (Solis BioDyne, Estonija), MgCl₂ 25 mM (Solis BioDyne, Estonija), Ultrapure distilled water (Invitrogen, SAD) i Taq DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific, SAD). Za izvođenje PCR reakcije korišćeni su MiniAmp™ plus Thermo Cycler (Applied Biosystems, SAD), centrifuga M-24A (Boeco, Nemačka). Vizuelizacija PCR produkta vršena je uz pomoć 6x DNA loading dye Blue (Solis BioDyne, Estonija), 100 bp DNA Ladder (Thermo

Fisher Scientific, SAD), boje za gel Green Safe Premium (NZYtech, Portugalija), 10x TBE Electrophoresis Buffer (Thermo Fisher Scientific, SAD), Agarose (Sigma, Nemačka). Vizuelizacija PCR produkata vršena je uz pomoć aparata za elektroforezu PWR-3040 i UV Transilluminatora proizvođača MRC Laboratory Equipment (Izrael). Detaljan postupak izvođenja prikazan je u delu Molekularna dijagnostika. Nakon završenih ispitivanja izolacije i molekularne identifikacije na Katedri za zarazne bolesti životinja i bolesti pčela Fakulteta veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu, izolat je prosleđen laboratoriji NIV Srbija.

Molekularna dijagnostika

Ekstrakcija DNK izolata komercijalnim kitom

Komercijalni kit IndiSpin Pathogen Kit QIAGEN® (Indical Bioscience, Nemačka) korišćen je za ekstrakciju nukleinskih kiselina bakterijskih izolata.

Korišćena oprema: biohazard kabinet klase II (ALS, VBH36C2 Cabinet, Italija), mikrocentrifuga (HETTICH, typ 2004, SAD) i vortex (Thermolyne Type, M16710-12-26, SAD).

Postupak je izvođen na sobnoj temperaturi prema uputstvu proizvođača:

- U tubu zapremine 1,5 ml sipano je 20 µl proteinaze K, dodavano 200 µl prethodno homogenizovanih tkiva divljih svinja i 100 µl pufera VXL, a zatim vorteksovano na vibracionoj mešalici.
- Nakon inkubiranja 15 minuta na sobnoj temperaturi (20-25 °C) vršeno je kratko centrifugiranje kako bi se uklonile kapljice sa poklopca mikrotube.
- Dodavano je 350 µl ACB pufera, vorteksovano i kratko centrifugirano kako bi se uklonile kapljice sa poklopca mikrotube.
- Mešavina iz prethodnog koraka pažljivo je prenesena u QIAamp Mini kolonicu postavljenu u sabirnu tubu. Centrifugirana je na 6000 x g 1 minut. Kolonica je postavljena u novu sabirnu tubu, a stara i filtrat su odbacivani.
- Nakon pažljivog otvaranja kolonice dodavano je 600 µl pufera AW1. Centrifugiranje je vršeno na 6000 x g 1 minut. Kolonica je postavljena u novu sabirnu tubicu, a stara i filtrat su odbacivani.
- Nakon pažljivog otvaranja kolonice, dodavano je 600 µl pufera AW2. Centrifugiranje je vršeno na 6000 x g 1 minut. Kolonica je postavljena u novu sabirnu tubicu, a stara i filtrat su odbacivani.
- Zatvorene kolonice su centrifugirane pri punoj brzini (20000 x g) 2 minuta.
- Postaviti kolonice u mikrotube zapremine 1,5 ml, a sabirne tubice i filtrat odbaciti.
- Pažljivo otvoriti kolonicu i dodati 100 µl pufera AVE.

- Inkubiranje na sobnoj temperaturi trajalo je 1 minut, a zatim je vršeno centrifugiranje pri punoj brzini (20000 x g) 1 minut.
- Kolonice su odbacivane, a ekstrahovana DNK čuvana u mikrotubama na -20 °C.

Bruce-ladder multiplex PCR

Za identifikaciju izolata rađen je Bruce-ladder multiplex PCR, opisan od strane García-Yoldi i sar. (2006). Navedeni multiplex PCR obuhvata set od 8 pari prajmera (tabela 5), i predstavlja metod pogodan za identifikaciju i diferencijaciju klasičnih vrsta i vakcinalnih sojeva *Brucella* spp. u okviru istog testa.

Korišćena oprema: laminarna komora (Aquaria, GP Flow Plus PCR, Italija), centrifuga (FVL-2400N, Combi-Spin, SAD) i PCR aparat (Eppendorf Mastercycler, Nemačka).

Tabela 5. Spisak prajmera u Bruce-ladder multiplex PCR, sekvence i region za koji su specifični

Prajmeri	Sekvenca	Region
BMEI0998f	ATC CTA TTG CCC CGA TAA GG	gen <i>wbo A</i>
BMEI0997r	GCT TCG CAT TTT CAC TGT AGC	
BMEI0535f	GCG CAT TCT TCG GTT ATG AA	gen <i>bp26</i>
BMEI0536r	CGC AGG CGA AAA CAG CTA TAA	
BMEII0843f	TTT ACA CAG GCA ATC CAG CA	gen <i>omp31</i>
BMEII0844r	GCG TCC AGT TGT TGT TGA TG	
BMEI1436f	ACG CAG ACG ACC TTC GGT AT	Polisaharidna deacetilaza
BMEI1435r	TTT ATC CAT CGC CCT GTC AC	
BMEII0428f	GCC GCT ATT ATG TGG ACT GG	gen <i>ery C</i>
BMEII0428r	AAT GAC TTC ACG GTC GTT CG	
BR0953f	GGA ACA CTA CGC CAC CTT GT	Protein koji se vezuje za ABC nosač
BR0953r	GAT GGA GCA AAC GCT GAA G	
BMEI0752f	CAG GCA AAC CCT CAG AAG C	gen <i>rps L</i>
BMEI0752r	GAT GTG GTA ACG CAC ACC AA	
BMEII0987f	CGC AGA CAG TGA CCA TCA AA	Regulator transkripcije, CRP familija
BMEII0987r	GTA TTC AGC CCC CGT TAC CT	

Za izvođenje multipleks PCR reakcije korišćena je gotova reakciona smeša HotStarTaq Master Mix Kit (Qiagen, Nemačka), PCR čista voda (Thermo Fisher Scientific, SAD) i navedeni prajmeri u koncentraciji od 6,25 pmol. Reakciona smeša za izvođenje reakcije pripremljena je na način prikazan u tabeli 6.

Tabela 6. Reakciona smeša za Bruce-ladder multiplex PCR, zapremine potrebne za jedan uzorak

Reagens	Zapremina (μl)/ uzorak
HotStarTaq Master Mix	4,4
Prajmeri (svaki pojedinačni)	0,52
Voda	5,28
Ukupno	18

Reakcionoj smeši dodato je 2 μl ekstrahovane bakterijske DNK, čineći ukupnu zapreminu PCR mešavine 20 μl. Za pozitivnu kontrolu korišćena je DNK ekstrahovana iz soja *B. suis* biotip 2 (KT309077.1), a za negativnu PCR čista voda.

Program izvođenja reakcije je obuhvatao: inicijalnu denaturaciju na temperaturi od 95 °C u trajanju od 7 min, praćenu sa 25 ciklusa denaturacije DNK na temperaturi 95 °C, 35 s, hibridizacije prajmera 64 °C, 45 s i elongacije DNK lanaca na 72 °C, 3 min, i finalnu elongaciju na 72 °C u trajanju od 6 min.

Nakon završetka reakcije pristupa se vizuelizaciji dobijenih PCR produkata gel elektroforezom pri jačini struje od 60 mA i naponu od 120 V, u trajanju od 1 h.

Za izvođenje elektroforeze korišćena je kada (Hoefer, HE33, Nemačka), strujni izvor (Amersham Pharmacia Biotech, EPS301, UK) i transiluminator (Vilber Lourmat, Tcp-20-m, Francuska).

Pravljen je 1,5% agarozni gel sa dodatkom boje Midori Green DNA Stain (NIPPON Genetics EUROPE GmbH, Nemačka) u TBE puferu. Prilikom svake elektroforeze korišćen je molekularni marker standardne dužine 100-1000 baznih parova (Perfect™ DNA Ladder, EURx Ltd., Poljska).

Umnoženi PCR proizvodi uočavaju se kao kombinacija traka različitih dužina baznih parova, na osnovu koje je zasnovana identifikacija vrste brucela.

Konvencionalni PCR i prečišćavanje produkata

Za potrebe sekvenciranja izolata identifikovanog u Bruce-ladder multipleksu kao *B. suis* izveden je konvencionalni PCR primenom prajmera opisanih od strane Leal-Klevezas i sar. (1995).

Korišćena oprema: laminarna komora (Aquaria, GP Flow Plus PCR, Italija), centrifuga (FVL-2400N, Combi-Spin, SAD) i PCR aparat (Eppendorf Mastercycler, Nemačka).

Za izvođenje PCR reakcije korišćena je gotova reakciona smeša HotStarTaq Master Mix Kit (Qiagen, Nemačka), PCR čista voda (Thermo Fisher Scientific, SAD) i prajmeri: Forward (F): 5'-GCGCTCAGGCTGCCGACGCAA-3', Reverse (R): 5'-ACCAGCCATTGCGGTCTGGTA-3, a reakciona smeša za izvođenje reakcije pripremljena je na način prikazan u tabeli 7.

Tabela 7. Reakciona smeša korišćena u PCR reakciji

Reagens	Zapremina (μl)
HotStarTaq Master Mix	7,5
F prajmer (10μM)	0,7
R prajmer (10μM)	0,7
Voda	9,1
Ukupno	18

Reakcionoj smeši dodato je 2 μl ekstrahovane bakterijske DNK, čineći ukupnu zapreminu PCR mešavine 20 μl. Za pozitivnu kontrolu korišćena je DNK ekstrahovana iz referentnog soja *B. suis* biotip 2 (KT309077.1), a za negativnu PCR čista voda.

Program izvođenja reakcije je obuhvatao: inicijalnu denaturaciju na temperaturi od 94 °C u trajanju od 4 min, praćenu sa 35 ciklusa denaturacije DNK na temperaturi 94 °C, 60 s, hibridizacije prajmera 60 °C, 60 s i elongacije DNK lanaca na 72 °C, 1 min, i finalnu elongaciju na 72 °C u trajanju od 3 min.

Nakon završetka reakcije, PCR produkti su vizuelizovani gel elektroforezom na 1,5% agaroznom gelu, koristeći istu opremu i parametre, opisane u prethodnom odeljku.

Dužina PCR proizvoda određena je poređenjem sa molekularnim markerom koji sadrži produkte dužine od 100 do 1000 baznih parova.

Za potrebe sekvenciranja, produkti specifične dužine su prečišćeni korišćenjem QIAquick® PCR Purification Kit (Qiagen, Nemačka), kako bi se uklonile sve neutrošene komponente i nespecifični fragmenti.

Korišćena oprema: biohazard kabinet (B-MaxPro, Berner flow Safe, Nemačka), univerzalna centrifuga za 24 uzorka (5430R, Eppendorf, Nemačka).

Postupak prečišćavanja, prema uputstvu proizvođača, obuhvata sledeće korake:

- 5 delova pufera PB je dodavano na jedan deo PCR proizvoda i sadržaj je izmešan.
- PCR proizvod iz prethodnog koraka je sipan u QIAquick kolonu.
- Kolona je centrifugirana na 20000 x g 30-60 s, a filtrat je odbacivan.
- Dodavano je 0,75 ml pufera PE za ispiranje DNK i centrifugirano 30-60 s. Filtrat je odbacivan.
- Prazna QIAquick kolona centrifugirana je još jednom (20000 x g) u trajanju od 1 min.
- QIAquick kolona je prebacivana u 1,5 ml mikrotubu.
- Dodavano je 50 μl pufera EB, za otpuštanje DNK sa membrane, i centrifugirano tokom 1 min (20000 x g).

Genomska i filogenetska analiza izolata

Prečišćeni PCR produkt poslat je na sekvenciranje Sanger metodologijom u komercijalni servis MacroGen Europe (Amsterdam, Holandija), a obrađene sekvence deponovane su u NCBI GenBank (PP785990.1).

Komparativna analiza sekvenci i BLASTn poređenje

U cilju utvrđivanja genetičke sličnosti i procene evolutivne stabilnosti izolata *B. suis* biotip 2 na teritoriji Srbije, izvršena je komparativna analiza nukleotidnih sekvenci između ZZS1 i izolata *B. suis* biotip 2 iz 2013. godine (GenBank: KT309077.1), koji je korišćen kao referentni. Analiza je sprovedena primenom alata BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) u okviru Nacionalnog centra za biotehnoške informacije (NCBI GenBank, Maryland, SAD). Korišćen je algoritam za uporedno poravnanje parova sekvenci (Pairwise Sequence Alignment) radi identifikacije procenata nukleotidne identičnosti (Identities), prisustva praznina (Gaps) i statističkog značaja podudarnosti (E-value). Fokus analize bio je na visoko konzerviranom regionu insercije sekvence IS711 (poznatom i kao IS6501), koji predstavlja dijagnostički marker za rod *Brucella*.

Sekvenciranje celog genoma (WGS) i bioinformatička obrada

Ekstrahovana bakterijska DNK poslata je na sekvenciranje celog genoma (WGS) u Laboratoriju za bakterijske zoonoze i molekularnu dijagnostiku bakterijskih bolesti pri Evropskoj referentnoj laboratoriji za brucelozu (EURL za brucelozu), ANSES, Maisons-Alfort, u Francuskoj.

Sekvenciranje je izvršeno na Illumina platformi, a bioinformatička obrada sirovih podataka sprovedena je prema protokolu LSA-INS-SB_1 (Anses – EU Reference laboratory for Brucellosis, Maisons-Alfort, Cedex, France). Kriterijum za visoki kvalitet očitavanja (*High-Quality*, HQ) postavljen je na prag od $\geq 80\%$, uz obavezno odsustvo kontaminacije stranom DNK.

Taksonomska identifikacija i procena dubine pokrivenosti vršene su u odnosu na referentne genome roda *Brucella*. Minimalni kriterijumi za dalju filogenetsku analizu bili su pokrivenost genoma $\geq 90\%$ i prosečna dubina čitanja (metodološki prag) (*depth*/dubina) $\geq 50X$.

Taksonomska identifikacija i in silico tipizacija

Taksonomska pripadnost izolata ZZS1 analizirana je primenom *in silico* alata za tipizaciju na nivou celog genoma. Identifikacija vrste izvršena je poređenjem asemblirane sekvence sa panelom reprezentativnih genoma roda *Brucella*, pri čemu su kao ključni parametri korišćeni filogenetska srodnost i podudarnost sa izolatima *B. suis* biotipa 2 deponovanim u bazama podataka.

Filogenetska analiza i konstrukcija stabla

Radi potvrde taksonomske pripadnosti na nivou roda, konstruisano je filogenetsko stablo koje obuhvata reprezentativne genome različitih vrsta roda *Brucella* (*B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. canis* itd.). Stablo je generisano na osnovu sličnosti celih genomskih sekvenci (whole-genome alignment) i konstruisano metodom maksimalne verodostojnosti (*Maximum Likelihood*). Kao koren stabla (*outgroup*) korišćen je referentni genom *B. melitensis* 16M (GCA_000007125.1). Vizuelizacija i finalna obrada izvršena je pomoću alata iTOL (Interactive Tree Of Life), uz integraciju metapodataka o geografskom poreklu i domaćinima referentnih sojeva iz panela.

Multilokusna tipizacija sekvenci (MSLT-9)

Genotipizacija izolata izvršena je MLST analizom devet lokusa: sedam standardnih "housekeeping" gena (*gap*, *aroA*, *glk*, *dnaK*, *gyrB*, *trpE*, *cobQ*) i dva dodatna markera (*int_hyp* i *omp25*).

Analiza tandemskih ponavljanja varijabilnog broja na više lokusa (MLVA-16)

U cilju postizanja veće epizootiološke rezolucije sprovedena je MLVA-16 analiza. Metoda je obuhvatila 16 varijabilnih lokusa podeljenih u tri panela: Panel 1 (osam lokusa za identifikaciju vrste), Panel 2A i Panel 2B (ukupno osam lokusa za finu diskriminaciju unutar vrste).

Ekstrakcija DNK iz uzoraka divljih svinja primenom tri protokola

Nukleinska kiselina iz sakupljenih uzoraka divljih svinja ekstrahovana je pomoću tri različita protokola:

- upotrebom komercijalnog kita za ekstrakciju;
- protokolom sa guanidin-izotiocijanatom (komercijalni naziv TRIzol™ Reagent);
- protokolom sa grejanjem i hlađenjem u tečnom azotu.

Ekstrakcija DNK komercijalnim kitom

Detaljan postupak ekstrakcije DNK iz uzoraka divljih svinja upotrebom komercijalnog kita (IndiSpin Pathogen Kit QIAGEN®, Indical Bioscience, Nemačka) opisan je u istom poglavlju Molekularna dijagnostika: Ekstrakcija DNK izolata komercijalnim kitom (str. 29).

Ekstrakcija DNK sa guanidin-izotiocijanatom (TRIzol™ Reagent)

Ekstrakcija DNK sa guanidin-izotiocijanatom (TRIzol™ Reagent, Thermo Fisher Scientific, SAD) vršena je prema protokolu opisanom po Chomczynski (1993) i modifikacijama od strane Matrone i sar. (2009).

Korišćena oprema: biohazard kabinet klase II (ALS, VBH36C2 Cabinet, Italija) i mikrocentrifuga (HETTICH, TYP 2004, Nemačka).

Postupak ekstrakcije obuhvatio je sledeće korake:

1. Zapremina od 400 µl homogenizovanog uzorka sipana je u mikrotube od 2 ml i dodato je 900 µl TRIzol™ Reagent.
2. Mikrotube su zatvorene i vorteksovane 15 sek.
3. Nakon 10 minuta, ponovo je urađeno vorteksovanje.
4. Dodato je 200 µl hloroforma, vorteksovano 15 sekundi i inkubirano na sobnoj temperaturi 10 min.
5. Centrifugiranje je vršeno na 12000 x g tokom 5 min.
6. Pažljivo je odlivana gornja (vodena) faza, a ostatku je dodato 700 µl propanola.
7. Homogenizovanje je vršeno manuelno, a zatim je vršeno zamrzavanje na -20 °C u trajanju od 2 h.
8. Centrifugiranje je vršeno na 12000 x g tokom 20 min i odlivan je supernatant.
9. Dodavano je 500 µl 70% etanola i vršena je ručna homogenizacija.
10. Centrifugiranje je vršeno na 12000 x g 10 min, a supernatant je odbacivan.
11. Sušenje se vršilo na vazduhu, na sobnoj temperaturi.
12. Dodavano je 30 µl TE purefa, vorteksovano 10 sek i stavljanu u suvo kupatilo na 56 °C tokom 15 min.
13. Ekstrahovana DNK je zamrzavana na -20 °C i čuvana do ispitivanja.

Ekstrakcija DNK grejanjem i hlađenjem u tečnom azotu

Ekstrakcija DNK metodom kuvanja, a potom i hlađenja u tečnom azotu vršena je prema protokolu koji su opisali Santos i sar. (1995).

Korišćena oprema: biohazard kabinet klase II (ALS, VBH36C2 Cabinet, Italija), mikrocentrifuga (HETTICH, TYP 2004, Nemačka), vortex (Thermolyne Type, M16710-12-26, SAD), termoblok (Grant, QBD1, UK) i centrifuga (MPW, 260R, Poljska).

Postupak ekstrakcije obuhvatao je sledeće korake:

1. 400 μ l homogenizovanog uzorka centrifugirano je na 14000 x g 5 min na 4 °C.
2. Supernatant je odlivan.
3. Pelet je suspendovan u 50 μ l 0,5 M NaOH i mešan 10 minuta.
4. Dodavano je 25 μ L 1M NaH₂PO₄.
5. Centrifugiranje je vršeno na 14000 x g 10 min na 4 °C, a zatim je odlivan supernatant.
6. Dodavano je 50 μ l Tris-EDTA pufer (TE 1% Triton X-10).
7. Kuvanje je vršeno u suvom kupatilu na 100 °C 10 min, nakon čega je usledilo centrifugiranje u trajanju od 15 sekundi.
8. Hlađenje je vršeno u tečnom azotu 5 min, a zatim je ponavljani korak centrifugiranja u trajanju od 15 sekundi.
9. Koraci kuvanja i hlađenja su ponavljani još 2 puta.
10. Dodavano je 150 μ l fenola.
11. Vorteksovanje je vršeno 20 sekundi, a zatim centrifugiranje (14000 x g 5 min na 4 °C).
12. 100 μ L ukupne zapremine tečne faze pažljivo je prebacivano u novu tubu.
13. U supernatant je dodavano 200 μ L fenol-hloroform-izoamil alkohola (25:24:1).
14. Nakon vorteksovanja u trajanju od 10 sekundi, usledio je korak centrifugiranja (14000 x g 5 min na 4 °C).
15. 75 μ L tečne faze prebacivano je u novu tubu i dodavana je podjednaka zapremina (75 μ L) propanola.
16. Posle koraka homogenizacije, usledilo je inkubiranje na -20 °C tokom 4 h.
17. Nakon centrifugiranja (14000 x g 10 min na 4 °C) odlivan je supernatant.
18. Dodavano je 400 μ L 70% etanola.
19. Nakon centrifugiranja (14000 x g 10 min na 4 °C), supernatant je odlivan, a pelet je sušen na sobnoj temperaturi.
20. Dodavano je 30 μ L TE pufera, vorteksovano 10 sekundi, a zatim je sušen na 56 °C tokom 15 minuta.
21. Ekstrahovana DNK čuvana je na -20 °C do daljeg ispitivanja.

Real-time PCR

Uzorci nukleinskih kiselina, ekstrahovani pomoću tri različita protokola, korišćeni su za izvođenje real-time PCR.

Reakcija je izvođena na aparatu real-time PCR system 7300, Applied Biosystems (SAD).

Za izvođenje reakcije korišćen je komercijalni kit Luna[®] Universal Probe qPCR Master Mix (BioLabs, SAD), PCR čista voda (Thermo Fisher Scientific, SAD) i prajmeri za ciljnu sekvencu IS711, opisani od strane Hinić i sar. (2008):

- Forward: 5'-GCTTGAAGCTTGCGGACAGT-3'
- Reverse: 5'-GGCCTACCGCTGCGAAT-3'
- Probe: 5'-FAM-AAGCCAACACCCGGCCATTATGGT-TAMRA-3'

Reakciona smeša za izvođenje reakcije pripremljena je na način prikazan u tabeli 8.

Tabela 8. Reakciona smeša za real-time PCR, zapremine potrebne za jedan uzorak

Reagens	Zapremina (μl)/ uzorak
Luna [®] Universal Probe qPCR Master Mix	5,5
Prajmer F (10 μM)	0,44
Prajmer R (10 μM)	0,44
TaqMan proba (10 μM)	0,22
Voda	3,4
Ukupno	10

Reakcionoj smeši dodato je 2,5 μl ekstrahovane DNK, čineći ukupnu zapreminu real-time PCR mešavine 12,5 μl. Za pozitivnu kontrolu korišćena je DNK ekstrahovana iz soja *B. suis* biotip 2 (KT309077.1), a za negativnu PCR čista voda.

Program izvođenja reakcije je obuhvatao: početnu denaturaciju 95 °C 1 min, praćenu sa 40 ciklusa denaturacije na 95 °C tokom 15 s i sintetisanja lanca DNK na 60 °C, 30 s. Uzorci sa Ct vrednostima ≤35 smatrani su pozitivnim.

Statistička analiza

Za statističke analize korišćen je softverski paket IBM SPSS v. 26.0.0.0, XLSTAT Version 2014.503. i OpenEpi Version 3 (https://www.openepi.com/Menu/OE_Menu.htm).

Razlike u učestalosti seroprevalencije starosnih kategorija i pola utvrđene su primenom Hi-kvadrat testa, odnosno Fišerovog egzaktnog testa, ukoliko je očekivana frekvencija po definisanoj grupi bila ispod 10. Određen je i relativni rizik, kao verovatnoća pojave bruceloze u izloženoj starosnoj grupi u odnosu na neizloženu starosnu grupu, kroz odnos razlika u incidenciji bruceloze, uz definisanje razlika u riziku od pojave bruceloze između različitih starosnih grupa. 95% interval poverenja (IP) određen je Wilsonovim metodom.

Dijagnostički parametri primenjenih seroloških testova, RBT i cELISA testa, obuhvatali su određivanje osetljivosti, specifičnosti, pozitivne i negativne prediktivne vrednosti, kao i odnosa pozitivne i negativne verovatnoće. Cohenov kapla test je korišćen za utvrđivanje usaglašenosti dva primenjena serološka testa. Vrednosti kapla koeficijenta u datim rasponima su ukazivali na sledeći nivo usaglašenosti: 0,0-0,20 - slaba usaglašenost; 0,21-0,40 - blaga usaglašenost; 0,41-0,60 - umerena usaglašenost; 0,61-0,80 - značajna usaglašenost i 0,81-1,00 - skoro potpuna usaglašenost.

Binarna logistička regresija je upotrebljena kako bi se utvrdila verovatnoća pojave bruceloze, odnosno razvoja serokonverzije kod različitih starosnih kategorija, kao i pola ispitanih divljih svinja. Kako pol nije imao uticaja na pojavu bruceloze, starost, kao nezavisna kategorijska varijabla je prikazana kroz finalni logistički model, uz definisanje odnosa verovatnoće (OV) i 95% IP.

REZULTATI

Rezultati seroloških ispitivanja

Za utvrđivanje prisustva specifičnih antitela protiv uzročnika bruceloze ispitano je 480 krvnih seruma poreklom od divljih svinja. Serološka ispitivanja obuhvatala su dva testa: RBT korišćen je kao skrining test, a potom su uzorci koji su dali pozitivnu reakciju aglutinacije ispitani cELISA testom. Samo u slučaju kada su na oba testa dali pozitivnu reakciju uzorci su smatrani pozitivnim.

Od 480 pregledanih krvnih seruma divljih svinja, serokonverzija protiv uzročnika bruceloze utvrđena je kod 45 jedinki. Ukupna seroprevalencija bruceloze kod divljih svinja na teritoriji Srbije iznosi 9,38% (95% IP: 7,08-12,31). U tabeli 9 prikazani su rezultati utvrđivanja prisustva specifičnih antitela protiv uzročnika bruceloze.

Tabela 9. Seroprevalencija bruceloze kod divljih svinja po okruzima i godini

Upravni okrug	Godina	Broj ispitanih seruma	Broj pozitivnih uzoraka	Seroprevalencija % (95% IP)	Ukupna seroprevalencija % (95% IP)
Braničevski	2020	43	5	11,63 (5,07-24,48)	12,64 (8,57-18,25)
	2021	139	18	12,95 (8,35-19,54)	
Borski	2020	22	2	9,09 (2,53-27,81)	7,69 (2,65-20,32)
	2021	17	1	5,88 (1,05-26,98)	
Zaječarski	2020	23	0	0 (-)	0 (-)
	2021	41	0	0 (-)	
Pomoravski	2020	32	7	21,88 (11,02-38,75)	22,73 (12,84-36,99)
	2021	12	3	25,0 (8,89-53,23)	
Južnobanatski	2020	38	1	2,63 (0,47-13,49)	6,47 (3,44-11,85)
	2021	101	8	7,92 (4,07-14,86)	
Šumadijski	2020	0	0	0 (-)	0 (-)
	2021	12	0	0 (-)	
Ukupno		480	45		9,38 (7,08-12,31)

Najveća seroprevalencija registrovana je u Pomoravskom okrugu tokom 2021. godine i iznosila je 25%, odnosno 21,88% tokom 2020. godine. Slede Braničevski, Borski i Južnobanatski okrug sa seroprevalencijom kod divljih svinja od 12,64%, 7,69% i 6,47%. U Zaječarskom i Šumadijskom okrugu nije dokazana serokonverzija ni kod jedne ispitane divlje svinje. Na slici 4 prikazana je prostorna distribucija divljih svinja kod kojih je ustanovljen serološki odgovor.



Slika 4. Geografska karta Srbije sa označenim lokacijama divljih svinja koje su serološki pozitivne na brucelozi

Rezultati seroloških ispitivanja divljih svinja prema starosnim kategorijama i polu, uz procenu rizika od pojave bruceloze

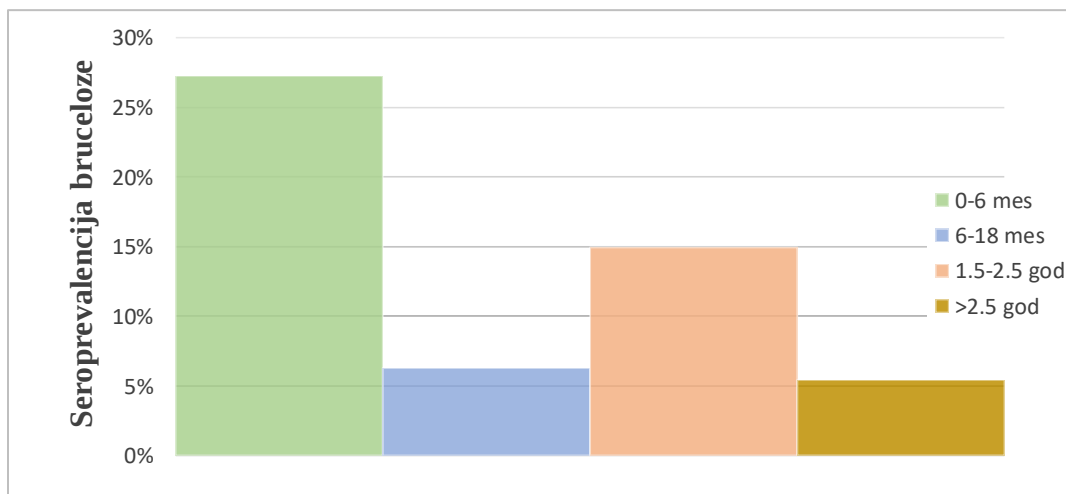
Najveći broj ispitanih divljih svinja pripadao je kategoriji 6-18 meseci starosti (n=223, 46,5%). U kategoriji 0-6 meseci starosti ispitano je 11 jedinki (2,2%), u kategoriji 1,5-2,5 godine 154 (32,1%), dok su 92 ispitane divlje svinje (19,1%) bile starije od 2,5 godine (tabela 10).

Tabela 10. Seroprevalencija bruceloze kod divljih svinja u Srbiji po starosnim kategorijama

Starosna kategorija	Broj testiranih	Broj pozitivnih	Seroprevalencija	95% IP	
				DG	GG
0-6 mes	11	3	27,27%	9,75%	56,56%
6-18 mes	223	14	6,28%	3,78%	10,26%
1,5-2,5 god	154	23	14,94%	10,16%	21,41%
>2,5 god	92	5	5,43%	2,34%	12,10%
Ukupno	480	45	9,38%	7,08%	12,31%

IP-interval poverenja, DG-donja granica, GG-gornja granica.

Najviša seroprevalencija bruceloze detektovana je u starosnoj kategoriji divljih svinja mlađih od 6 meseci (27,27%, n=3). U kategoriji 1,5-2,5 god seroprevalencija bruceloze kod divljih svinja iznosi 14,94% (n=23), a kod jedinki starih 6-18 meseci 6,28% (n=14). Najniža seroprevalencija bruceloze od 5,43% utvrđena je kod divljih svinja starijih od 2,5 godine (n=5) (slika 5).



Slika 5. Seroprevalencija bruceloze kod divljih svinja po starosnim kategorijama

Fišerovim egzaktnim testom utvrđena je statistički značajna razlika između starosnih grupa divljih svinja i seroprevalencije bruceloze ($p=0,0038$). Divlje svinje starosti 6–18 meseci pokazuju gotovo istu učestalost serokonverzije kao jedinke starije od 2,5 godine (relativni rizik 1,07). Divlje svinje starosti 1,5–2,5 godine izdvajaju se kao najrizičnija grupa, sa 2,75 puta većim relativnim rizikom od serokonverzije u odnosu na starije i 2,56 puta u odnosu na mlađe jedinke (tabela 11). Ovi nalazi su potvrđeni analizom razlika u riziku, koja je pokazala da jedinke starosti 1,5–2,5 godine imaju statistički značajno veći rizik od serokonverzije u poređenju sa jedinkama 6–18 meseci starosti

(9,11%, $p=0,0031$) i sa starijima od 2,5 godine (9,50%, $p=0,0235$). Razlika između najmlađih i najstarijih divljih svinja nije bila statistički značajna (0,39%, $p=0,0891$) (tabela 12).

Tabela 11. Relativni rizik od pojave bruceloze između različitih starosnih kategorija divljih svinja

Starosna kategorija	Relativni rizik	95% IP		<i>p</i> vrednost
		DG	GG	
1,5-2,5 god vs. 6-18 mes	2,56	1,34	4,90	0,0045
6-18 mes vs. >2,5 god	1,07	0,39	2,92	0,8909
1,5-2,5 god vs. >2,5 god	2,75	1,08	6,98	0,0335

IP-interval poverenja, DG-donja granica, GG-gornja granica

Tabela 12. Razlike u riziku od pojave bruceloze kod različitih starosnih kategorija divljih svinja

Starosna kategorija	Razlike u riziku	95% IP		<i>p</i> vrednost
		DG	GG	
1,5-2,5 god vs. 6-18 mes	9,11%	2,69%	15,52%	0,0031
6-18 mes vs. >2,5 god	0,39%	-5,17%	5,96%	0,0891
1,5-2,5 god vs. >2,5 god	9,50%	2,21%	16,79%	0,0235

IP-interval poverenja, DG-donja granica, GG-gornja granica

Binarnom logističkom regresijom potvrđeno je da divlje svinje starosti 1,5–2,5 godine imaju veću verovatnoću infekcije u poređenju sa najmlađom grupom ($B>0$), dok poređenje sa jedinkama starijim od 2,5 godine nije bilo statistički značajno ($B<0$). Verovatnoća infekcije kod jedinki starosti 1,5–2,5 godine je 2,61 puta veća u odnosu na jedinke starosti 6–18 meseci (tabela 13).

Tabela 13. Povezanost različitih starosnih kategorija divljih svinja sa seroprevalencijom bruceloze

	B	Standardna greška	Wald	<i>p</i> vrednost	OV	95% IP	
						DG	GG
Intercept	-2,708	0,276	96,253	<0,0001			
6-18 mes	0,000	0,000					
1,5-2,5 god	0,961	0,357	7,254	0,0071	2,6135	1,2990	5,2587
>2,5 god	-0,160	0,536	0,089	0,7656	0,8523	0,2979	2,4380

OV-odnos verovatnoće, IP-interval poverenja, DG-donja granica, GG-gornja granica

Pored starosne kategorije, utvrđeno je da između veprova i krmača nema statistički značajne razlike u seroprevalenciji ($\chi^2=0,8462$, $p=0,358$), što ukazuje da pol nije faktor rizika za infekciju u posmatranoj populaciji (tabela 14).

Tabela 14. Rezultati međusobnog poređenja značajnosti starosne kategorije i pola divljih svinja

	Stepen slobode	Hi-kvadrat test	<i>p</i> vrednost
6-18 mes vs. 1,5-2,5 god	1	7,4001	0,007
6-18 mes vs. >2,5 god	1	0,0861	0,769
1,5-2,5 god vs. >2,5 god	1	4,8517	0,028
Muški vs. Ženski pol	1	0,8462	0,358

Procena pogodnosti seroloških testova za dijagnostiku bruceloze kod divljih svinja

Statističkom obradom dobijenih rezultata, a na osnovu dijagnostičkih performansi testa (osetljivost i specifičnost), utvrđeno je da RBT tačno klasifikuje 98,96%, a pogrešno 1,04% ispitanih uzoraka.

Karakteristike RB testa za dijagnostiku bruceloze kod divljih svinja prikazane su u tabeli 15.

Tabela 15. Karakteristike RB testa

Statistički parametar	Vrednost	Donja granica (95%)	Gornja granica (95%)
Tačna klasifikacija	98,96%	98,05%	99,87%
Pogrešna klasifikacija	1,04%	0,13%	1,95%
Osetljivost	96,10%*	86,52%	98,95%
Specifičnost	99,30%*	97,97%	99,76%
% lažno pozitivnih	0,70%	0,24%	2,03%
% lažno negativnih	3,91%	2,45%	6,18%
PPV (pozitivna prediktivna vrednost)	93,96%	83,73%	97,92%
NPV (negativna prediktivna vrednost)	99,56%	98,35%	99,88%
LR+ (odnos pozitivne verovatnoće)	137,15	44,52	137,17
LR- (odnos negativne verovatnoće)	0,04	0,01	0,16
Dijagnostički odnos verovatnoća	3 486,65	555,49	21 884,54

*Podaci iz Etman i sar., 2014.

Statističkom obradom dobijenih rezultata, a na osnovu dijagnostičkih performansi testa (osetljivost i specifičnost) prijavljenih od strane proizvođača, cELISA klasifikuje tačno 99,58%, odnosno pogrešno 0,42% ispitanih uzoraka.

Karakteristike cELISA testa za dijagnostiku bruceloze kod divljih svinja prikazane su u tabeli 16.

Tabela 16. Karakteristike cELISA testa

Statistički parametar	Vrednost	Donja granica (95%)	Gornja granica (95%)
Tačna klasifikacija	99,58%	99,01%	100,00%
Pogrešna klasifikacija	0,42%	0,00%	0,99%
Osetljivost	99,50%	90,98%	99,97%

Specifičnost	99,60%	98,43%	99,90%
% lažno pozitivnih	0,40%	0,10%	1,57%
% lažno negativnih	0,50%	0,15%	1,73%
PPV (pozitivna prediktivna vrednost)	96,11%	85,96%	99,01%
NPV (negativna prediktivna vrednost)	99,95%	99,03%	100,00%
LR+ (odnos pozitivne verovatnoće)	248,18	56,57	248,18
LR- (odnos negativne verovatnoće)	0,0051	0,0001	0,3282
Dijagnostički odnos verovatnoća	48 842,17	573,53	4 159 440,17

Poređenje rezultata dobijenih cELISA i RBT, uz koeficijent Cohenove kape od 0,94 (SE=0,026; p=0,0001), ukazuje na gotovo savršenu usaglašenost između dva primenjena testa. Ovi rezultati potvrđuju da i cELISA i RBT pokazuju visok stepen podudarnosti u detekciji specifičnih antitela protiv uzročnika bruceloze kod divljih svinja, uz minimalan broj nepodudarajućih rezultata (tabele 17 i 18).

Tabela 17. Odnos rezultata dobijenih cELISA i RB testom

Laboratorijski test			RBT		Ukupno
			T-	T+	
cELISA	T-	Zbir	430	5	435
		Očekivano	389,7	45,3	435
		% cELISA	98,9%	1,1%	100%
		% RB	100%	10,0%	90,6%
	T+	Zbir	0	45	45
		Očekivano	40,3	4,7	45
		% cELISA	0%	100%	100%
		% RB	0%	90%	9,4%
Ukupno		Zbir	430	50	480
		Očekivano	430	50	480
		% cELISA	89,6%	10,4%	100%
		% RB	100%	100%	100%

Tabela 18. Usaglašenost RBT i cELISA

	Karakteristika	Vrednost	Standardna greška	p vrednost
Usaglašenost	Kapa koeficijent	0,94	0,026	0,0001
Broj validnih slučajeva		480		

Izolacija uzročnika bruceloze iz uzoraka divljih svinja

Izolacija brucela vršena je na bifaznom Kastaneda medijumu. Inkubacija je vršena tokom 10 dana na 37 °C, u aerobnim uslovima. Rast kolonija bio je primetan u proseku četvrtog dana, nakon čega su odabrane kolonije presejavane na triptozni agar i inkubirane u aerobnim uslovima na 37 °C do porasta.

Izrasle kolonije bile su sitne, konveksne i sjajne, providne, boje meda, odnosno morfološki su odgovarale kolonijama *Brucella* spp. Pripadnost rodu vršena je bojenjem bakterija po Gramu, pri čemu su ustanovljeni crveni, gram negativni kokobacili.

Ukupno je zasejano 116 uzoraka divljih svinja, a izolacija brucela bila je uspešna kod jednog vepara iz dva uzorka: cervikalnog limfnog čvora i krvi (slika 6). Zaraženi vepar, starosti 15-18 meseci potiče sa teritorije Južnobanatskog okruga.



Slika 6. Izolovana kultura *B. suis* na krvnom agaru

Identifikacija izolata primenom Bruce-ladder multiplex PCR

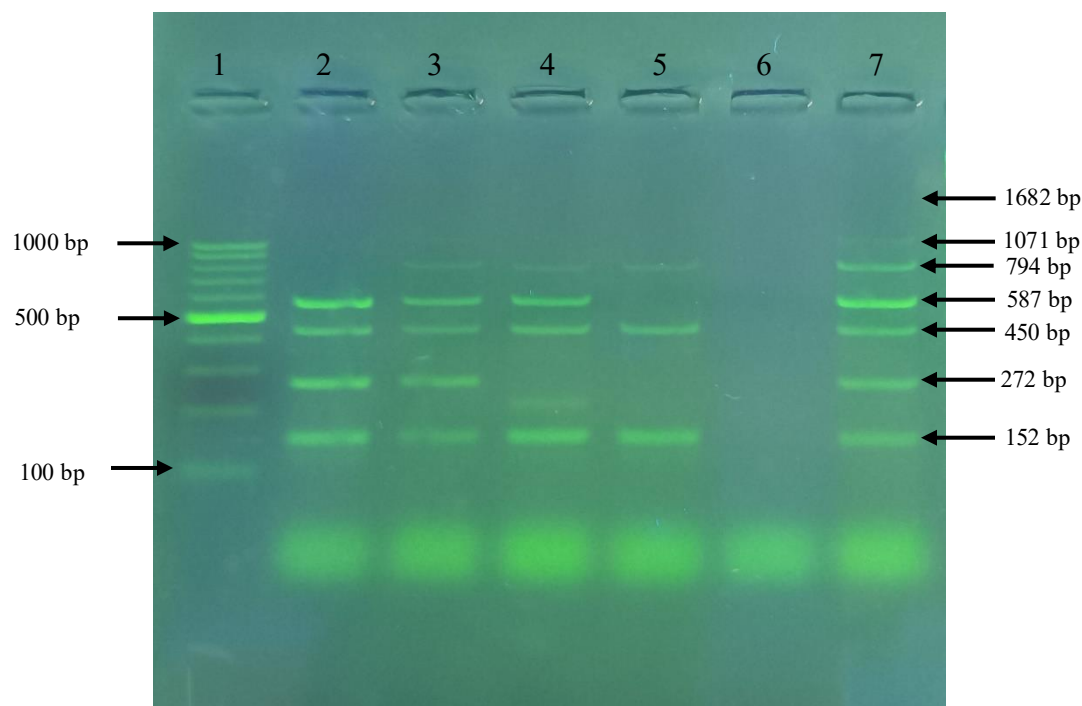
U cilju precizne identifikacije izolata rađen je Bruce-ladder multiplex PCR, prema prethodno opisanoj proceduri.

Nukleinska kiselina bakterija ekstrahovana je komercijalnim kitom IndiSpin Pathogen Kit QIAGEN® GmbH (Indical Bioscience, Nemačka), a nakon završetka reakcije pristupilo se vizuelizaciji produkata agar gel elektroforezom.

Ispitivani izolat pokazao je sedam amplikona dužina 1682, 1071, 794, 587, 450, 272 i 152 bp (slika 7, traka 7), što odgovara tipičnom obrascu za *B. suis*. Referentni soj *B. suis* biotip 2 (slika 7, traka 3), pokazao je identične amplikone.

Ključni fragment od 272 bp pojavljuje se i kod *B. canis*, što je prepoznato kao jedan od glavnih nedostataka metode. Ipak, odsustvo 794-bp fragmenta kod *B. canis* omogućava diferencijaciju između ove dve vrste.

Brucella melitensis karakteriše odsustvo 272-bp fragmenta, dok vakcinalni soj *B. abortus* (S19) pored navedenog fragmenta ne sadrži i dodatni fragment dužine 587 bp (slika 7).



Slika 7. Bruce-ladder multiplex PCR: traka 1-DNK marker 100-1000 bp, traka 2-izolat *B. canis*, traka 3-soj *B. suis* biotip 2 (KT309077.1), traka 4-referentni soj *B. melitensis*, traka 5-*B. abortus* S19, traka 6-negativna kontrola, traka 7-*B. suis* izolovana iz krvi i cervikalnog limfnog čvora divlje svinje

Rezultati molekularnih ispitivanja

Sekvenciranje izolata *B. suis* i genska analiza

Nukleinska kiselina izolata identifikovanog kao *B. suis* u Bruce-ladder multipleksu umnožena je prajmerima specifičnim za *Brucella* spp. (konvencionalni PCR), pri čemu je dobijen produkt dužine 456 bp, koji je sekvenciran Sanger metodologijom. Identifikovani region obuhvata IS5-slični element, transpozazu iz familije IS711 i gene koji kodiraju YdcH proteine. Izolat je nazvan ZZS1, a očitane sekvence su deponovane u NCBI GenBank sa pristupnim brojem PP785990.1 (slika 8).

```

1   GCAATCTCAAGGCAACGGCTCAGATCAAGGTCAATCCAACACGTTCCAGTGTCCCAACAA 60
1   GCAATCTCAAGGCAACGGCTCAGATCAAGGTCAATCCAACACGTTCCAGTGTCCCAACAA 60
61  TCGACTGGAGGCTGTACAAGGAACGCCATCAGATTGAATGCTTTTTTAACAAGTTGAAAC 120
61  TCGACTGGAGGCTGTACAAGGAACGCCATCAGATTGAATGCTTTTTTAACAAGTTGAAAC 120
121 GCTATCGTCGTATTGCGCTGCGATGCGAGAAAACATTGACCGCATTATGGGCTTCGTCC 180
121 GCTATCGTCGTATTGCGCTGCGATGCGAGAAAACATTGACCGCATTATGGGCTTCGTCC 180
181 ATCTCGCATGCGCTATGATCTGGTTGCGTTGAATGCAGACACGCCCTAAAGCAATTTCAA 240
181 ATCTCGCATGCGCTATGATCTGGTTGCGTTGAATGCAGACACGCCCTAAAGCAATTTCAA 240
241 GCCAAAAGATAAGATGCGCATCAAAGCAACAATTAGAGCGCGGATCTGGTTCATTTCAGAT 300
241 GCCAAAAGATAAGATGCGCATCAAAGCAACAATTAGAGCGCGGATCTGGTTCATTTCAGAT 300
301 CGAAACGCGCTCTAAAAGTGCTGCAAAATCAGAGGCTCAAAGCCCCACCGCGACCATAAGA 360
301 CGAAACGCGCTCTAAAAGTGCTGCAAAATCAGAGGCTCAAAGCCCCACCGCGACCATAAGA 360
361 GGTCAATAATTCTAGTGACGTGTTACTTGAGATTTTCAGTTTTTCAATCTGCTCCTTGAGC 420
361 GGTCAATAATTCTAGTGACGTGTTACTTGAGATTTTCAGTTTTTCAATCTGCTCCTTGAGC 420
421 ACAAGCTTCTTGCGCTTGAGAGATGCGATATGAAGA 456
421 ACAAGCTTCTTGCGCTTGAGAGATGCGATATGAAGA 456

```

Slika 8. Sekvence izolata ZZS1 (*B. suis* biotip 2) za analizirani region koji obuhvata IS5-slični element, transpozazu iz familije IS711 i gene koji kodiraju YdcH proteine, GenBank pristupni broj: PP785990.1

Komparativna analiza sekvenci i BLASTn poređenje

Uporednom analizom nukleotidnih sekvenci primenom BLASTn alata utvrđen je visok stepen genetičke podudarnosti između ZZS1 (GenBank: PP785990.1) i *B. suis* biotip 2 izolovanog kod domaćih svinja u Srbiji (KT309077.1) (slika 9).

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
161 bits(87)	7e-44	92/94(98%)	2/94(2%)	Plus/Plus
Query 135	GCGCTGCGATGCGAGAAAACATTGACCGCATTATGGGCTTCGTCCATCTCGCATGCGCT			194
Sbjct 117	GCGCTGCGATGCGAGAAAAC-TTGACC-CATTATGGGCTTCGTCCATCTCGCATGCGCT			174
Query 195	ATGATCTGGTTGCGTTGAATGCAGACACGCCCTA			228
Sbjct 175	ATGATCTGGTTGCGTTGAATGCAGACACGCCCTA			208

Slika 9. Prikaz poređenja sekvenci za dva izolata. *Query* – PP785990.1; *Sbjct* - KT309077.1

Iako su sekvence dobijene ciljanjem različitih segmenata genoma (456 bp naspram 774 bp), identifikovan je zajednički preklapajući region (*overlapping region*) od 94 bp unutar visoko konzervirane insercije sekvence IS711 koja kodira transpozazu. U ovom specifičnom segmentu utvrđena je nukleotidna identičnost od 98% (92/94 bp), uz minimalne genomske varijacije (Gaps: 2%), što uz veoma nisku E-vrednost (7e-44) isključuje mogućnost slučajnog podudaranja (tabela 19).

Tabela 19. Prikaz rezultata BLASTn analize

GenBank identifikacija	KT309077.1	PP785990.1
Godina izolacije	2013.	2021.
Domaćin	Domaća svinja (pobačeni fetus)	Divlja svinja (tkivo)
Metoda sekvencioniranja	Sanger (dideoxy)	
Identiteti (BLASTn)	Referenca	98% (92/94 bp)
Praznine (Gaps)	-	2% (2 bp)
E-vrednost	-	7e-44

Sekvenciranje celog genoma (WGS) i bioinformatička obrada

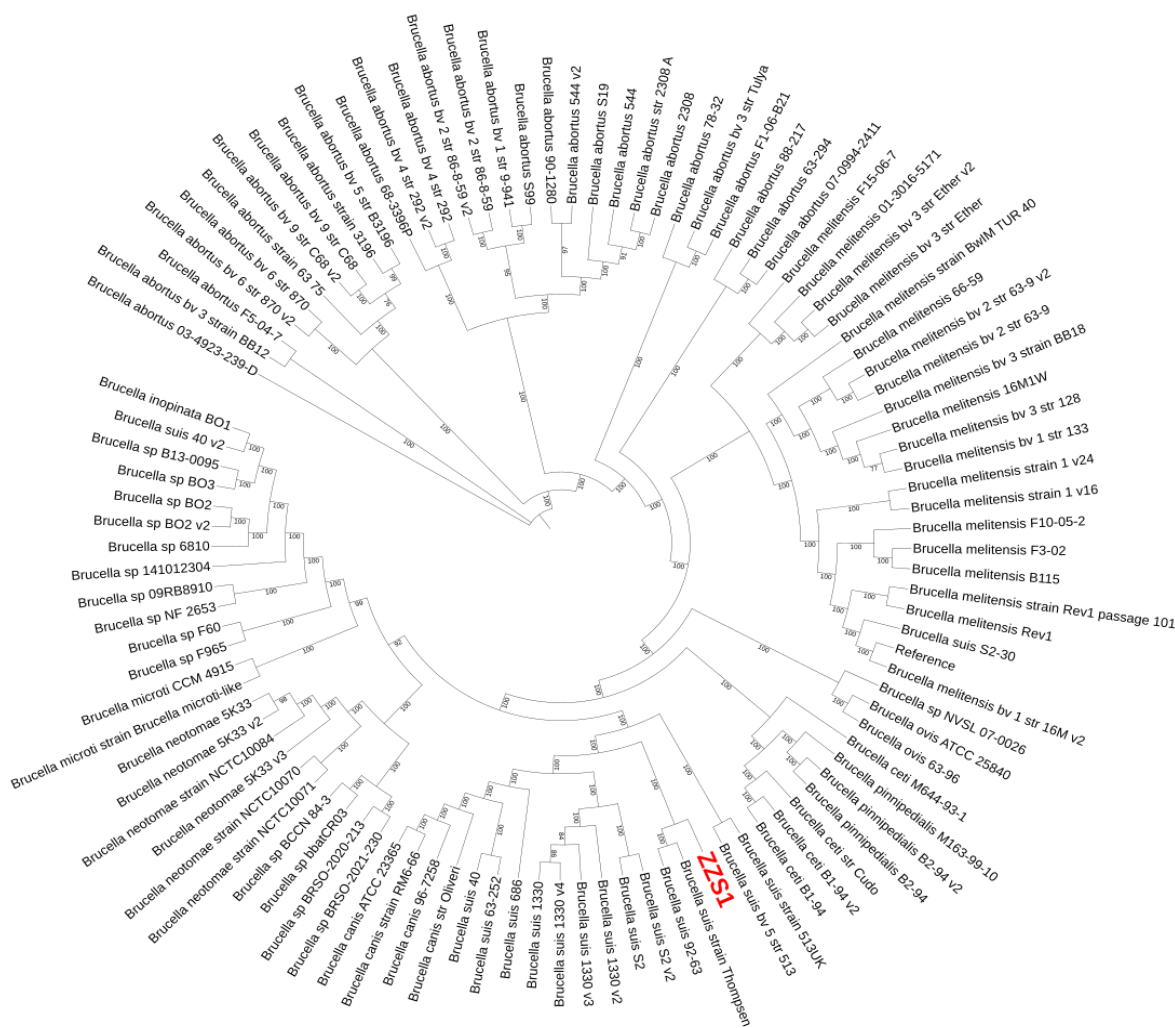
Sekvenciranje celog genoma vršeno je na Illumina platformi u Evropskoj referentnoj laboratoriji za brucelozu. Analizom nukleinske kiseline izolata ZZS1 generisano je ukupno 1.102.555 očitavanja, od kojih je 96,4% zadovoljilo kriterijume kvaliteta, a kontaminacija nije detektovana.

Potvrđeno je da izolat pripada vrsti *B. suis* biotip 2. Analiza je pokazala potpunu pokrivenost referentnog genoma od 100%, uz prosečnu dubinu čitanja od 96x, što je značajno iznad postavljenog metodološkog praga.

De novo asembliranjem dobijeno je 30 kontiga, ukupne veličine 3.303.279 bp. Izmerena N50 vrednost iznosila je 276.874 bp, što ukazuje na visok stepen kontinuiteta i nizak nivo fragmentacije asembliranog genoma. Visoka N50 vrednost (skoro 277 kb) znači da su „delovi“ genoma (kontizi) dugački i informativni.

Taksonomska identifikacija i *in silico* tipizacija

Filogenetska analiza na nivou roda potvrdila je preciznu taksonomsku poziciju izolata ZZS1. Na generisanom stablu, ZZS1 je jasno klasterovao unutar grane rezervisane za *B. suis*, pokazujući najveću srodnost sa referentnim panelom biotipa 2 (sojevi 92-63 i Thompsen). Potpuna odvojenost od grana koje formiraju *B. abortus* i *B. melitensis* dodatno potvrđuje taksonomsku čistoću izolata i isključuje mogućnost pogrešne identifikacije (slika 10).

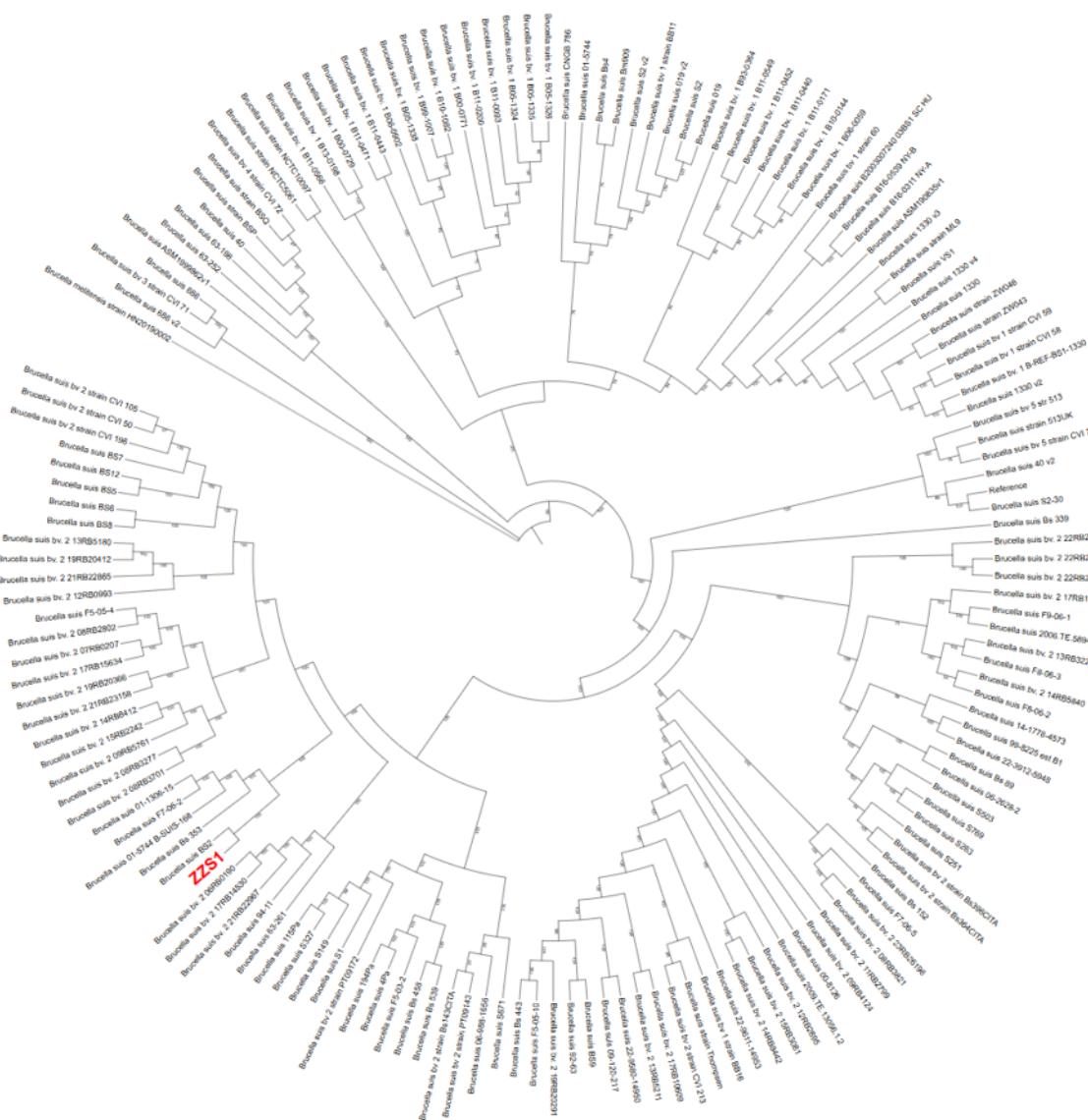


Slika 10. Filogenetsko stablo izolata ZZS1 konstruisano na osnovu poređenja celih genomskih sekvenci različitih vrsta brucela dostupnih u NCBI GenBank. Analiza je izvedena korišćenjem algoritma Maksimalne Verovatnoće (Maximum Likelihood). Stablo obuhvata ukupno 103 sekvence (terminalna čvora), a kao spoljašnja grupa (outgroup) korišćen je referentni genom *B. melitensis* (GCA_000007125.1). Bootstrap vrednosti prikazane su na granama stabla, pri čemu vrednosti niže od 76 nisu uključene. Taksonomska anotacija izvršena je automatskim dodeljivanjem prema bazi podataka. Vizuelizacija i finalna obrada stabla izvršene su pomoću alata iTOL.

Analiza polimorfizama pojedinačnih nukleotida (SNP) i filogenija na nivou soja

Izolat ZZS1 pozicioniran je u okviru grane koja obuhvata sojeve *B. suis* biotipa 2 izolovanih kod divljih, ali i domaćih svinja u Hrvatskoj (CVI_196) i Nemačkoj (sojevi F7-06-1 i F7-06-2), što potvrđuje cirkulaciju ovog genotipa u populacijama divlje faune u regionu (slika 11).

Na slici 12 prikazan je preciznije definisan filogenetski položaj izolata ZZS1, pri čemu je utvrđeno da mu je najsrodniji izolat poreklom iz divljih i domaćih svinja iz Nemačke (soj F7-06-2).



Slika 12. Filogenetsko stablo izolata ZZS1 konstruisano na osnovu poređenja celih genomskih sekvenci *B. suis* dostupnih u NCBI GenBank bazi podataka nakon ažuriranja i proširenja baze novim genomskim sekvencama. Analiza je izvedena u MEGA X softveru korišćenjem algoritma Maksimalne Verovatnoće (Maximum Likelihood). Stablo obuhvata ukupno 160 sekvenci (terminalna čvora), a kao spoljašnja grupa (outgroup) korišćen je referentni genom *B. melitensis* (16M_WGS). Bootstrap vrednosti prikazane su na granama stabla, pri čemu vrednosti niže od 65 nisu uključene. Taksonomska anotacija izvršena je automatskim dodeljivanjem prema bazi podataka. Vizuelizacija i finalna obrada stabla izvršene su pomoću alata iTOL.

Multilokusna tipizacija sekvenci (MLST-9)

Molekularna karakterizacija izolata ZZS1 pokazala je da on pripada sekvencionom tipu ST16, uz sledeći alelni profil za devet analiziranih lokusa: gap (4), aroA (2), glk (7), dnaK (1), gyrB (3), trpE (3), cobQ (5), int_hyp (3) i omp25 (2). Ovaj profil je identičan profilu referentnih sojeva *B. suis* biotip 2 (tabela 20). Uključivanje marker lokusa int_hyp (alel 3) i omp25 (alel 2) u analizu dodatno je učvrstilo identifikaciju izolata ZZS1 kao ST16. Posebno je značajan alel 2 na genu omp25, koji je tipičan marker za *B. suis* biotip 2.

Tabela 20. Sojevi sa najvišim stepenom genetičke sličnosti sa ZZS1, po MLST-9 profilu

Soj	Vrsta	Domaćin	Godina	gap	aroA	glk	dnaK	gyrB	trpE	cobQ	int_hyp	omp25
F7/06-2	<i>B. suis</i>	Divlja svinja	2006	4	2	7	1	3	3	5	3	2
F7/06-1	<i>B. suis</i>	Divlja svinja	2006	4	2	7	1	3	3	5	3	2
F5/05-10	<i>B. suis</i>	Zec	np	4	2	7	1	3	3	5	3	2
F5/05-10	<i>B. suis</i>	Zec	np	4	2	7	1	3	3	5	3	2
VLA-94/11	<i>B. suis</i> biotip 2	Svinja	1994	4	2	7	1	3	3	5	3	2
F7/06-2	<i>B. suis</i>	np	2006	4	2	7	1	3	3	5	3	2

np–nije poznato

Analiza tandemskih ponavljanja varijabilnog broja na više lokusa (MLVA-16)

Za izolat ZZS1 utvrđen je specifičan numerički profil varijabilnih lokusa. Ključne vrednosti za panele bile su: Bruce06 (2), Bruce08 (5), Bruce11 (8), Bruce12 (14), uz vrednosti na ostalim lokusima (Bruce 42, 43, 45, 55, 18, 19, 21, 04, 07, 09, 16, 30), uz napomenu da vrednosti na Bruce42 i Bruce55 nisu očitane. Ovaj profil pokazuje najviši stepen genetičke srodnosti sa evropskim izolatima iz divljih svinja (tabela 21).

Tabela 21. Sojevi *B. suis* biotip 2 sa najvišim stepenom genetičke sličnosti sa ZZS1, po MLVA-16 profilu

Soj	Vrsta	Domaćin	Godina	Bruce 06	Bruce 08	Bruce 11	Bruce 12	Bruce 42	Bruce 43	Bruce 45	Bruce 55	Bruce 18	Bruce 19	Bruce 21	Bruce 04	Bruce 07	Bruce 09	Bruce 16	Bruce 30
BH54	<i>B. suis</i> biotip 2	Divlja svinja	2012	2	5	8	14	5	1	5	7	4	43	9	10	4	3	2	8
BH55	<i>B. suis</i> biotip 2	Divlja svinja	2012	2	5	8	14	4	1	5	7	5	43	9	9	8	3	2	10
BCCN [#] 02-42	<i>B. suis</i> biotip 2	Svinja	2002	2	5	8	14	5	1	5	7	4	43	9	10	5	3	2	8
BH22	<i>B. suis</i> biotip 2	Divlja svinja	2011	2	5	8	14	5	1	5	7	5	43	9	16	7	3	2	8
BH29	<i>B. suis</i> biotip 2	Divlja svinja	2011	2	5	8	14	5	1	5	7	4	43	9	10	8	3	2	9
BH30	<i>B. suis</i> biotip 2	Divlja svinja	2011	2	5	8	14	5	1	5	7	5	43	9	13	8	3	2	9

Utvrđivanje prisustva genoma *Brucella* spp. real-time PCR metodom

Nukleinske kiseline iz uzoraka prikupljenih od divljih svinja ekstrahovane su na tri različita načina: komercijalnim kitom i primenom dva laboratorijski razvijena protokola.

Iste nukleinske kiseline su potom ispitane real-time PCR metodom, a dobijeni rezultati prikazani su u tabeli 22.

Tabela 22. Rezultati real-time PCR u funkciji primenjenog protokola ekstrakcije DNK

Uzorak		Rezultati real-time PCR		
		PE1	PE2	PE3
Testisi sa epididimisima	poz	9	8	9
	neg	73	74	73
	ukupno	82	82	82
Slezina	poz	2	1	2
	neg	0	1	0
	ukupno	2	2	2
Tonzile	poz	1	1	1
	neg	9	9	9
	ukupno	10	10	10
Cervikalni limfni čvor	poz	2	2	2
	neg	7	7	7
	ukupno	9	9	9
Krv	poz	2	2	2
	neg	8	8	8
	ukupno	10	10	10
Materica	poz	0	0	0
	neg	3	3	3
	ukupno	3	3	3
Ukupno	poz	16	14	16
	neg	100	102	100
	ukupno	116	116	116

PE1-ekstrakcija DNK komercijalnim kitom, PE2-ekstrakcija DNK TRIzol™ reagensom, PE3-ekstrakcija DNK grejanjem i hlađenjem u tečnom azotu

Ekstrakcija DNK primenom komercijalnog kita (PE1) i protokola sa grejanjem i hlađenjem u tečnom azotu (PE3) dala je pozitivan *Brucella* spp. real-time PCR rezultat za 16 identičnih uzoraka, dok je upotreba TRIzol™ reagensa u ekstrakciji DNK iz uzoraka divljih svinja (PE2) rezultirala sa 14 real-time PCR pozitivnih reakcija. Svih četrnaest real-time PCR pozitivnih uzoraka za genom *Brucella* spp. nakon ekstrakcije DNK sa TRIzol™ reagensom (PE2), bilo je pozitivno i sa preostala dva primenjena protokola ekstrakcije. Odnosno, ekstrakcija DNK brucela sa TRIzol™ reagensom, u poređenju sa komercijalnim kitom i protokolom sa grejanjem i hlađenjem u tečnom azotu, nije bila uspešna iz dva uzorka (slezine i testisa sa epididimisima).

Hi kvadrat testom nije utvrđena statistička značajnost između tri primenjena metoda ekstrakcije nukleinskih kiselina ($p=0,89$).

Tabela 23. Distribucija uzoraka kod kojih je real-time PCR metodom utvrđeno prisustvo genoma *Brucella* spp. po okruzima

Upravni okrug	Broj ispitanih uzoraka	Broj pozitivnih uzoraka (%)	95% IP
Južnobanatski	47	8 (17,02)	8,90-29,10
Beogradski	3	0	-
Kolubarski	7	0	-
Šumadijski	14	0	-
Borski	19	4 (21,05)	8,51-43,33
Zaječarski	26	4 (15,38)	6,17-33,53
Ukupno	116	16 (13,79)	8,7-21,2

IP-interval poverenja

Od ukupno ispitanih 116 uzoraka poreklom od divljih svinja prisustvo genoma *Brucella* spp. metodom real-time PCR je utvrđeno u ukupno 16 uzoraka.

Prisustvo genoma *Brucella* spp. utvrđeno je u 8 uzoraka (17,02%, 95% IP: 8,90-29,10) poreklom od divljih svinja iz Južnobanatskog okruga. U Borskom i Zaječarskom okrugu genom *Brucella* spp. utvrđen je u po 4 uzorka poreklom od divljih svinja, pri čemu je učestalost pozitivnih nalaza iznosila 21,05% (95% IP: 8,51-43,33), odnosno 15,38% (95% IP: 6,17-33,53). Kod divljih svinja sa područja Beogradskog, Kolubarskog i Šumadijskog okruga nije utvrđeno prisustvo genoma *Brucella* spp. (tabela 23).

U tabeli 24 dat je detaljan prikaz rezultata.

Tabela 24. Zbirni prikaz divljih svinja kod kojih je utvrđeno prisustvo genoma *Brucella* spp., sa rezultatima seroloških, bakterioloških i molekularnih ispitivanja

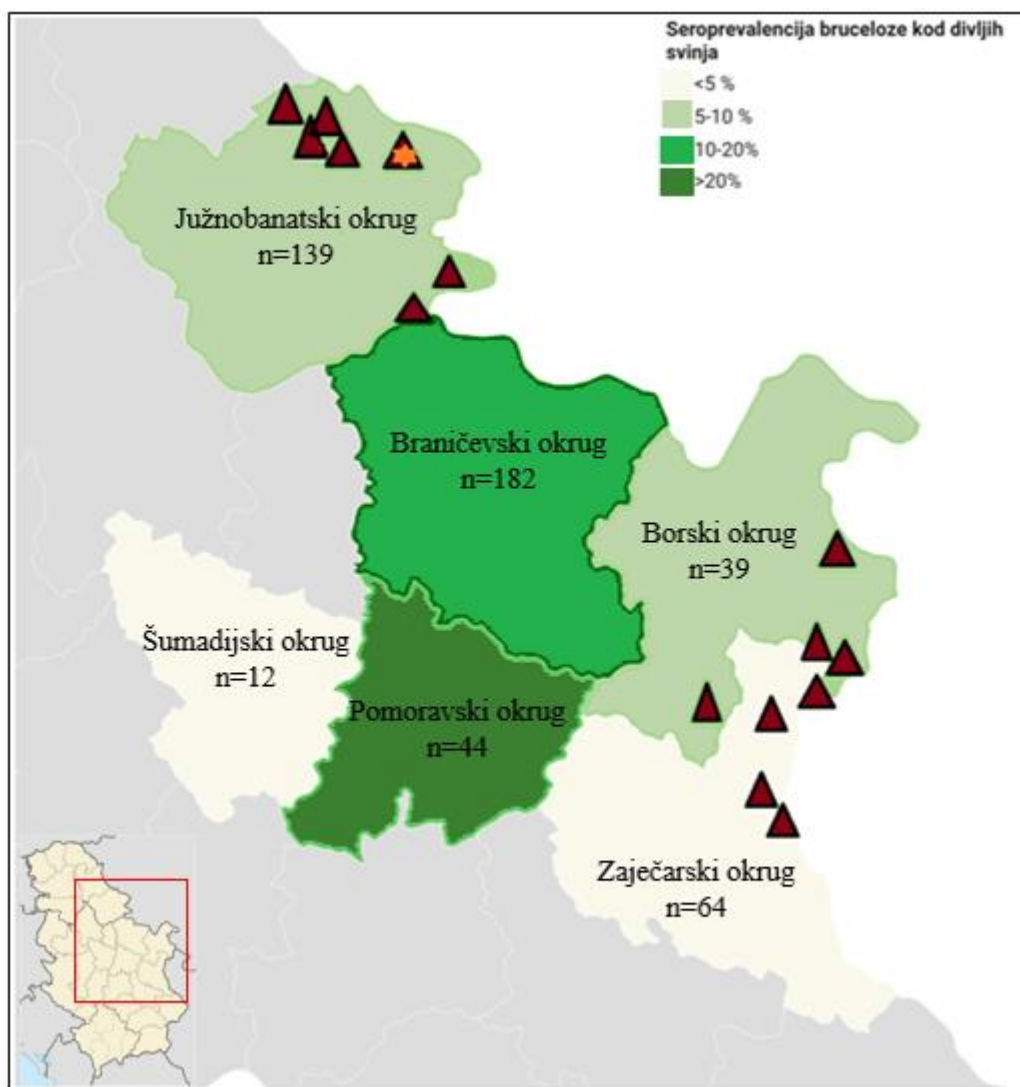
Oznaka	Uzorak	Okrug	Pol	Starosna kategorija	Serološka ispitivanja		Izolacija	real-time PCR PE1	real-time PCR PE2	real-time PCR PE3
					RBT	cELISA				
DS7	testisi sa epididimisima	JB	M	> 2,5 god.	-	-	-	+	+	+
DS12	krv	JB	M	6-18 mes.	+	+	<i>B. suis</i> biotip 2	+	+	+
	cervikalni limfni čvor							+	+	+
DS19	testisi sa epididimisima	JB	M	> 2,5 god.	-	-	-	+	+	+
DS22	cervikalni limfni čvor	JB	M	1,5-2,5 god.	+	+	-	+	+	+
DS24	testisi sa epididimisima	ZA	M	> 2,5 god.	-	-	-	+	+	+
DS36	slezina	JB	M	1,5-2,5 god.	ni	ni	-	+	+	+
DS40	testisi sa epididimisima	BO	M	1,5-2,5 god.	-	-	-	+	+	+
DS42	krv	JB	M	1,5-2,5 god.	+	+	-	+	+	+
DS57	testisi sa epididimisima	ZA	M	1,5-2,5 god.	+	+	-	+	-	+
DS61	tonzile	ZA	M	6-18 mes.	-	-	-	+	+	+
DS65	testisi sa epididimisima	ZA	M	> 2,5 god.	-	-	-	+	+	+
DS68	testisi sa epididimisima	JB	M	1,5-2,5 god.	-	-	-	+	+	+
DS70	slezina	BO	M	1,5-2,5 god.	ni	ni	-	+	-	+
DS75	testisi sa epididimisima	BO	M	1,5-2,5 god.	-	-	-	+	+	+
DS78	testisi sa epididimisima	BO	M	> 2,5 god.	-	-	-	+	+	+

DS-divlja svinja, ni-nije ispitano, JB-Južnobanatski, ZA-Zaječarski, BO-Borski, M-muški, PE1-ekstrakcija DNK komercijalnim kitom, PE2-ekstrakcija DNK TRIzol™ reagensom, PE3-ekstrakcija DNK grejanjem i hlađenjem u tečnom azotu

Genom *Brucella* spp. je u najvećem broju detektovan u uzorcima testisa i epididimisa (n=9). Prisustvo genoma potvrđeno je i u po dva uzorka krvi, cervikalnog limfnog čvora i slezine, kao i u jednom uzorku tonzila (tabela 24).

Genom *Brucella* spp. detektovan je u krvi i limfnom čvoru divljeg vepra, iz kojih je izolovana *B. suis* biotip 2. U testisima i epididimisima iste jedinke genom nije utvrđen. Pored navedenog slučaja, genom *Brucella* spp. detektovan je i kod još 14 divljih svinja, tako da je ukupan broj pozitivnih jedinki iznosio 15 od ukupno 87 ispitanih divljih svinja. Na osnovu toga, prevalencija prisustva genoma *Brucella* spp. u ispitivanoj populaciji iznosi 17,24% (95% IP: 9,1–25,4).

Na slici 13 prikazani su lokaliteti na kojima su odstreljene divlje svinje kod kojih je detektovan genom *Brucella* spp.



Slika 13. Prikaz geografske distribucije divljih svinja kod kojih je utvrđen genom *Brucella* spp. (braon trouglovi). Na mapi je prikazana i seroprevalencija bruceloze divljih svinja sa brojem ispitanih seruma po okrugu (n). Narandžasta zvezdica označava lokaciju divlje svinje kod koje je izolovan *B. suis* biotip 2.

DISKUSIJA

Prema Svetskoj zdravstvenoj organizaciji (WHO, 2006) bruceloza je svrstana među vodeće zoonoze koje se smatraju zanemarenim. Podržavajući i poštujući principe koncepta *Jednog zdravlja*, Svetska organizacija za zdravlje životinja (WOAH) doprinela je koordinisanoj kontroli bruceloze kod životinja i ljudi. Ipak, mnogo je faktora koji su prepreka ovom multidisciplinarnom pristupu na globalnom nivou, te svaki od njih mora biti zasebno razmatran u specifičnim uslovima; od države do države, od slučaja do slučaja. Posebno u zemljama u razvoju bruceloza je i dalje enzootska i predstavlja veliki problem. Ograničeni finansijski resursi glavna su barijera definisanju konceptualnog okvira *Jednog zdravlja* i uspešnom sprovođenju aktivnosti koje bi doprinele eradikaciji zaraze. Pored toga, identifikacija životinjskih vrsta koje su rezervoari bakterija iz roda *Brucella* predstavlja jednu od ključnih polaznih tačaka u sprovođenju efektivnih mera kontrole i prevencije zaraze.

Bruceloza je tipična zoonoza koja je čovečanstvu poznata hiljadama godina, a ipak se malo zna o ovoj zarazi kod divljih životinja (Godfroid i sar., 2013). Utvrđeno je da postoje četiri slobodnoživeće vrste divljih životinja koje su samoodrživi rezervoari brucela. To su bizon (*Bison bison*) i los (*Cervus canadensis*) u Sjedinjenim Američkim Državama i afrički bivo (*Syncerus caffer*) u jugoistočnoj Africi koji su rezervoari za *B. abortus* (Kamath i sar., 2016; Tanner i sar., 2015) i alpski kozorog (*Capra ibex*) u Francuskim Alpima koji je rezervoar *B. melitensis* (Mick i sar., 2014). Decenijama se pokušava utvrditi da li bruceloza kod bizona uzrokuje pobačaj (Palmer i sar., 1996), dok patogenost *B. suis* biotip 2 i dalje nije u potpunosti razjašnjena (Godfroid i sar., 2013), uprkos činjenici da divlje svinje, koje su prirodni rezervoari ovih bakterija, spadaju među najvažnije i najčešće proučavane nosioce bruceloze u divljini (Ruano i sar., 2025).

Divlja svinja predstavlja jednu od najrasprostranjenijih vrsta kopnenih sisara na svetu. Zahvaljujući širokom arealu koji nastanjuje, velikoj populaciji i prilagodljivosti različitim staništima ove životinje nalaze se na Crvenoj listi IUCN-a (International Union for Conservation of Nature's Red List of Threatened Species, 2018) u kategoriji najmanje ugroženih životinjskih vrsta. Areal nastanjanja divljih svinja značajno je proširen, pre svega usled delovanja čoveka. Danas se, ove divlje životinje nalaze na svim kontinentima, izuzev Antarktika, a njihova populacija u konstantnom je porastu. Divlje svinje su rezervoari velikog broja zoonoznih patogena (različitih bakterija, virusa i parazita) (Ruiz-Fons, 2017). Zbog sve češćeg kontakta sa domaćim životinjama, one predstavljaju stalnu pretnju za komercijalno stočarstvo, ali i značajan rizik po javno zdravlje. Bruceloza kod ovih životinja protiče u hroničnom toku i asimptomatski. Intracelularno zaštićene brucele vešto izbegavaju imunološku odbranu domaćina, koristeći mehanizme koji im omogućavaju preživljavanje i dalje umnožavanje. Kao posledica prodora bakterija dolazi do zapaljenske reakcije, što rezultira otokom testisa i epididimisa kod veprova, odnosno metritisom, pobačajima i sterilitetom kod krmača.

Prva izolacija *B. suis* biotip 2 kod ulovljene divlje svinje datira iz 1994. godine, a od tada je zaraza u ovoj populaciji prijavljena u mnogim Evropskim zemljama, pri čemu se procene o raširenosti razlikuju, u zavisnosti od geografskog područja, gustine populacije, uzorkovanja i dijagnostičkog pristupa (Godfroid i sar., 1994).

U Srbiji je bruceloza prisutna dugi niz godina, pa ipak podaci o ovoj zarazi kod divljih životinja skoro da ne postoje. Grupa istraživača detektovala je DNK *B. canis* kod šakala (*Canis aureus*) (Ćirović i sar., 2014), dok je kod jednog jelena (*Cervus elaphus*) utvrđena serokonverzija protiv *Brucella* spp. (Milićević i sar., 2024). Bruceloza kod divljih svinja na teritoriji Srbije po prvi put je predmet istraživanja u okviru ove disertacije. Postavljeni cilj podrazumevao je da se serološkim, bakteriološkim i molekularnim ispitivanjima ispita prisustvo bakterija iz roda *Brucella* kod divljih svinja u zemlji i pruže dodatne informacije od značaja u cilju što potpunijeg razumevanja njene epizootiologije. Dopunjavanje postojećeg znanja, odnosno razjašnjavanje nepoznanica ima poseban doprinos u zemljama gde je bruceloza kod goveda, malih preživara i domaćih svinja iskorenjena ili su eradikacioni programi u toku, kao što je to slučaj u našoj zemlji.

U cilju zaštite zdravlja ljudi i životinja, i smanjenja ekonomskih gubitaka koji nastaju kao posledica zaraze, nacionalni programi nadzora, kontrole i iskorenjivanja bruceloze kod goveda, malih preživara i svinja aktivni su još od 1995. godine. Programi eradikacije značajno su doprineli smanjenju prevalencije zaraze, iako se sporadični slučajevi bruceloze kod goveda, ovaca i svinja i dalje povremeno dijagnostikuju.

Bruceloza kod svinja se najčešće registruje nakon poremećaja u reprodukciji, i to na malim domaćinstvima (Žutić i sar., 2013). *Brucella suis* biotip 2 izolovana je iz materice zaražene krmače u Braničevskom okrugu, opština Veliko Gradište (Radojičić, 2004), a potom i iz punktata epididimisa nerasta poreklom iz istog okruga (Rogožarski i sar., 2009). Ispitivanja bruceloze kod svinja sprovedena tokom 2011-2015. godine utvrdila su serološki odgovor kod 88 domaćih svinja (Žutić i sar., 2016), a posebnu pažnju privukao je slučaj u Sremskom okrugu, kada je vlasnik primetio dva pobačena fetusa kod svinja držanih na otvorenom. Na ovom geografskom području sa dugom istorijom ekstenzivnog stočarstva svinje se tradicionalno u velikom procentu drže na otvorenom, na pašnjacima, poljima i u šumama. Sa druge strane, divlje svinje u potrazi za hranom čest su posetilac istih predela, te je izolacija *B. suis* biotip 2 iz pobačenih fetusa ukazala na mogućnost nastanka infekcije usled direktnog ili indirektnog kontakta sa ovim životinjama (Žutić i sar., 2017).

Prenos zaraze sa divljih na domaće svinje je relativno česta pojava. U razvijenim zemljama Evrope, gde se na farmama primenjuju visoki standardi biosigurnosnih mera, bruceloza domaćih svinja smatra se iskorenjenom, a divlje svinje predstavljaju glavne izvore zaraze (Barlozzari i sar., 2015; Garin-Bastuji i sar., 2000; Melzer i sar., 2006; Špičić i sar., 2016). Dodatno, genska sličnost izolata *B. suis* biotip 2 iz Mađarske, Nemačke i Hrvatske potvrđuje pretpostavljeni obrazac zaražavanja domaćih svinja, odnosno *spillover* bruceloze iz populacije divljih svinja, još jednom ukazujući da državne granice ne predstavljaju prepreke širenju patogena (Kreizinger i sar., 2014).

Rezultati istraživanja u okviru ove disertacije predstavljaju prvi dokaz bruceloze kod divljih svinja u Srbiji. Serološkim ispitivanjima utvrđena je raširenost zaraze u određenim regionima zemlje, dok je izolacijom *B. suis* biotip 2 potvrđeno da divlje svinje služe kao rezervoari ovog uzročnika.

Serološka ispitivanja obuhvatila su dva testa, skrining RBT i potvrdni cELISA test, a ukupno je pregledano 480 krvnih seruma divljih svinja odstreljenih tokom 2020-2021. godine. Primenom RBT detektovano je prisustvo specifičnih antitela protiv uzročnika bruceloze kod 50 divljih svinja. Kompetitivnim ELISA testom prisustvo antitela je potvrđeno kod 45 jedinki, pri čemu utvrđena seroprevalencija bruceloze iznosi 9,38% (95% IP: 7,08-12,31).

Sličan procenat detekcije specifičnih antitela protiv uzročnika bruceloze kod divljih svinja registrovan je u zemljama u okruženju. U Hrvatskoj, Cvetnić i sar. (2004) koristili su 4 testa za serološka ispitivanja. Najveći procenat seropozitivnih jedinki na brucelozu, 13,6%, utvrđen je primenom iELISA testa, potom slede RBT (11,5%), RVK (10,5%) i SAT (8,9%). Rezultati seroloških ispitivanja bruceloze kod divljih svinja u Srbiji u korelaciji su i sa rezultatima istraživača iz drugih zemalja: u Španiji prijavljena seroprevalencija iznosi 10,9% (Closa-Sebastià i sar., 2010), Švajcarskoj 7,8% (Leuenberger i sar., 2007), Finskoj 9% (Fredriksson-Ahomaa i sar., 2020), Holandiji 6,4% (van Tulden i sar., 2020), Letoniji 9,6% (Grantina-Ievina i sar., 2018), Češkoj 8,7% (Hubálek i sar., 2002). Najviša seroprevalencija utvrđena je u Belgiji, gde je serokonverzija dokazana kod više od polovine ispitanih divljih svinja (54,88%), što se povezuje sa značajnim povećanjem populacije ovih životinja tokom proteklih trideset godina (Grégoire i sar., 2012). Opsežnim ispitivanjima u Nemačkoj u okviru kojih je pregledano 11956 divljih svinja utvrđeno je da seroprevalencija bruceloze varira u zavisnosti od regiona, u rasponu 11,9-31,2%, sa prosečnom vrednošću od 17,9% (Macias Lauces i sar., 2023).

Seroprevalencija bruceloze kod divljih svinja u našoj zemlji, u zavisnosti od ispitanog regiona kreće se u intervalu 0-22,73%. Najveća seroprevalencija utvrđena je u Pomoravskom okrugu 2021. godine iznoseći 25%. Prema prosečnim vrednostima zabeleženim tokom dve lovne sezone, seroprevalencija bruceloze bila je najviša u Pomoravskom okrugu (22,73%), a potom slede Braničevski, Borski i Južnobanatski, sa utvrđenim vrednostima od 12,64%, 7,69% i 6,47%. Kod pregledanih divljih svinja iz Šumadijskog i Zaječarskog okruga nije ustanovljena serokonverzija (tabela 9). Veća seroprevalencija bruceloze u određenim okruzima verovatno je posledica povećane gustine divljih svinja koje naseljavaju ta područja. Gustina divljih svinja u Srbiji u proseku iznosi 0,33 jedinke/km². Veća gustina divljih svinja u Pomoravskom (0,46 jedinki/km²), Braničevskom (0,35 jedinki/km²) i Borskom okrugu (0,41 jedinki/km²) verovatno je uticala i na povećanu seroprevalenciju kod divljih svinja sa ovih područja. Sa druge strane, uprkos sličnoj gustini divljih svinja u Zaječarskom okrugu, serokonverzija kod ispitanih jedinki nije utvrđena što ukazuje na multifaktorijsku epizootiologiju bruceloze kod ove vrste.

Starost divljih svinja smatra se značajnim faktorom za serokonverziju (Muñoz i sar., 2010), što su potvrdile i statističke analize u ovoj disertaciji, ukazujući na značajnu razliku seroprevalencije između različitih starosnih grupa ($p = 0,0038$). Podaci o seroprevalenciji bruceloze po starosnim kategorijama divljih svinja prikazani su detaljno u tabeli 10. U ovom ispitivanju najviša seroprevalencija utvrđena je kod divljih svinja uzrasta do 6 meseci (27,27%). Prisustvo specifičnih antitela protiv *Brucella* spp. u ovoj starosnoj grupi može se objasniti postojanjem maternalnih antitela koju su prasad nasledila od majke, bilo transplacentarno ili alimentarno putem kolostruma. Izuzetak nisu ni lažno pozitivne serološke reakcije, dominantno uslovljene unakrsnom reaktivnošću sa *Yersinia enterocolitica* O:9. Dodatno, broj ispitanih u ovoj kategoriji iznosi svega 11 jedinki, pri čemu je serokonverzija utvrđena kod tri divlje svinje. Mali broj ispitanih divljih svinja mlađih od 6 meseci limitirajući je faktor za detaljno tumačenje dobijenih rezultata u ovoj kategoriji, te je usled ograničenja u pogledu veličine ispitanog uzorka kao i patogeneze bolesti, ova starosna grupa bila isključena u daljim statističkim i epizootiološkim analizama.

Seroprevalencija bruceloze kod divljih svinja starosti 1,5-2,5 godine iznosi 14,94% ($n=23$), što predstavlja najvišu vrednost utvrđenu kod ispitanih jedinki. Procena relativnog rizika pokazala je da jedinke unutar ove starosne kategorije imaju najveći rizik od infekcije. Tačnije, rizik od serokonverzije unutar ove grupe je 2,75 puta veći u poređenju sa divljim svinjama starijim od 2,5 godine i 2,56 puta veći u odnosu na jedinke starosti 6-18 meseci (tabela 11). Ove razlike potvrđene

su i logističkom regresijom, a dobijeni rezultati su u saglasnosti sa činjenicom da većina divljih svinja ulazi u polnu zrelost i postaje seksualno aktivna tokom druge godine života, čime je širenje zaraze olakšano. Rezultati istraživanja drugih autora takođe ukazuju na veću seroprevalenciju bruceloze kod divljih svinja starijih od jedne godine (Grégoire i sar., 2012; Muñoz i sar., 2010).

Unutar starosne grupe 6-18 meseci seroprevalencija iznosi 6,28% (n=14), dok je kod divljih svinja starijih od 2,5 godine 5,43% (n=5). Procena relativnog rizika pokazala je praktično zanemarljivu razliku između ove dve starosne kategorije, pri čemu divlje svinje starosti 6-18 meseci imaju 1,07 puta veći rizik od serokonverzije u odnosu na jedinke starije od 2,5 godine. Za razliku od starosti, utvrđeno je da pol divljih svinja ne predstavlja značajan faktor za serokonverziju ($p = 0,358$), što je u saglasnosti sa nalazima drugih istraživača (Grégoire i sar., 2012; Muñoz i sar., 2010).

Serološka dijagnostika bruceloze počela je pre više od 120 godina jednostavnim testom aglutinacije. Iako su rezultati testa subjektivno procenjivani, usled jednostavnosti i brzine izvođenja, uz ekonomsku isplativost, test je našao široku primenu. Danas se u dijagnostici bruceloze koriste različiti testovi: RBT, RVK, FP i ELISA. Kada je u pitanju dijagnostika bruceloze na nivou jedinke, svi serološki testovi imaju odgovarajuća ograničenja, pri čemu odabir testa zavisi od epizootiološke situacije.

RBT i cELISA pokazali su se pouzdanim u serološkoj dijagnostici bruceloze u populaciji divljih svinja, pogotovo kada se koriste zajedno (koeficijent korelacije pokazao je gotovo potpunu saglasnost između dva primenjena testa - Cohenova kapa 0,94). Prilikom statističke obrade rezultata seroloških ispitivanja u okviru ove disertacije samo uzorci koji su na oba testa dali pozitivnu reakciju smatrani su stvarno pozitivnim. RBT tačno je klasifikovao 98,96% uzoraka, odnosno pogrešno 1,04%.

Lažno pozitivne reakcije nastaju kao posledica unakrsnih reakcija sa bakterijama poput *Yersinia enterocolitica* O:9, *E. coli* O:157, *Salmonella* i drugim, koje poseduju slične LPS epitope, odnosno polisaharidne antigene (Bundle i sar., 1989).

Sa druge strane, lažno negativne reakcije karakteristične su u ranim fazama infekcije kada je sinteza specifičnih antitela na samom početku, ali i dalje ispod granice detekcije primenjenog testa. Kod manjeg broja zaraženih svinja ne razvija se dovoljno visok titar antitela koji bi mogao biti dokazan serološkim testovima, dok latentno inficirane jedinke, kod kojih usled transplacentarnog prenosa brucela u ranim fazama embrionalnog razvoja nije došlo do sinteze specifičnih antitela, povećavaju učestalost lažno negativnih reakcija. To praktično znači da stvarna seroprevalencija bruceloze može biti veća od one koja je utvrđena.

Razlike između rezultata dobijenih primenom RBT i cELISA nastaju i zbog klasa imunoglobulina na koje su oni usmereni. U RBT se kao antigen koriste cele ćelije *B. abortus* pri čemu se detektuju imunoglobulini G i M klase (IgG i IgM). Kompetitivnim ELISA testom dominantno se detektuju IgG antitela, pri čemu se kao antigen koristi ekstrahovani S-LPS *B. abortus* (Nielsen i sar., 1995). Nakon zaražavanja, u ranoj fazi infekcije, kao imunološki odgovor na prodor patogena prvenstveno se sintetišu imunoglobulini M klase. Njihova sinteza zavisi od ulaznih vrata infekcije, broja bakterija i zdravstvenog statusa inficirane životinje. Nedugo potom dolazi do sinteze IgG₁ antitela, a kasnije IgG₂ i IgA, koja se proizvode u malim količinama (Allan i sar., 1976; Beh, 1974). Stoga je IgG₁ glavni izotip koji se detektuje u serološkim testovima (Allan i sar., 1976; Nielsen, 2002). Ova klasa imunoglobulina perzistira u organizmu duži vremenski period, pa pozitivni rezultati dobijeni cELISA testom ukazuju na hroničan tok bruceloze kod pregledanih divljih svinja.

Prisustvo anti-bruceloznih antitela ukazuje na izloženost ispitanih divljih svinja brucelama, ali ne mora striktno da označava trenutnu ili aktivnu infekciju u momentu uzorkovanja. Prisustvo antitela može postojati kao rezultat ranijih infekcija koje su samoograničavajuće, kao što je eksperimentalna infekcija goveda sa *B. abortus* biotip 1 ili *B. suis* biotip 2 (Godfroid i sar., 2002b). Sa druge strane, može doći i do pada titra specifičnih antitela, što je dokazano kako u eksperimentalnim, tako i u infekcijama koje se dešavaju u prirodi (Nielsen i Duncan, 1988).

Izolacija uzročnika bruceloze predstavlja zlatni standard u dijagnostici, i preduslov je za postavljanje tačne dijagnoze, koja čini osnovu daljih epizootioloških istraživanja i strategija upravljanja zarazom.

U cilju izolacije brucela sakupljeni su različiti uzorci poreklom od 87 divljih svinja sa teritorije šest okruga. Krv i homogenizovani organi (testisi sa epididimisima, materica, cervikalni limfni čvorovi, tonzile i slezina) zasejani su na bifazni Kastaneda medijum. Inkubacija je vršena na 37 °C tokom 10 dana, a rast kolonija proveravan je svakodnevno. Kolonije tipične za brucele bile su uočljive četvrtog dana inkubacije iz dva uzorka: cervikalnog limfnog čvora i krvi prikupljenih od divljeg vepra starosti 15-18 meseci, sa teritorije Južnobanatskog okruga. Bruce-ladder multiplex PCR identifikovao je ovaj bakterijski izolat kao *B. suis*, a daljim sekvenciranjem genoma određen je i biotip vrste, čime je potvrđeno, kao što se i pretpostavljalo, da brucelozu kod divljih svinja u Srbiji izaziva *B. suis* biotip 2. Kod iste jedinke utvrđeno je i prisustvo specifičnih antitela protiv uzročnika bruceloze.

Izolacija *B. suis* iz krvi ukazuje na akutnu infekciju sa cirkulacijom bakterija, odnosno fazu bakterijemije, koja nakon prodora brucela u organizam prijemčive jedinke može trajati nekoliko nedelja (Olsen i sar., 2019). Brucele putem krvi dospevaju do različitih organa, što objašnjava izolaciju bakterija i iz cervikalnog limfnog čvora. Izolacija iz cervikalnog limfnog čvora takođe naglašava značaj alimentarnog puta infekcije, putem ingestije pobačenih fetusa, fetalnih membrana ili kontaminirane hrane (Olsen i sar., 2019). Kod mladih jedinki (kao što je to slučaj kod ove), koje još uvek nisu dostigle polnu zrelost i nisu seksualno aktivne, veneralni put zaražavanja nije verovatan. Izolacija brucela iz testisa i epididimisa iste jedinke bila je neuspešna.

Uopšteno gledano, izolacija brucela predstavlja veliki izazov. Izolacija je teška i dugotrajna, a česti neuspesi rezultat su karakteristika samih brucela, odnosno zahteva bakterija za rast u *in vitro* uslovima, malog broja bakterija u tkivima i visoke kontaminacije uzoraka. Uspešnost izolacije brucela dodatno zavisi od kvaliteta i vrste uzorka, dok značajan uticaj imaju opremljenost laboratorije i iskustvo osoblja. Kako su uzorci sakupljeni od odstreljenih divljih svinja, mala uspešnost izolacije brucela u velikoj je meri posledica kontaminacije. Od ukupno 87 divljih svinja izolacija brucela bila je uspešna samo kod jedne jedinke, što čini 1,15% od ukupnog broja. Slične niske stope izolacije brucela iz tkiva divljih svinja prijavljene su i u drugim studijama. Tako su Macias Luaces i saradnici (2023) iz testisa, materice, limfnih čvorova i slezine od 681 divlje svinje uspešno izolovali *B. suis* kod svega 5 jedinki, odnosno 0,7%. Istovremeno, ustanovljena seroprevalencija u ovoj studiji iznosila je 17,9%, što uprkos niskoj stopi izolacije uzročnika ukazuje na značajnu raširenost zaraze. U drugoj studiji uspešnost izolacije bila je tek nešto viša, 1,3% (Di Sabatino i sar., 2017).

Izolacija *B. suis* izvesnija je tokom akutne faze infekcije, dok hroničan tok, koji je karakterističan za brucelozu, predstavlja dodatnu prepreku. U eksperimentalnim studijama sprovedenim na miševima i svinjama, izolacija *B. suis* bila je moguća samo u ograničenom vremenskom periodu nakon infekcije (Deyoe, 1972; Grilló i sar., 2012). Kako infekcija prelazi u hroničan tok izolacija

postaje sve neizvesnija, što je uslovljeno smanjenim brojem bakterija u tkivima. Ovo govori u prilog uspešnoj izolaciji *B. suis* iz krvi i limfnog čvora. Sa druge strane, tkiva sa patološkim promenama karakterističnim za brucelozu, gde je prisutan veći broj bakterija, predstavljaju dobar preduslov za izolaciju (Macias Luaces i sar., 2023). Sva prikupljena tkiva divljih svinja u ovom ispitivanju bila su bez приметnih patoloških promena.

Na teritoriji Srbije su zvanično potvrđene tri vrste brucela: *B. melitensis* biotip 3, *B. suis* biotip 2 i *B. canis*. Izolacija *B. suis* biotip 2 soja nazvanog ZZS1 predstavlja prvu detekciju ovog patogena u populaciji divljih svinja. S obzirom na to da je ovaj biotip uzročnik bruceloze kod divljih svinja širom Evrope (Jamil i sar., 2022), njegova pojava u istoj populaciji u našoj zemlji ne iznenađuje. Pretpostavka da su divlje svinje potencijalni rezervoar ovog biotipa i u našoj zemlji dokazana je indirektno, na osnovu izolacije istog uzročnika iz pobačenih fetusa svinja držanih na otvorenom (Žutić i sar., 2017).

Komparativna analiza nukleotidnih sekvenci između ova dva izolata pokazala je visok stepen genetičke podudarnosti. U zajedničkom preklapajućem regionu od 94 bp unutar visoko konzervirane insercione sekvence IS711 utvrđena je identičnost od 98%. Ova genetička sličnost ukazuje na održavanje ovog patogena na teritoriji Srbije tokom višegodišnjeg perioda i odražava nisku stopu mutacija u ključnim genomskim segmentima. Istovremeno, rezultati pružaju dokaz kontinuirane cirkulacije ovog patogena i potencijalnog međupopulacijskog prenosa između divljih i domaćih svinja. Genotipizacija ZZS1 primenom MLST metode vršena je radi određivanja filogenetskog položaja soja, dok je MLVA-16 korišćena za postizanje veće epizootiološke rezolucije, pružajući sveobuhvatnu genetičku karakterizaciju i prevazilazeći ograničenja pojedinačnih metoda, što je naročito značajno u kontekstu prve detekcije ovog patogena u ispitivanoj populaciji. MLST analiza nedvosmisleno je identifikovala ZZS1 kao *B. suis* ST16 (biotip 2) i omogućila njegovo poređenje sa globalno dostupnim sojevima. Analiza hipervarijabilnih lokusa iz panela 2A i 2B MLVA metode precizno je pozicionirala soj unutar evropskog klastera *B. suis*, potvrđujući njegovu povezanost sa srodnim izolatima biotipa 2 kod divljih životinja na teritoriji Centralne i Istočne Evrope.

Uprkos niskom procentu izolacije brucela u ovom ispitivanju (1,15%), real-time PCR utvrdio je znatno veći procenat zaraženih divljih svinja (17,24%, 95% IP: 9,1-25,4). Izolacija brucela je opravdano zlatni standard u dijagnostici i esencijalna je za potvrdu infekcije i karakterizaciju cirkulišućih vrsta *Brucella* spp., ali negativni rezultati izolacije ne ukazuju nužno na odsustvo zaraze. Stoga se, kao dopunska metoda, u dijagnostici bruceloze preporučuje PCR, gde se specifični fragment bakterijske DNK ciljano umnožava i detektuje. Prednosti PCR metode ogledaju se u brznoj, visoko specifičnoj i osetljivoj dijagnostici, uz manji rizik od laboratorijskih infekcija u poređenju sa klasičnom izolacijom brucela. Ipak, rezultati PCR dijagnostike nisu uvek u potpunosti korelaciji sa uspehom izolacije bakterija. PCR pozitivni rezultati izostali su kod uzoraka iz kojih su brucele uspešno izolovane, i obrnuto (Matrone i sar., 2009; Vejarano i sar., 2013). Procenom slaganja rezultata dobijenih real-time PCR-om i izolacijom *Brucella* spp. u ovom ispitivanju izračunata je Cohenova kapa vrednost koja iznosi 0,20, što ukazuje na slabo slaganje dveju metoda (0-0,20). Neusaglašenost između rezultata molekularnih i bakterioloških metoda publikovana je i od strane drugih autora (Cortez i sar., 2001; Fekete i sar., 1990). Uzorci divljih svinja u kojima je detektovan genom *Brucella* spp., a iz kojih izolacija nije bila uspešna, najverovatnije ukazuju na veoma mali broj brucela u tkivima koje real-time PCR ipak može da detektuje, ili pak na prisustvo inaktivisanih bakterija. PCR detektuje žive, ali i mrtve bakterije, dok je za uspešnu izolaciju neophodno prisustvo isključivo živih brucela. Pored toga, hroničan tok

infekcije koji karakteriše mali broj brucela u tkivima, kao i neizbežna visoka kontaminacija uzoraka odstreljenih divljih svinja drugim bakterijama, dodatno umanjuju uspešnost izolacije.

Primenjeni real-time PCR sa ciljnom sekvencom IS711 pokazao se kao veoma pouzdana metoda u dijagnostici bruceloze, budući da detektuje insercioni element koji se nalazi u više kopija u genomu brucela. Dodatno, ovaj element je genetički stabilan, kako u pogledu broja kopija, tako i u pogledu pozicije u genomima različitih vrsta, što doprinosi visokoj specifičnosti i osetljivosti metode. Uzimajući u obzir da veličina genoma *B. suis* biotip 2 iznosi približno 3,3 Mb (tačnije 3 297 000 bp), moguće je proceniti broj kopija genoma koji se mogu detektovati ovom metodom. Real-time PCR pokazao je linearnost u amplifikaciji DNK u opsegu 10^8 i 10^1 kopija genoma (Hinić i sar., 2008). Na osnovu mase pojedinačnog genoma *B. suis* biotip 2 koji približno iznosi 3,62 fg, utvrđeni limit detekcije korišćenog real-time PCR-a iznosi ~36 fg DNK, što odgovara detekciji približno 10 kopija genoma.

Primenom iste metode, Hinić i saradnici (2009) detektovali su genom *Brucella* spp. kod 14 divljih svinja, što je za 17% više u odnosu na rezultate dobijene klasičnom izolacijom bakterija. Leal-Klevezas i saradnici su još 1995. god u svojoj studiji ukazali na prednost PCR dijagnostike u otkrivanju zaraženih, u odnosu na metode serološke i bakteriološke dijagnostike. U grupi veštački inficiranih koza (n=22), među kojima je kod 14 jedinki utvrđen serološki odgovor, PCR reakcijom detektovano je 19 pozitivnih jedinki. Nasuprot ovome, brucele su izolovane iz samo jednog uzorka. U drugoj grupi životinja PCR je detektovao 2/15 zaraženih koza, uprkos negativnim serološkim rezultatima i neuspešnoj izolaciji brucela kod svih jedinki. PCR je omogućio ranu potvrdu infekcije 10 dana nakon veštačke inokulacije *B. melitensis*, dok je serološki odgovor utvrđen u proseku tek nakon 18. dana (Leal-Klevezas i sar., 1995).

PCR dijagnostika takođe može imati ograničenu osetljivost, što dovodi do lažno negativnih rezultata. Za izolaciju brucela koriste se različiti organi čiji homogenati sadrže brojne inhibitore amplifikacije DNK, uključujući serumske proteine, ostatke somatskih ćelija, polisaharide i druge komponente (Wilson, 1997). Intracelularna lokalizacija brucela dodatno komplikuje detekciju, pa je u cilju smanjenja lažno negativnih PCR reakcija potrebno optimizovati protokol ekstrakcije DNK. Osetljivost metode direktno zavisi od efikasnosti ekstrakcije, te je jedan od zadataka ovog ispitivanja bio određivanje najpovoljnijeg protokola izolacije DNK brucela iz tkiva divljih svinja.

U skladu sa tim, analizirana su tri protokola za ekstrakciju DNK brucela: komercijalni kit, protokol sa guanidin-izotiocijanatom (TRIzol™ Reagent) i protokol sa grejanjem i hlađenjem u tečnom azotu. Ekstrahovana DNK korišćena je za real-time PCR ispitivanja, primenom istog protokola i identičnih prajmera. Ekstrakcija DNK iz uzoraka vršena je u grupama od po 10 uzoraka, čime je mogućnost unakrsne kontaminacije minimalizovana.

Ekstrakcijom pomoću komercijalnog kita i protokola sa grejanjem i hlađenjem u tečnom azotu, dobijen je pozitivan real-time PCR rezultat za 16 identičnih uzoraka, dok je upotreba TRIzol™ reagensa za ekstrakciju DNK brucela iz uzoraka divljih svinja rezultirala sa 14 real-time PCR pozitivnih reakcija. Svih 14 real-time PCR pozitivnih uzoraka nakon ekstrakcije sa TRIzol™ reagensom, bilo je pozitivno i sa preostala dva primenjena protokola. Odnosno, ekstrakcija DNK brucela sa TRIzol™ reagensom u poređenju sa komercijalnim kitom i protokolom sa grejanjem i hlađenjem u tečnom azotu, nije bila uspešna iz dva uzorka, tkiva slezine i testisa sa epididimisima.

Vejarano i saradnici (2013) poredili su četiri protokola ekstrakcije DNK iz homogenizata različitih tkiva krava zaraženih sa *B. abortus*. U ovoj studiji ekstrakcija DNK grejanjem i hlađenjem u

tečnom azotu i protokol sa proteinazom K pokazali su se podjednako dobrim u detekciji pozitivnih uzoraka, a bolji u odnosu na primenu guanidin-izotiocijanata. Ukoliko protokol ekstrakcije sa proteinazom K poistovetimo sa komercijalnim kitom za ekstrakciju korišćenim u ovom ispitivanju, gde se proteinaza K dodaje homogenizatu tkiva u početnom koraku radi iniciranja razgradnje ćelijskog zida, uočava se jasna saglasnost rezultata sa nalazima Vejarano i saradnika (2013). Takođe, i drugi autori ističu primenu proteinaze K za ekstrakciju DNK brucela kao najpogodniji metod (Matrone i sar., 2009).

U jednom eksperimentu, protokol sa proteinazom K pokazao se najefikasnijim u ekstrakciji DNK *B. abortus* iz različitih razređenja suspenzije čiste bakterijske kulture, u poređenju sa druga dva protokola (protokol sa guanidin-izotiocijanatom i modifikovani protokol sa guanidin-izotiocijanatom, uz naknadnu adsorpciju DNK na čvrsti nosač) (Matrone i sar., 2009). PCR reakcije nakon ekstrakcije DNK *B. abortus* sa guanidin-izotiocijanatom bile su pozitivne sve do koncentracije bakterija od $1,5 \times 10^5$ /ml, dok je primenom proteinaze K bilo moguće detektovati značajno manji broj brucela. U istom eksperimentu potvrđena je i veća osetljivost PCR-a u poređenju sa klasičnom izolacijom, s obzirom da su svi uzorci poticali od eksperimentalno zaraženih krava. Odnosno, uprkos neuspešnoj izolaciji *B. abortus* u određenim uzorcima, pozitivni PCR rezultati se ne mogu smatrati lažnim. Ovi nalazi ukazuju na ključnu ulogu koncentracije brucela u ispitivanim uzorcima, ali i na značaj odabranog protokola ekstrakcije za postizanje maksimalne osetljivosti metode (Matrone i sar., 2009).

Osetljivost ekstrakcije sa guanidin-izotiocijanatom može se unaprediti modifikacijom protokola, primenom naknadne adsorpcije DNK na čvrsti nosač, kako je opisano od strane Boom i sar. (1990), što je i potvrđeno u objavljenim studijama (Matrone i sar., 2009; Vejarano i sar., 2013). Niža osetljivost standardnog protokola sa guanidin-izotiocijanatom delimično je posledica veće koncentracije DNK same jedinice od koje potiču uzorci, s obzirom da ovaj protokol ne uključuje korake ispiranja karakteristične za ekstrakciju proteinazom K. Veći broj ispiranja smanjuje koncentraciju inhibitora amplifikacije u finalnom produktu (Morata i sar., 1998). Međutim, protokol sa grejanjem i hlađenjem u tečnom azotu takođe ne obuhvata korake ispiranja, pa ipak zabeležena je veća osetljivost ekstrakcije u poređenju sa primenom guanidin-izotiocijanata. Slične rezultate, gde protokol sa grejanjem i hlađenjem u tečnom azotu nadmašuje ekstrakciju guanidin-izotiocijanatom prijavili su i drugi autori (Vejarano i sar., 2013).

Prednost komercijalnog kita za ekstrakciju ogleda se prvenstveno u jednostavnosti izvođenja. Metod je brz, standardizovan i pogodan za rutinsku laboratorijsku primenu, pri čemu dodatnu prednost predstavlja efikasno uklanjanje inhibitora i drugih kontaminanata ekstrakcije nukleinskih kiselina. Proteinaza K, koja se u početnom koraku dodaje homogenizatu tkiva, inicira razgradnju ćelijskog zida i omogućava vezivanje nukleinskih kiselina za membrane kolone, nakon čega se DNK „oslobađa“ u odgovarajućem elucionom puferu. Relativno kratko vreme ekstrakcije (1-2 h), i minimalna upotreba gotovih pufera, obezbeđenih u samom kitu, dodatno olakšavaju rad. Nasuprot tome, tradicionalne metode ekstrakcije zahtevaju više vremena (4-6 h) i veći broj hemikalija, od kojih su neke potencijalno štetne po zdravlje laboratorijskih radnika i životnu sredinu. Upotrebom TRIzol™ reagensa pospešuje se ćelijska liza, a prednost protokola ogleda se u simultanoj ekstrakciji RNK, DNK i proteina iz uzoraka tkiva. Protokol sa grejanjem i hlađenjem u tečnom azotu ekonomski je isplativ, ali ga rukovanje neophodnim tečnim azotom čini manje praktičnim. Imajući u vidu sve prednosti primene, a na osnovu analiziranih rezultata ispitivanja, komercijalni kit za ekstrakciju DNK brucela iz tkiva divljih svinja definisan je kao najpogodniji metod ekstrakcije.

Genom *Brucella* spp. utvrđen je kod 17,24% ispitanih divljih svinja (95% IP: 9,1-25,4) sa teritorije šest okruga Srbije. Prevalencija bruceloze kod divljih svinja u susednoj Hrvatskoj, iznosi 17% (Cvetnic i sar., 2004), u Italiji 19,76% (Bergagna i sar., 2009), Poljskoj 11,5% (Weiner i sar., 2009), Španiji 17,6% (Muñoz i sar., 2010) i Holandiji 10,5% (van Tulden i sar., 2020). Prema dostupnim podacima iz literature, najviše stope prevalencije bruceloze zabeležene su kod divljih svinja u Švajcarskoj (26,3%) i Belgiji (24%) (Grégoire i sar., 2012; Wu i sar., 2011).

Utvrđena prevalencija bruceloze kod divljih svinja u Srbiji (17,24%) ukazuje da ova populacija predstavlja značajan rezervoar uzročnika.

U najvećem procentu, genom *Brucella* spp. utvrđen je u 21,05% uzoraka poreklom od divljih svinja sa teritorije Borskog okruga, zatim 17,02% iz Južnobanatskog i 15,38% iz Zaječarskog. Ove oblasti karakteriše veća gustina populacije divljih svinja, bogatstvo šumskih kompleksa i povezanost staništa, što pogoduje kontaktu između različitih grupa divljih svinja i olakšava cirkulaciju patogena.

Ni kod jedne ispitane divlje svinje u Beogradskom, Šumadijskom i Kolubarskom okrugu nije utvrđen genom *Brucella* spp. Ovakvi rezultati najverovatnije su posledica malog broja testiranih uzoraka, ali i niže gustine populacije divljih svinja i ograničenog kontakta sa potencijalno inficiranim jedinkama. U ovim regionima preovlađuju poljoprivredne površine i fragmentirana staništa, što smanjuje mogućnost prenosa zaraze u okviru populacije. Sličan obrazac regionalne varijabilnosti primećen je i u drugim evropskim studijama, gde je prevalencija bruceloze bila najviša u područjima sa većom gustinom divljih svinja, dok su u ređe naseljenim delovima infekcije retke (Muñoz i sar., 2010; Risco i sar., 2014).

Najveći broj divljih svinja kod kojih je utvrđen genom *Brucella* spp. pripada starosnoj kategoriji 1,5-2,5 god (n=8), što se poklapa sa periodom seksualne aktivnosti i ukazuje na polni prenos bruceloze. Genom *Brucella* spp. utvrđen je kod dva mlada vepra mlađa od 18 meseci. Kod jednog od njih genom *Brucella* spp. dokazan je u krvi i cervikalnom limfnom čvoru, što je dodatno potvrđeno izolacijom uzročnika iz istih uzoraka, dok je kod drugog genom detektovan u tkivu tonzila. Ovi nalazi naglašavaju značaj alimentarnog zaražavanja kod mladih jedinki koje su dostigle fiziološku polnu zrelost, ali se zbog socijalne strukture populacije divljih svinja ne pare.

Najboljim uzorkom za detekciju genoma *Brucella* spp. pokazali su se testisi sa epididimisima. Slede cervikalni limfni čvorovi, što je naročito značajno kod infekcija prilikom alimentarnog zaražavanja i krv u fazi bakterijemije. Dobijeni rezultati ukazuju na različitu raspodelu patogena u organizmu i naglašavaju važnost odabira odgovarajućih uzoraka za molekularnu dijagnostiku.

Cilia i saradnici (2021) su DNK brucela detektovali samo u tkivu epididimisa, ali ne i testisa divljih svinja, ukazujući na tropizam brucela ka epididimisima, verovatno uslovljen znatnim količinama eritritola i fruktoze, koji brucele koriste kao primarni izvor energije. Sa druge strane, tkivo slezine pokazalo se najmanje pogodnim uzorkom za PCR dijagnostiku bruceloze. Od ukupno 200 slezina ispitanih real-time PCR-om u zbirnim uzorcima od po tri, samo su dva uzorka reagovala pozitivno. Tokom hronične infekcije koja je glavna karakteristika bruceloze kod divljih svinja, broj brucela u slezini je izuzetno nizak, što smanjuje mogućnost detekcije patogena iz ovog organa. Niska osetljivost detekcije genoma brucela iz slezine opisana je i u ranijim studijama (Vejarano i sar., 2013).

Samo kod jednog vepra, kod kojeg je real-time PCR bio pozitivan u testisima i epididimisima utvrđen je i pozitivan serološki odgovor, dok kod ostalih serokonverzija nije ustanovljena. Neslaganje rezultata seroloških i molekularnih ispitivanja nije neuobičajeno (Cilia i sar., 2021). Ograničena lokalizacija brucela u testisima i epididimisima, gde brucele bivaju zaštićene od ćelija imunološkog sistema domaćina uslovljava izostanak sinteze specifičnih antitela. Čak i u eksperimentalnim infekcijama, prisustvo specifičnih antitela ne garantuje detekciju brucela u tkivima, i obrnuto (Uhrig i sar., 2013).

Procena rizika od bruceloze kod divljih svinja u određenim okruzima Srbije zasniva se na utvrđenoj seroprevalenciji zaraze, gustini populacije i drugim ekološkim faktorima, a obuhvata i dodatne informacije od značaja: izolaciju *B. suis* biotip 2, filogenetsku karakterizaciju izolata i detekciju genoma *Brucella* spp. u uzorcima divljih svinja.

Najveći rizik od zaraze identifikovan je u Pomoravskom okrugu, gde je zabeležena najviša seroprevalencija bruceloze, što u kombinaciji sa relativno visokom gustinom divljih svinja (0,46 divljih svinja/km²) ukazuje na intenzivnu cirkulaciju patogena na ovom području. Utvrđene vrednosti seroprevalencije bruceloze u Braničevskom i Južnobanatskom okrugu potvrđuju regionalnu prisutnost zaraze, dok odsustvo serokonverzije u Zaječarskom i Šumadijskom okrugu, pokazuje da visoka gustina populacije nije jedini preduslov za cirkulisanje brucela, već dodatnu ulogu imaju i drugi faktori, uključujući reljef i interakcije sa domaćim životinjama.

Ponašanje divljih svinja dodatno povećava rizik od širenja patogena. Iako su divlje svinje generalno sedentarne vrste sa ograničenim dnevnim i sezonskim kretanjima unutar svojih stalnih teritorija, mogu da prelaze velike udaljenosti i često koriste hranilišta i poljoprivredna zemljiša, što omogućava efikasan prenos *B. suis* unutar i između populacija.

Rezultati molekularne dijagnostike doprinose potpunijem sagledavanju epizootiološke situacije i rasprostranjenosti infekcije. Genom *Brucella* spp. najčešće je utvrđen u uzorcima poreklom od divljih svinja sa teritorije Borskog (21,05%), zatim Južnobanatskog (17,02%) i Zaječarskog (15,38%) okruga. Detekcija genoma *Brucella* spp. u ovim oblastima potvrđuje aktivnu cirkulaciju patogena i dodatno ističe regionalne rizike, naročito u Južnobanatskom okrugu, gde je uzročnik izolovan. Prethodna izolacija istog uzročnika u Braničevskom i Sremskom okrugu potvrđuje održavanje infekcije u više regiona.

Blizina graničnih područja sa Rumunijom i Bugarskom dodatno komplikuje kontrolu bolesti, s obzirom na kretanje divljih svinja i mogućnost prelaska granice. Uzimanje u obzir svih ovih faktora omogućava precizniju procenu epizootiološkog rizika i planiranje efikasnih mera kontrole bruceloze, u skladu sa principima koncepta *Jednog zdravlja*, uz uključivanje regionalne saradnje i praćenje migracija divljih svinja.

Stabilan prirodni ciklus infekcije *B. suis* biotip 2 u populaciji divljih svinja naglašava potrebu za kontinuiranim nadzorom zaraze, uključujući serološka i molekularna ispitivanja. Pored toga, neophodno je sprovođenje strogih biosigurnosnih mera, uključujući kontrolu kontakata na poljoprivrednim površinama i u lovištima, u cilju sprečavanja prelaska infekcije sa divljih na domaće svinje, druge domaće životinje i ljude.

Rezultati ove disertacije pružaju čvrst temelj za buduća istraživanja koja bi obuhvatila veći broj ispitanih divljih svinja sa šireg područja Srbije. Ovakva istraživanja su ključna za razvoj nadzora i mera kontrole, kao i dobijanja što preciznijih podataka o ovoj značajnoj zoonози, čija je eradikacija na području naše zemlje, uprkos višedecenijskim naporima i dalje neizvesna.

ZAKLJUČCI

1. U populaciji divljih svinja na teritoriji Republike Srbije bruceloza je utvrđena primenom seroloških, bakterioloških i molekularnih metoda dijagnostike.
2. Utvrđena seroprevalencija bruceloze kod divljih svinja iznosi 9,38% (95% IP: 7,08-12,31). Najviša seroprevalencija zabeležena je u Pomoravskom okrugu i iznosi 22,73% (95% IP: 12,84-36,99), dok je u Braničevskom, Borskom i Južnobanatskom okrugu utvrđena seroprevalencija od 12,64% (95% IP: 8,57-18,25), 7,69% (95% IP: 2,65-20,32) i 6,47% (95% IP: 3,44-11,85). U Zaječarskom i Šumadijskom okrugu nije dokazana serokonverzija ni kod jedne ispitane divlje svinje.
3. Starost divljih svinja predstavlja značajan faktor rizika za serokonverziju ($p=0,0038$). Divlje svinje starosti 1,5–2,5 godine izdvojile su se kao najrizičnija kategorija, sa 2,75 puta većim relativnim rizikom od serokonverzije u odnosu na starije jedinke i 2,56 puta većim rizikom u odnosu na mlađe. Jedinke starosti od 6 do 18 meseci pokazale su gotovo istu učestalost serokonverzije kao jedinke starije od 2,5 godine ($RR=1,07$). Analiza razlika u riziku pokazala je da divlje svinje starosti 1,5–2,5 godine imaju statistički značajno veći rizik od serokonverzije u poređenju sa jedinkama 6–18 meseci starosti (9,11%, $p=0,0031$), kao i u poređenju sa jedinkama starijim od 2,5 godine (9,50%, $p=0,0235$).
4. Pol divljih svinja nije utvrđen kao statistički značajan faktor rizika za infekciju ($\chi^2=0,8462$, $p=0,358$).
5. Primenom seroloških testova RBT i cELISA utvrđena je gotovo savršena usaglašenost rezultata (Cohenov koeficijent kapa 0,94, $SE=0,026$; $p=0,0001$), što ukazuje na visoku pouzdanost i pogodnost za dijagnostiku bruceloze kod divljih svinja.
6. Na osnovu dobijenih rezultata ispitivanja zaključuje se da je *B. suis* biotip 2 uzročnik bruceloze kod divljih svinja u Republici Srbiji. Ovaj patogen izolovan je iz krvi i cervikalnog limfnog čvora divljeg vepra starosti 15-18 meseci, poreklom iz Južnobanatskog okruga.
7. Sekvenciranjem celog genoma izolata *B. suis* biotip 2 i sprovedenom filogenetskom analizom utvrđena je najveća genska srodnost sa referentnim sojevima biotipa 2 (92-63 i Thomsen). SNP analizom potvrđena je bliska srodnost sa izolatima poreklom iz Nemačke, dok je MLST-9 analizom utvrđena pripadnost sekvencionom tipu ST16. Specifičan numerički profil varijabilnih lokusa izolata *B. suis* biotip 2 ukazuje na genetičku srodnost sa izolatima poreklom od divljih svinja sa teritorije Evrope.
8. Poređenjem rezultata real-time PCR analize nakon ekstrakcije DNK brucela iz uzoraka poreklom od divljih svinja primenom tri različita protokola, nije utvrđena statistički značajna razlika ($p=0,89$). Uzimajući u obzir sve prednosti primene, komercijalni kit pokazao se najpogodnijim za ekstrakciju DNK brucela, u poređenju sa protokolima zasnovanim na primeni guanidin-izotiocijanata (TRIzol™ reagens) i grejanjem i hlađenjem u tečnom azotu.
9. Genom *Brucella* spp. utvrđen je kod 17,24% (95% IP: 9,1-25,4) ispitanih divljih svinja. Po okruzima, genom *Brucella* spp. utvrđen je u 17,02% (95% IP: 8,90-29,10) uzoraka poreklom od divljih svinja iz Južnobanatskog, 21,05% (95% IP: 8,51-43,33) iz Borskog i 15,38% (95% IP:

6,17-33,53) iz Zaječarskog okruga. U uzorcima poreklom od divljih svinja sa područja Beogradskog, Kolubarskog i Šumadijskog okruga nije dokazano prisustvo genoma *Brucella* spp.

10. Genom *Brucella* spp. je najčešće detektovan u testisima i epididimisima, dok je ređe potvrđen u krvi, cervikalnim limfnim čvorovima, slezini i tonzilama. Ovakva distribucija ukazuje na izražen tropizam uzročnika prema reproduktivnim organima, uz moguću sistemsku diseminaciju i prisustvo u limforetikularnim tkivima.

11. Rezultati ove disertacije predstavljaju osnovu za buduća istraživanja usmerena na dalje razjašnjavanje epizootičke uloge divljih svinja u održavanju i širenju bruceloze na teritoriji Srbije, kao i na razvoj efikasnijih strategija nadzora i kontrole ove bolesti.

LITERATURA

1. About, F., Pastre, T., Boutrou, M., Martinez, A. Y., Melzani, A., Peugny, S., Michaud, C., Zouaoui, S., Carage, T., Rose, V. S., Demar, M., Lavigne, J. P., Djossou, F., O'Callaghan, D., Epelboin, L., & Kerié, A. (2023). Novel species of *Brucella* causing human brucellosis, French Guiana. *Emerging Infectious Diseases*, 29(2), 333–340. <https://doi.org/10.3201/eid2902.220725>
2. Acha, P. N., & Szyfres, B. (2003). *Zoonoses and communicable diseases common to man and animals* (3rd ed., Vol. 1). Pan American Health Organization.
3. Ackermann, M. R., Cheville, N. F., & Deyoe, B. L. (1988). Bovine ileal dome lymphoepithelial cells: Endocytosis and transport of *Brucella abortus* strain 19. *Veterinary Pathology*, 25(1), 28–35. <https://doi.org/10.1177/030098588802500104>
4. Ahmed, W., Zheng, K., & Liu, Z. F. (2016). Establishment of chronic infection: *Brucella*'s stealth strategy. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 6, Article 30. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2016.00030>
5. Allan, G. S., Chappel, R. J., Williamson, P., & McNaught, D. J. (1976). A quantitative comparison of the sensitivity of serological test for bovine brucellosis to different antibody classes. *The Journal of hygiene*, 76(2), 287–298. <https://doi.org/10.1017/s0022172400055182>
6. Altamirano-Silva, P., Meza-Torres, J., Castillo-Zeledón, A., Ruiz-Villalobos, N., Zuñiga-Pereira, A. M., Chacón-Díaz, C., Moreno, E., Guzmán-Verri, C., & Chaves-Olarte, E. (2018). *Brucella abortus* senses the intracellular environment through the BvrR/BvrS two-component system, which allows *B. abortus* to adapt to its replicative niche. *Infection and Immunity*, 86(4), e00713-17. <https://doi.org/10.1128/IAI.00713-17>
7. Alton, G. G., Jones, L. M., Angus, R. D., & Verger, J. M. (1988). *Techniques for the brucellosis laboratory*. INRA.
8. Alton, G. G. (1990). *Brucella suis*. In K. Nielsen & J. R. Duncan (Eds.), *Animal brucellosis* (pp. 411–422). CRC Press.
9. Barlozzari, G., Franco, A., Macrì, G., Lorenzetti, S., Maggiori, F., Dottarelli, S., Maurelli, M., Di Giannatale, E., Tittarelli, M., Battisti, A., & Gamberale, F. (2015). First report of *Brucella suis* biovar 2 in a semi-free-range pig farm, Italy. *Veterinaria Italiana*, 51(2), 151–154. <https://doi.org/10.12834/VetIt.50.3384.1>
10. Beh, K. J. (1974). Quantitative distribution of *Brucella* antibody amongst immunoglobulin classes in vaccinated and infected cattle. *Research in Veterinary Science*, 17(1), 1–4.
11. Bergagna, S., Zoppi, S., Ferroglio, E., Gobetto, M., Dondo, A., Di Giannatale, E., Gennero, M. S., & Grattarola, C. (2009). Epidemiologic survey for *Brucella suis* biovar 2 in a wild

- boar (*Sus scrofa*) population in northwest Italy. *Journal of Wildlife Diseases*, 45(4), 1178–1181. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-45.4.1178>
12. Boom, R., Sol, C. J. A., Salimans, M. M. M., Jansen, C. L., Wertheim-van Dillen, P. M. E., & van der Noordaa, J. (1990). Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of Clinical Microbiology*, 28(3), 495–503.
 13. Bundle, D. R., Cherwonogrodsky, J. W., Caroff, M., & Perry, M. (1987). The lipopolysaccharides of *Brucella abortus* and *B. melitensis*. *Annales de l'Institut Pasteur - Microbiologie*, 138, 92–101.
 14. Bundle, D. R., Cherwonogrodzky, J. W., Gidney, M. A., Meikle, P. J., Perry, M. B., & Peters, T. (1989). Definition of *Brucella* A and M epitopes by monoclonal typing reagents and synthetic oligosaccharides. *Infection and Immunity*, 57(9), 2829–2836.
 15. 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. *The Journal of Experimental Medicine*, 198(4), 545–556. <https://doi.org/10.1084/jem.20030088>
 16. Chomczynski, P. (1993). A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *BioTechniques*, 15, 532–537.
 17. Cilia, G., Fratini, F., Turchi, B., Angelini, M., Cerri, D., & Bertelloni, F. (2021). Genital *Brucella suis* biovar 2 infection of wild boar (*Sus scrofa*) hunted in Tuscany (Italy). *Microorganisms*, 9, Article 582. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9030582>
 18. Closa-Sebastià, F., Casas-Díaz, E., Cuenca, R., Lavín, S., Mentaberre, G., & Marco, I. (2010). *Brucella* species antibodies and isolation in wild boar in north-east Spain. *Veterinary Record*, 167, 826–828. <https://doi.org/10.1136/vr.c5927>
 19. Corbel, M. J. (1997). Brucellosis: An overview. *Emerging Infectious Diseases*, 3(2), 213–221. <https://doi.org/10.3201/eid0302.970219>
 20. Cortez, A., Scarcelli, E., Soares, R. M., Heinemann, M. B., Sakamoto, S. M., Genovez, M. E., Ferreira, F., & Richtzenhain, L. J. (2001). Detection of *Brucella* DNA from aborted bovine fetuses by polymerase chain reaction. *Australian Veterinary Journal*, 79(7), 500–501. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.2001.tb13025.x>
 21. Cvetnic, Z., Toncic, J., Spicic, S., Lojkic, M., Terzic, S., Jemersic, L., Humski, A., Curic, S., Mitak, M., Habrun, B., Brstilo, M., Ocepek, M., & Krt, B. (2004). Brucellosis in wild boar (*Sus scrofa*) in the Republic of Croatia. *Veterinárni Medicina*, 49, 115–122. <https://doi.org/10.17221/5684-VETMED>
 22. Cvetnić, Ž., Špičić, S., Tončić, J., Majnarić, D., Benić, M., Albert, D., Thiebaud, M., & Garin-Bastuji, B. (2009). *Brucella suis* infection in domestic pigs and wild boar in Croatia.

- Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)*, 28, 1057–1067. <https://doi.org/10.20506/rst.28.3.1947>
23. Cvetnić, Ž., Duvnjak, S., Zdelar-Tuk, M., Reil, I., Mikulić, M., Cvetnić, M., Špičić, S. (2017). Swine brucellosis caused by *Brucella suis* biovar 2 in Croatia. *Slovenian Veterinary Research*, 54, 149–154. <https://doi.org/10.26873/SVR-360-2017>
 24. Ćirović, D., Chochlakis, D., Tomanović, S., Sukara, R., Penezić, A., Tselentis, Y., & Psaroulaki, A. (2014). Jackals as carriers of *Leishmania* and *Brucella* species in Serbia. *Parasites & Vectors*, 7(Suppl 1), Article P19. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-S1-P19>
 25. De Massis, F., Di Provvido, A., Di Sabatino, D., Di Francesco, D., Zilli, K., Ancora, M., & Tittarelli, M. (2012). Isolation of *Brucella suis* biovar 2 from a wild boar in the Abruzzo Region of Italy. *Veterinaria Italiana*, 48(4), 397–404.
 26. Deyoe, B. L. (1967). Pathogenesis of three strains of *Brucella suis* in swine. *American Journal of Veterinary Research*, 28(125), 951–957.
 27. Deyoe, B. L., & Manthei, C. A. (1967). Sites of localization of *Brucella suis* in swine. *Proceedings of the Annual Meeting of the U.S. Animal Health Association*, 71, 102–108.
 28. Deyoe, B. L. (1972). Research finds applicable to eradication of swine brucellosis. *Proceedings of the Annual Meeting of the U.S. Animal Health Association*, 76, 108–114.
 29. Di Sabatino, D., Garofolo, G., Di Provvido, A., Zilli, K., Foschi, G., Di Giannatale, E., Ciuffetelli, M., & De Massis, F. (2017). *Brucella suis* biovar 2 multilocus sequence type ST16 in wild boars (*Sus scrofa*) from Abruzzi region, Italy. Introduction from Central-Eastern Europe? *Infection, Genetics and Evolution*, 55, 63–67. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.08.031>
 30. Dougas, G., Tsakris, A., Beleri, S., Patsoula, E., Billinis, C., & Papaparaskevas, J. (2020). Evidence of *Brucella melitensis* DNA in the microbiome of *Ctenocephalides felis* from pet cats in Greece. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 20(5), 390–392. <https://doi.org/10.1089/vbz.2019.2510>
 31. Douglas, J. T., & Palmer, D. A. (1988). Use of monoclonal antibodies to identify the distribution of A and M epitopes on smooth *Brucella* species. *Journal of Clinical Microbiology*, 26(7), 1353–1356. <https://doi.org/10.1128/JCM.26.7.1353-1356.1988>
 32. ENETWILD-consortium, Acevedo, P., Aleksovski, V., Apollonio, M., Berdiñ, O., Blanco-Aguiar, J. A., del Rio, L., Ertürk, A., Fajdiga, L., Escribano, F., Ferroglio, E., Gruychev, G., Gutiérrez, I., Häberlein, V., Hoxha, B., Kavčić, K., Keuling, O., Martínez-Carrasco, C., Palencia, P., Pereira, P., Plhal, R., Plis, K., Podgórski, T., Ruiz, C., Scandura, M., Santos, J., Sereno, J., Sergeyev, A., Shakun, V., Soriguer, R., Soyumert, A., Spren, N., Stoyanov, S., Smith, G. C., Trajçe, A., Urbani, N., Zanet, S., & Vicente, J. (2022). *Wild boar density data generated by camera trapping in nineteen European areas* (EFSA Supporting Publication

- EN-7214, 19(3), 21 pp.). European Food Safety Authority. <https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2022.EN-7214>
33. Enright, F. M. (1990). The pathogenesis and pathobiology of *Brucella* infection in domestic animals. In K. Nielsen & J. R. Duncan (Eds.), *Animal brucellosis* (pp. 301–320). CRC Press.
 34. Etman, R. H., Barsoum, S. A., Ibrahim, I. G. A., El-Ashmawy, W. R., & Abou-Gazia, K. A. (2014). Evaluation of efficacy of some serological tests used for diagnosis of brucellosis in cattle in Egypt using latent class analysis. *Sokoto Journal of Veterinary Sciences*, 12(2), 1–7. <https://doi.org/10.4314/sokjvs.v12i2.1>
 35. European Food Safety Authority. (2009). Scientific opinion on brucellosis in animals and related risks to human health. *EFSA Journal*, 7(5), Article 1144. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2009.1144>
 36. Fekete, A., Bantle, J. A., Halling, S. M., & Sanborn, M. R. (1990). Preliminary development of a diagnostic test for *Brucella* using polymerase chain reaction. *Journal of Applied Bacteriology*, 69(2), 216–227. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1990.tb01512.x>
 37. Ferreira, A. C., Corrêa de Sá, M. I., Dias, R., & Tenreiro, R. (2017a). MLVA-16 typing of *Brucella suis* biovar 2 strains circulating in Europe. *Veterinary Microbiology*, 210, 77–82. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.09.001>
 38. Ferreira, A. C., Tenreiro, R., Corrêa de Sá, M. I., & Dias, R. (2017b). Evolution and genome specialization of *Brucella suis* biovar 2 Iberian lineages. *BMC Genomics*, 18(1), Article 726. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-4113-8>
 39. Foster, G., Osterman, B. S., Godfroid, J., Jacques, I., & Cloeckaert, A. (2007). *Brucella ceti* sp. nov. and *Brucella pinnipedialis* sp. nov. for *Brucella* strains with cetaceans and seals as their preferred hosts. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(Pt 11), 2688–2693. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65269-0>
 40. Foster, J. T., Beckstrom-Sternberg, S. M., Pearson, T., Beckstrom-Sternberg, J. S., Chain, P. S., Roberto, F. F., Hnath, J., Brettin, T., & Keim, P. (2009). Whole-genome-based phylogeny and divergence of the genus *Brucella*. *Journal of Bacteriology*, 191(8), 2864–2870. <https://doi.org/10.1128/JB.01581-08>
 41. Frandölich, K., Wisser, J., Schmüser, H., Fehlberg, U., Neubauer, H., Grunow, R., Nikolaou, K., Priemer, J., Thiede, S., Streich, W. J., & Speck, S. (2003). Epizootologic and ecologic investigations of European brown hares (*Lepus europaeus*) in selected populations from Schleswig-Holstein, Germany. *Journal of Wildlife Diseases*, 39(4), 751–761. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-39.4.751>
 42. Fredriksson-Ahomaa, M., London, L., Skrzypczak, T., Kantala, T., Laamanen, I., Biström, M., Maunula, L. & Gadd, T. (2020). Foodborne zoonoses common in hunted wild boars. *EcoHealth*, 17, 512–522. <https://doi.org/10.1007/s10393-020-01509-5>

43. Fretin, D., Mori, M., Czaplicki, G., Quinet, C., Maquet, B., Godfroid, J., & Saegerman, C. (2013). Unexpected *Brucella suis* biovar 2 infection in a dairy cow, Belgium. *Emerging Infectious Diseases*, 19(12), 2053–2054. <https://doi.org/10.3201/eid1912.130506>
44. 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. *Clinical Chemistry*, 52(4), 779–781. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2005.062596>
45. García-Yoldi, D., Le Flèche, P., De Miguel, M. J., Muñoz, P. M., Blasco, J. M., Cvetnic, Z., Marín, C. M., Vergnaud, G., & López-Goñi, I. (2007). Comparison of multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis with other PCR-based methods for typing *Brucella suis* isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(12), 4070–4072. <https://doi.org/10.1128/JCM.01096-07>
46. Garin-Bastuji, B., Hars, J., Calvez, D., Thiébaud, M., & Artois, M. (2000). Brucellose du porc domestique et du sanglier sauvage due à *Brucella suis* biovar 2 en France. *Revue Épidémiologique et de Santé Animale*, 38, 1–5.
47. Gee, J. M., Valderas, M. W., Kovach, M. E., Grippe, V. K., Robertson, G. T., Ng, W. L., Richardson, J. M., Winkler, M. E., & Roop, R. M. (2005). The *Brucella abortus* Cu/Zn superoxide dismutase is required for optimal resistance to oxidative killing by murine macrophages and wild-type virulence in experimentally infected mice. *Infection and Immunity*, 73(5), 2873–2880. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.5.2873-2880.2005>
48. Girault, G., Djokic, V., Petot-Bottin, F., Perrot, L., Thibaut, B., Sébastien, H., Vicente, A. F., Ponsart, C., & Freddi, L. (2023). Molecular investigations of two first *Brucella suis* biovar 2 infection cases in French dogs. *Pathogens*, 12(6), Article 792. <https://doi.org/10.3390/pathogens12060792>
49. Gobbi, M., Costarelli, S., Crotti, S., Manuali, E., D’Avino, N., Spina, S., Papa, P., Petrini, A., Rulli, M., Zilli, K., Romeo, G., & Averaimo, D. (2023, February 10). *O9-1 Isolation of Brucella suis biovar 2 in a male roe deer (Capreolus capreolus), in central Italy* [Oral presentation]. *Brucellosis 2022 International Research Conference*. <https://veterinariaitaliana.izs.it/index.php/BRUC/article/view/2904>
50. Godfroid, J., Michel, P., Uytterhaegen, L., De Smedt, C., Rasseneur, F., Boelaert, F., Saegerman, C., & Patigny, X. (1994). Brucellose enzootique à *Brucella suis* biotype 2 chez le sanglier (*Sus scrofa*) en Belgique. *Annales de Médecine Vétérinaire*, 138, 263–268.
51. Godfroid, J. (2002a). Brucellosis in wildlife. *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)*, 21(2), 277–286. <https://doi.org/10.20506/rst.21.2.1333>
52. Godfroid, J., Saegerman, C., Wellemans, V., Walravens, K., Letesson, J. J., Tibor, A., Mc Millan, A., Spencer, S., Sanna, M., Bakker, D., Pouillot, R., & Garin-Bastuji, B. (2002b).

How to substantiate eradication of bovine brucellosis when aspecific serological reactions occur in the course of brucellosis testing. *Veterinary Microbiology*, 90(1–4), 461–477. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(02\)00230-4](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(02)00230-4)

53. Godfroid, J., Scholz, H. C., Barbier, T., Nicolas, C., Wattiau, P., Fretin, D., Whatmore, A. M., Cloeckaert, A., Blasco, J. M., Moriyón, I., Saegerman, C., Muma, J. B., Al Dahouk, S., Neubauer, H., & Letesson, J.-J. (2011). Brucellosis at the animal/ecosystem/human interface at the beginning of the 21st century. *Preventive Veterinary Medicine*, 102(2), 118–131. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2011.04.007>
54. Godfroid, J., Garin-Bastuji, B., Saegerman, C., & Blasco, J. M. (2013). Brucellosis in terrestrial wildlife. *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)*, 32(1), 27–42. <https://doi.org/10.20506/rst.32.1.2180>
55. Grantina-Ievina, L., Avsejenko, J., Cvetkova, S., Krastina, D., Streikisa, M., Steingolde, Z., Vevere, I., & Rodze, I. (2018). Seroprevalence of *Brucella suis* in eastern Latvian wild boars (*Sus scrofa*). *Acta Veterinaria Scandinavica*, 60, Article 19. <https://doi.org/10.1186/s13028-018-0373-9>
56. Grégoire, F., Mousset, B., Hanrez, D., Michaux, C., Walravens, K., & Linden, A. (2012). A serological and bacteriological survey of brucellosis in wild boar (*Sus scrofa*) in Belgium. *BMC Veterinary Research*, 8, Article 80. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-8-80>
57. Grilló, M. J., Blasco, J. M., Gorvel, J. P., Moriyón, I., & Moreno, E. (2012). What have we learned from brucellosis in the mouse model? *Veterinary Research*, 43, Article 29. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-43-29>
58. He, H. (2014, May). *Feral swine diseases prevention and control in China* [Oral presentation]. *International Workshop on Feral Swine Disease and Risk Management*, Fort Collins, CO, United States.
59. Helke, K. L., Ezell, P. C., Duran-Struuck, R., & Swindle, M. M. (2015). Biology and diseases of swine. In J. G. Fox, L. C. Anderson, G. M. Otto, K. Pritchett-Corning, & M. T. Whary (Eds.), *Laboratory animal medicine* (3rd ed., pp. 695–769). Elsevier.
60. Higgins, J., Stuber, T., Quance, C., Edwards, W. H., Tiller, R. V., Linfield, T., Rhyan, J., Berte, A., & Harris, B. (2012). Molecular epidemiology of *Brucella abortus* isolates from cattle, elk, and bison in the United States, 1998 to 2011. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(10), 3674–3684. <https://doi.org/10.1128/AEM.00045-12>
61. Hinić, V., Brodard, I., Thomann, A., Cvetnić, Z., Makaya, P. V., 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. *Journal of Microbiological Methods*, 75(2), 375–378. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2008.07.002>

62. Hinić, V., Brodard, I., Thomann, A., Holub, M., Miserez, R., & Abril, C. (2009). IS711-based real-time PCR assay as a tool for detection of *Brucella* spp. in wild boars and comparison with bacterial isolation and serology. *BMC Veterinary Research*, 5, Article 22. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-5-22>
63. Huang, T., Zhang, J., Sun, C., Liu, Z., He, H., Wu, J., & Geriletu. (2020). A novel arthropod host of brucellosis in the arid steppe ecosystem. *Frontiers in Veterinary Science*, 7, Article 566253. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.566253>
64. Hubálek, Z., Trembl, F., Juicová, Z., Huňady, M., Halouzka, J., Janík, V., & Bill, D. (2002). Serological survey of the wild boar (*Sus scrofa*) for tularaemia and brucellosis in South Moravia, Czech Republic. *Veterinární medicína*, 47(2–3), 60–66. <https://doi.org/10.17221/5805-VETMED>
65. Huddleson, I. F. (1929). *The differentiation of the species in the genus Brucella* (Technical Bulletin No. 100). Michigan State College Agricultural Experiment Station.
66. International Union for Conservation of Nature. (2018). *The IUCN Red List of Threatened Species*. <https://www.iucnredlist.org>
67. Jamil, T., Akar, K., Erdenlig, S., Murugaiyan, J., Sandalakis, V., Boukouvala, E., Psaroulaki, A., Melzer, F., Neubauer, H., & Wareth, G. (2022). Spatio-temporal distribution of brucellosis in European terrestrial and marine wildlife species and its regional implications. *Microorganisms*, 10(10), Article 1970. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10101970>
68. Kamath, P. L., Foster, J. T., Drees, K. P., Luikart, G., Quance, C., Anderson, N. J., Clarke, P. R., Cole, E. K., Drew, M. L., Edwards, W. H., Rhyen, J. C., Treanor, J. J., Wallen, R. L., White, P. J., Robbe-Austerman, S., & Cross, P. C. (2016). Genomics reveals historic and contemporary transmission dynamics of a bacterial disease among wildlife and livestock. *Nature Communications*, 7, Article 11448. <https://doi.org/10.1038/ncomms11448>
69. Kneipp, C. C., Sawford, K., Wingett, K., Malik, R., Stevenson, M. A., Mor, S. M., & Wiethoelter, A. K. (2021). *Brucella suis* seroprevalence and associated risk factors in dogs in eastern Australia, 2016 to 2019. *Frontiers in Veterinary Science*, 8, Article 727641. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.727641>
70. Kreizinger, Z., Foster, J. T., Rónai, Z., Sulyok, K. M., Wehmann, E., János, S., & Gyuranecz, M. (2014). Genetic relatedness of *Brucella suis* biovar 2 isolates from hares, wild boars and domestic pigs. *Veterinary Microbiology*, 172(3–4), 492–498. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.05.031>
71. Lapaque, N., Moriyon, I., Moreno, E., & Gorvel, J.-P. (2005). *Brucella* lipopolysaccharide acts as a virulence factor. *Current Opinion in Microbiology*, 8(1), 60–66. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2004.12.003>

72. Lavadinović, V., Popović, Z., Beuković, D., & Cokoski, K. (2020). Wild boar management (*Sus scrofa* L.) in the Republic of Serbia. *Glasnik Šumarskog Fakulteta*, 121, 47–60. <https://doi.org/10.2298/GSF2021047L>
73. Le Monde. (2024, May 15). *The Italian military has been called in to help hunt wild boar*. https://www.lemonde.fr/en/international/article/2024/05/15/the-italian-military-has-been-called-in-to-help-hunt-wild-boar_6671495_4.html
74. Leal-Klevezas, D. S., Martínez-Vázquez, I. O., López-Merino, A., & Martínez-Soriano, J. P. (1995). Single-step PCR for detection of *Brucella* spp. from blood and milk of infected animals. *Journal of Clinical Microbiology*, 33(12), 3087–3090. <https://doi.org/10.1128/JCM.33.12.3087-3090.1995>
75. Leuenberger, R., Boujon, P., Thür, B., Miserez, R., Garin-Bastuji, B., Rüfenacht, J., & Stärk, K. D. C. (2007). Prevalence of classical swine fever, Aujeszky's disease and brucellosis in a population of wild boar in Switzerland. *Veterinary Record*, 160(11), 362–368. <https://doi.org/10.1136/vr.160.11.362>
76. López-Goñi, I., García-Yoldi, D., Marín, C. M., de Miguel, M. J., Barquero-Calvo, E., Guzmán-Verri, C., Albert, D., & Garin-Bastuji, B. (2011). New Bruce-ladder multiplex PCR assay for the biovar typing of *Brucella suis* and the discrimination of *Brucella suis* and *Brucella canis*. *Veterinary Microbiology*, 154(1–2), 152–155. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.06.035>
77. Ma, R., Li, C., Gao, A., Jiang, N., Feng, X., Li, J., & Hu, W. (2024). Evidence-practice gap analysis in the role of ticks in brucellosis transmission: A scoping review. *Infectious Diseases of Poverty*, 13, Article 3. <https://doi.org/10.1186/s40249-023-01170-4>
78. Macías Luaces, L., Boll, K., Klose, C., Domogalla-Urbansky, J., Müller, M., Eisenberger, D., & Riehm, J. M. (2023). Seroprevalence of *Brucella* infection in wild boars (*Sus scrofa*) of Bavaria, Germany, 2019 to 2021 and associated genome analysis of five *B. suis* biovar 2 isolates. *Microorganisms*, 11(2), Article 478. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11020478>
79. Mackenzie, J. S., McKinnon, M., & Jeggo, M. (2014). One Health: From concept to practice. In A. Yamada, L. H. Kahn, B. Kaplan, T. P. Monath, J. Woodall, & L. Conti (Eds.), *Confronting emerging zoonoses: The One Health paradigm* (pp. 163–189). Springer Japan. https://doi.org/10.1007/978-4-431-55120-1_8
80. MacMillan, A. P. (1999). Brucellosis. In B. E. Straw, S. D'Allaire, W. L. Mengeling, & D. J. Taylor (Eds.), *Diseases of swine* (8th ed., pp. 385–393). Iowa State University Press.
81. Mailles, A., Ogielska, M., Kemiche, F., Garin-Bastuji, B., Brieu, N., Burnusus, Z., Creuwels, A., Danjean, M. P., Guiet, P., Nasser, V., Tourrand, B., Valour, F., Maurin, M., O'Callaghan, D., Mick, V., Vaillant, V., Jay, M., Lavigne, J. P., & de Valk, H. (2017). *Brucella suis* biovar

- 2 infection in humans in France: Emerging infection or better recognition? *Epidemiology and Infection*, 145(13), 2711–2716. <https://doi.org/10.1017/S0950268817001704>
82. Mancilla, M. (2016). Smooth to rough dissociation in *Brucella*: The missing link to virulence. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 5, Article 98. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2015.00098>
83. Manthei, C. A., Mingle, C. K., & Carter, R. W. (1952). *Brucella suis* infection in suckling and weanling pigs. I. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 121(908), 373–382.
84. Manthei, C. A. (1964). Brucellosis. In H. W. Dunne (Ed.), *Diseases of swine* (2nd ed., pp. 338–362). Iowa State University Press.
85. Manthei, C. A., & Deyoe, B. L. (1970). Brucellosis. In H. W. Dunne (Ed.), *Diseases of swine* (3rd ed.). Iowa State University Press.
86. Matrone, M., Keid, L. B., Rocha, V. C., Vejarano, M. P., Ikuta, C. Y., Rodriguez, C. A., Ferreira, F., Dias, R. A., & Ferreira Neto, J. S. (2009). Evaluation of DNA extraction protocols for *Brucella abortus* PCR detection in aborted fetuses or calves born from cows experimentally infected with strain 2308. *Brazilian Journal of Microbiology*, 40(3), 480–489. <https://doi.org/10.1590/S1517-838220090003000010>
87. Melzer, F., Lohse, R., Nieper, H., Liebert, M., & Sachse, K. (2006). A serological study on brucellosis in wild boars in Germany. *European Journal of Wildlife Research*, 53(2), 153–157. <https://doi.org/10.1007/s10344-006-0072-0>
88. Mick, V., Le Carrou, G., Corde, Y., Game, Y., Jay, M., & Garin-Bastuji, B. (2014). *Brucella melitensis* in France: Persistence in wildlife and probable spillover from Alpine ibex to domestic animals. *PLOS ONE*, 9(4), Article e94168. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094168>
89. Milićević, V., Sapundžić, Z. Z., Glišić, D., Kureljušić, B., Vasković, N., Đorđević, M., & Mirčeta, J. (2024). Cross-sectional serosurvey of selected infectious diseases in wild ruminants in Serbia. *Research in Veterinary Science*, 170, Article 105183. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2024.105183>
90. Ministarstvo poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede Republike Srbije. (2020). *Pravilnik o utvrđivanju Programa mera zdravstvene zaštite životinja za 2020. godinu* („Službeni glasnik Republike Srbije“, br. 25/2020).
91. Mor, S. M., Wiethoelter, A. K., Lee, A., Moloney, B., James, D. R., & Malik, R. (2016). Emergence of *Brucella suis* in dogs in New South Wales, Australia: Clinical findings and implications for zoonotic transmission. *BMC Veterinary Research*, 12, Article 199. <https://doi.org/10.1186/s12917-016-0835-0>

92. Morata, P., Queipo-Ortuño, M. I., & de Dios Colmenero, J. (1998). Strategy for optimizing DNA amplification in a peripheral blood PCR assay used for diagnosis of human brucellosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 36(9), 2443–2446. <https://doi.org/10.1128/JCM.36.9.2443-2446.1998>
93. Moreno, E., Middlebrook, E. A., Altamirano-Silva, P., Al Dahouk, S., Araj, G. F., Arce-Gorvel, V., Arenas-Gamboa, Á., Ariza, J., Barquero-Calvo, E., Battelli, G., Bertu, W. J., Blasco, J. M., Bosilkovski, M., Cadmus, S., Caswell, C. C., Celli, J., Chacón-Díaz, C., Chaves-Olarte, E., Comerci, D. J., ... Moriyón, I. (2023). If you're not confused, you're not paying attention: *Ochrobactrum* is not *Brucella*. *Journal of Clinical Microbiology*, 61(8), Article e0043823. <https://doi.org/10.1128/jcm.00438-23>
94. Muñoz, P. M., Boadella, M., Arnal, M., de Miguel, M. J., Revilla, M., Martínez, D., Vicente, J., Acevedo, P., Oleaga, Á., Ruiz-Fons, F., Marín, C. M., Prieto, J. M., de la Fuente, J., Barral, M., Barberán, M., Fernández de Luco, D., Blasco, J. M., & Gortázar, C. (2010). Spatial distribution and risk factors of brucellosis in Iberian wild ungulates. *BMC Infectious Diseases*, 10, Article 46. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-10-46>
95. Muñoz, P. M., Mick, V., Sacchini, L., Janowicz, A., de Miguel, M. J., Cherfa, M. A., Rodríguez Nevado, C., Girault, G., Andrés-Barranco, S., Jay, M., Di Giannatale, E., Zilli, K., Ancora, M., Dondo, A., Zoppi, S., Arnal, M. C., Tittarelli, M., De Massis, F., Garin-Bastuji, B., Blasco, J. M., & Garofolo, G. (2019). Phylogeography and epidemiology of *Brucella suis* biovar 2 in wildlife and domestic swine. *Veterinary Microbiology*, 233, 68–77. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2019.04.025>
96. Neglia, G., Veneziano, V., De Carlo, E., Galiero, G., Borriello, G., Francillo, M., Campanile, G., Zicarelli, L., & Manna, L. (2013). Detection of *Brucella abortus* DNA and RNA in different stages of development of the sucking louse *Haematopinus tuberculatus*. *BMC Veterinary Research*, 9, Article 236. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-9-236>
97. Nielsen, K., & Duncan, J. R. (1988). Antibody isotype response in adult cattle vaccinated with *Brucella abortus* S19. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 19(3–4), 205–214. [https://doi.org/10.1016/0165-2427\(88\)90108-0](https://doi.org/10.1016/0165-2427(88)90108-0)
98. Nielsen, K. H., Kelly, L., Gall, D., Nicoletti, P., & Kelly, W. (1995). Improved competitive enzyme immunoassay for the diagnosis of bovine brucellosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 46(3–4), 285–291. [https://doi.org/10.1016/0165-2427\(94\)05361-U](https://doi.org/10.1016/0165-2427(94)05361-U)
99. Nielsen, K. (2002). Diagnosis of brucellosis by serology. *Veterinary Microbiology*, 90(1–4), 447–459. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(02\)00229-8](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(02)00229-8)
100. Occhialini, A., Hofreuter, D., Ufermann, C. M., Al Dahouk, S., & Köhler, S. (2022). The retrospective on atypical *Brucella* species leads to novel definitions. *Microorganisms*, 10(4), Article 813. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10040813>

101. Olsen, S. C., Boggiatto, P., Nol, P., & Samartino, L. (2019). Brucellosis. In J. J. Zimmerman, L. A. Karriker, A. Ramirez, K. J. Schwartz, G. W. Stevenson, & J. Zhang (Eds.), *Diseases of swine* (11th ed., pp. 778–791). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9781119350927.ch50>
102. Palmer, M. V., Olsen, S. C., Gilsdorf, M. J., Philo, L. M., Clarke, P. R., & Cheville, N. F. (1996). Abortion and placentitis in pregnant bison (*Bison bison*) induced by the vaccine candidate, *Brucella abortus* strain RB51. *American Journal of Veterinary Research*, 57(11), 1604–1607. <https://doi.org/10.2460/ajvr.1996.57.11.1604>
103. Papić, B., Kušar, D., Krt, B., Ocepek, M., & Avberšek, J. (2023). Phylogeography of *Brucella suis* biovar 2 with focus on Slovenian wildlife. *Veterinary Microbiology*, 282, Article 109751. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2023.109751>
104. Paton, N. I., Tee, N. W.-S., Vu, C. K.-F., & Teo, T.-P. (2001). Visceral abscesses due to *Brucella suis* infection in a retired pig farmer. *Clinical Infectious Diseases*, 32(8), e129–e130. <https://doi.org/10.1086/319748>
105. Porte, F., Naroeni, A., Ouahrani-Bettache, S., & Liautard, J. P. (2003). Role of the *Brucella suis* lipopolysaccharide O antigen in phagosomal genesis and in inhibition of phagosome-lysosome fusion in murine macrophages. *Infection and Immunity*, 71(3), 1481–1490. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.3.1481-1490.2003>
106. Praud, A., Gimenez, O., Zanella, G., Dufour, B., Pozzi, N., Antras, V., Meyer, L., & Garin-Bastuji, B. (2012). Estimation of sensitivity and specificity of five serological tests for the diagnosis of porcine brucellosis. *Preventive Veterinary Medicine*, 104(1–2), 94–100. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2011.10.014>
107. Praud, A., Gimenez, O., Zanella, G., Pozzi, N., Antras, V., Meyer, L., & Garin-Bastuji, B. (2013). Evaluation of five serological tests for the diagnosis of porcine brucellosis in French Polynesia. *Tropical Animal Health and Production*, 45(4), 931–933. <https://doi.org/10.1007/s11250-012-0309-8>
108. Prilog 1. Obrazac za uzorkovanje divljih svinja
109. Pyskun, A., Polishchuk, O., Piankivska, I., Pyskun, O., Moroz, O., Pishchanskyi, O., & Aliekseieva, H. (2019). Presence of antibodies against *Brucella* spp. in serum samples from wild boars in Ukraine. *Porcine Research*, 9(1), 26–33.
110. Radojičić, S. (2004). Bruceloza – bolest životinja i potencijalna opasnost za zdravlje ljudi. U *Zbornik predavanja sa XXV seminara za inovacije znanja veterinara* (str. 107–114). Beograd: Fakultet veterinarske medicine.
111. Radojičić, S. (2005). Bruceloza – epizootiološki i dijagnostički izazov. *Veterinarski glasnik*, 59(1–2), 79–87. <https://doi.org/10.2298/VETGL0502079R>

112. Ramamoorthy, S., Woldemeskel, M., Ligett, A., Snider, R., Cobb, R., & Rajeev, S. (2011). *Brucella suis* infection in dogs, Georgia, USA. *Emerging Infectious Diseases*, 17(12), 2386–2387. <https://doi.org/10.3201/eid1712.111127>
113. Rebollada-Merino, A., Pérez-Sancho, M., Rodríguez-Bertos, A., García, N., Martínez, I., Navarro, A., Domínguez, L., & García-Seco, T. (2022). Environment and offspring surveillance in porcine brucellosis. *Frontiers in Veterinary Science*, 9, Article 915692. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.915692>
114. Rebollada-Merino, A., García-Seco, T., Pérez-Sancho, M., Domínguez, L., & Rodríguez-Bertos, A. (2023). Histopathologic and immunohistochemical findings in the placentas and fetuses of domestic swine naturally infected with *Brucella suis* biovar 2. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 35(3), 258–265. <https://doi.org/10.1177/10406387231163867>
115. Rebollada-Merino, A., Martínez, I., Duque, C., García-Seco, T., Escacena, C., Domínguez, L., Rodríguez-Bertos, A., & García, N. (2024). Detection of *Brucella* in *Dermacentor* ticks of wild boar with brucellosis. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2024, Article 6618287. <https://doi.org/10.1155/2024/6618287>
116. Republički zavod za statistiku. (2019). *Broj divljih svinja*. Preuzeto 5. aprila 2022. sa <https://data.stat.gov.rs/Home/Result/13040601?languageCode=sr-Latn>
117. Risco, D., García, A., Serrano, E., Fernandez-Llario, P., Benítez, J. M., Martínez, R., García, W. L., & de Mendoza, J. H. (2014). High-density dependence but low impact on selected reproduction parameters of *Brucella suis* biovar 2 in wild boar hunting estates from south-western Spain. *Transboundary and Emerging Diseases*, 61(6), 555–562. <https://doi.org/10.1111/tbed.12060>
118. Rogožarski, D., Potkonjak, A., Gagrčin, M., Lako, B., & Plavšić, B. (2009). Isolation and identification of *Brucella suis* biotype 2 from epididymal puncture performed on a boar affected with brucellosis. *Veterinarski glasnik*, 63(3–4), 153–161. <https://doi.org/10.2298/VETGL0904153R>
119. Rónai, Z., Kreizinger, Z., Dán, Á., Drees, K., Foster, J. T., Bányai, K., Marton, S., Szeredi, L., János, S., & Gyuranecz, M. (2015). First isolation and characterization of *Brucella microti* from wild boar. *BMC Veterinary Research*, 11, Article 147. <https://doi.org/10.1186/s12917-015-0456-z>
120. Ruano, Z. M., Mateus, T. L., & Vieira-Pinto, M. (2025). An insight into brucellosis in wild boar and domestic pigs in Europe: A systematic review. *Journal of Infection and Public Health*, 18(4), Article 102691. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2025.102691>
121. Ruiz-Fons, F., Vicente, J., Vidal, D., Höfle, U., Villanueva, D., Gauss, C., Segalés, J., Almería, S., Montoro, V., & Gortázar, C. (2006). Seroprevalence of six reproductive pathogens in European wild boar (*Sus scrofa*) from Spain: The effect on wild boar female

- reproductive performance. *Theriogenology*, 65(4), 731–743. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.07.001>
122. Ruiz-Fons, F. (2017). A review of the current status of relevant zoonotic pathogens in wild swine (*Sus scrofa*) populations: Changes modulating the risk of transmission to humans. *Transboundary and Emerging Diseases*, 64(1), 68–88. <https://doi.org/10.1111/tbed.12369>
 123. Sampels, S., Jonsson, M., Sandgren, M., Karlsson, A., & Segerkvist, K. A. (2023). Sustainable delicacy: Variation in quality and sensory aspects in wild boar (*Sus scrofa*) meat and comparison to pork meat—A case study. *Foods*, 12(8), Article 1644. <https://doi.org/10.3390/foods12081644>
 124. Sankarasubramanian, J., Vishnu, U. S., Khader, L. K. M. A., Sridhar, J., Gunasekaran, P., & Rajendhran, J. (2016). BrucellaBase: Genome information resource. *Infection, Genetics and Evolution*, 43, 38–42. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.05.006>
 125. Santos, A. R., Goes Filho, J. T., Nery, J. A., Duppre, N. C., Gallo, M. E., Suffys, P. N., & Degrave, W. M. (1995). Evaluation of PCR mediated DNA amplification in non-invasive biological specimens for subclinical detection of *Mycobacterium leprae*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 11(2), 113–120. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.1995.tb00097.x>
 126. SCHEDA Ecological Associates, Inc. (2010). Wild boar aging guide: Field methodology for assessing age classes by tooth eruption. SCHEDA Publications.
 127. Scholz, H. C., Hubalek, Z., Sedláček, I., Vergnaud, G., Tomaso, H., Al Dahouk, S., Melzer, F., Kämpfer, P., Neubauer, H., Cloeckart, A., Maquart, M., Zygmunt, M. S., Whatmore, A. M., Falsen, E., Bahn, P., Göllner, C., Pfeffer, M., Huber, B., Busse, H.-J., & Nöckler, K. (2008a). *Brucella microti* sp. nov. isolated from the common vole (*Microtus arvalis*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58(2), 375–382. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65356-0>
 128. Scholz, H. C., Hubalek, Z., Nesvadbova, J., Tomaso, H., Vergnaud, G., Le Flèche, P., Whatmore, A. M., Al Dahouk, S., Krüger, M., Lodri, C., & Pfeffer, M. (2008b). Isolation of *Brucella microti* from soil. *Emerging Infectious Diseases*, 14(8), 1316–1317. <https://doi.org/10.3201/eid1408.080286>
 129. Scholz, H. C., Hofer, E., Vergnaud, G., Le Flèche, P., Whatmore, A. M., Al Dahouk, S., Pfeffer, M., Krüger, M., Cloeckart, A., & Tomaso, H. (2009). Isolation of *Brucella microti* from mandibular lymph nodes of red foxes, *Vulpes vulpes*, in lower Austria. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 9(2), 153–156. <https://doi.org/10.1089/vbz.2008.0036>
 130. Scholz, H. C., Nöckler, K., Göllner, C., Bahn, P., Vergnaud, G., Tomaso, H., Al Dahouk, S., Kämpfer, P., Cloeckart, A., Maquart, M., Zygmunt, M. S., Whatmore, A. M., Pfeffer, M., Huber, B., Busse, H.-J., & De, B. K. (2010). *Brucella inopinata* sp. nov., isolated from a

- breast implant infection. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60(4), 801–808. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.011148-0>
131. Scholz, H. C., Revilla-Fernández, S., Dahouk, S. A., Hammerl, J. A., Zygmunt, M. S., Cloeckert, A., Koylass, M., Whatmore, A. M., Blom, J., Vergnaud, G., Witte, A., Aistleitner, K., & Hofer, E. (2016). *Brucella vulpis* sp. nov., isolated from mandibular lymph nodes of red foxes (*Vulpes vulpes*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66(5), 2090–2098. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000998>
 132. Steele, K. H., Baumgartner, J. E., Valderas, M. W., & Roop, R. M. (2010). Comparative study of the roles of AhpC and KatE as respiratory antioxidants in *Brucella abortus* 2308. *Journal of Bacteriology*, 192(19), 4912–4922. <https://doi.org/10.1128/JB.00231-10>
 133. Stoffregen, W. C., Olsen, S. C., Wheeler, J., Bricker, B. J., Palmer, M. V., Jensen, A. E., Halling, S. M., & Alt, D. P. (2007). Diagnostic characterization of a feral swine herd enzootically infected with *Brucella*. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 19(3), 227–237. <https://doi.org/10.1177/104063870701900301>
 134. Szulowski, K., Iwaniak, W., Weiner, M., & Żłotnicka, J. (2013a). Characteristics of *Brucella* strains isolated from animals in Poland. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 16(4), 757–758. <https://doi.org/10.2478/pjvs-2013-0109>
 135. Szulowski, K., Iwaniak, W., Weiner, M., & Żłotnicka, J. (2013b). *Brucella suis* biovar 2 isolations from cattle in Poland. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 20(4), 672–675.
 136. Špičić, S., Benić, M., Zdelar-Tuk, M., Duvnjak, S., Karakaš, A., Kiš, T., Sućec, I., & Cvetnić, Ž. (2016). Brucellosis in Turopolje pig breeding in the 2008–2011 period: An overview of laboratory diagnostics and eradication system. *Veterinarski Arhiv*, 86(2), 243–252.
 137. Tanner, M., Inlameia, O., Michel, A., Maxlhuza, G., Pondja, A., Fafetine, J., Macucule, B., Zacarias, M., Manguale, J., Moiane, I. C., Marranangumbe, A. S., Mulandane, F., Schönfeld, C., Moser, I., van Helden, P., & Machado, A. (2015). Bovine tuberculosis and brucellosis in cattle and African buffalo in the Limpopo National Park, Mozambique. *Transboundary and Emerging Diseases*, 62(6), 632–638. <https://doi.org/10.1111/tbed.12210>
 138. Taylor, L. H., Latham, S. M., & Woolhouse, M. E. J. (2001). Risk factors for human disease emergence. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 356(1411), 983–989. <https://doi.org/10.1098/rstb.2001.0888>
 139. Teyssou, R., Morvan, J., Leleu, J.-P., Roumegou, P., Goullin, B., & Carteron, B. (1989). A propos d'un cas de brucellose humaine à *Brucella suis* biovar 2. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 19(3), 160–161. [https://doi.org/10.1016/S0399-077X\(89\)80221-5](https://doi.org/10.1016/S0399-077X(89)80221-5)
 140. Tovar, R. M. (1947). Infection and transmission of *Brucella* by ectoparasites. *American Journal of Veterinary Research*, 8(26), 138–140.

141. Traum, J. (1914). *Report of the Chief of the Bureau of Animal Industry* (p. 30). United States Department of Agriculture, Washington, DC.
142. Treml, F., Pikula, J., Bandouchova, H., & Horáková, J. (2007). European brown hare as a potential source of zoonotic agents. *Veterinary Medicine*, 52(10), 451–456. <https://doi.org/10.17221/2050-VETMED>
143. Turse, J. E., Pei, J., & Ficht, T. A. (2011). Lipopolysaccharide-deficient *Brucella* variants arise spontaneously during infection. *Frontiers in Microbiology*, 2, 54. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00054>
144. U.S. Centers for Disease Control and Prevention. (n.d.). *About One Health*. <https://www.cdc.gov/one-health/about/index.html>
145. Uhrig, S. R., Nol, P., McCollum, M., Salman, M., & Rhyan, J. C. (2013). Evaluation of transmission of *Brucella abortus* strain 19 in bison by intravaginal, intrauterine, and intraconjunctival inoculation. *Journal of Wildlife Diseases*, 49(3), 522–526. <https://doi.org/10.7589/2012-03-071>
146. Vaillant, V., Garin-Bastuji, B., Brun, M., & Louguet, Y. (2005). *Séroprévalence humaine autour des foyers porcins de brucellose à Brucella suis biovar 2, France, 1993–2003* [Rapport]. Ministère de l’Agriculture, de l’Alimentation, de la Pêche et des Affaires Rurales. https://www.santepubliquefrance.fr/sites/default/files/rdd/document/31775_1651-d353.pdf
147. van Tulden, P., Gonzales, J. L., Kroese, M., Engelsma, M., de Zwart, F., Szot, D., Bisselink, Y., van Setten, M., Koene, M., Willemsen, P., Roest, H. J., & van der Giessen, J. (2020). Monitoring results of wild boar (*Sus scrofa*) in The Netherlands: Analyses of serological results and the first identification of *Brucella suis* biovar 2. *Infection Ecology & Epidemiology*, 10(1), Article 1794668. <https://doi.org/10.1080/20008686.2020.1794668>
148. Vejarano, M. P., Matrone, M., Keid, L. B., Rocha, V. C., Ikuta, C. Y., Rodriguez, C. A., Salgado, V. R., Ferreira, F., Dias, R. A., Telles, E. O., & Ferreira Neto, J. S. (2013). Evaluation of four DNA extraction protocols for *Brucella abortus* detection by PCR in tissues from experimentally infected cows with the 2308 strain. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 13(4), 237–242. <https://doi.org/10.1089/vbz.2011.0923>
149. Vila, A., Pagella, H., Vera Bello, G., & Vicente, A. (2016). *Brucella suis* bacteremia misidentified as *Ochrobactrum anthropi* by the VITEK 2 system. *Journal of Infection in Developing Countries*, 10(4), 432–436. <https://doi.org/10.3855/jidc.7532>
150. Weiner, M., Iwaniak, W., & Szulowski, K. (2009). Identification of *Brucella* DNA in lymph tissue from deer (*Cervus elaphus*) and wild boars (*Sus scrofa*) by the use of BCSP31 PCR and AMOS-PCR. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 53, 609–612.

151. Whatmore, A. M., Perrett, L. L., & MacMillan, A. P. (2007). Characterisation of the genetic diversity of *Brucella* by multilocus sequencing. *BMC Microbiology*, 7, 34. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-7-34>
152. Whatmore, A. M. (2009). Current understanding of the genetic diversity of *Brucella*, an expanding genus of zoonotic pathogens. *Infection, Genetics and Evolution*, 9(6), 1168–1184. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2009.07.001>
153. Whatmore, A. M., Davison, N., Cloeckaert, A., Al Dahouk, S., Zygmunt, M. S., Brew, S. D., Perrett, L. L., Koylass, M. S., Vergnaud, G., Quance, C., Scholz, H. C., Dick, E. J., Jr., Hubbard, G., & Schlubritz-Loutsevitch, N. E. (2014). *Brucella papionis* sp. nov., isolated from baboons (*Papio* spp.). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64(11), 4120–4128. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.065482-0>
154. Wilson, I. G. (1997). Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(10), 3741–3751. <https://doi.org/10.1128/aem.63.10.3741-3751.1997>
155. Winkelmayer, R., Vodnansky, M., Paulsen, P., Gansterer, A., & Treml, F. (2005). Explorative study on the seroprevalence of *Brucella*-, *Francisella*-, and *Leptospira* antibodies in the European hare (*Lepus europaeus* Pallas) of the Austrian–Czech border region. *Wiener Tierärztliche Monatsschrift*, 92(5–6), 131–135.
156. World Health Organization. (2006). *The control of neglected zoonotic diseases: A route to poverty alleviation*. <https://www.who.int/publications/i/item/9789241594301>
157. World Health Organization. (2023). *One Health definitions and principles*. <https://www.who.int/publications/m/item/one-health-definitions-and-principles>
158. World Organisation for Animal Health (WOAH). (2024). *Brucellosis (infection with Brucella abortus, B. melitensis and B. suis)*. In *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals* (13th ed., Chapter 3.1.4). World Organisation for Animal Health. https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.01.04_BRUCELLOSIS.pdf
159. Wright, A. E., & Smith, F. (1897). On the application of the serum test to the differential diagnosis of typhoid and Malta fever, and on the further application of the method of serum diagnosis to the elucidation of certain problems in connexion with the duration of immunity and the geographical distribution of disease. *The Lancet*, 149(3836), 656–659. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)49007-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)49007-0)
160. Wu, N., Abril, C., Hinić, V., Brodard, I., Thür, B., Fattebert, J., Hüsey, D., & Ryser-Degiorgis, M. P. (2011). Free-ranging wild boar: A disease threat to domestic pigs in Switzerland? *Journal of Wildlife Diseases*, 47(4), 868–879. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-47.4.868>

161. Wu, N., Abril, C., Thomann, A., Grosclaude, E., Doherr, M. G., Boujon, P., & Ryser-Degiorgis, M. P. (2012). Risk factors for contacts between wild boar and outdoor pigs in Switzerland and investigations on potential *Brucella suis* spill-over. *BMC Veterinary Research*, 8, Article 116. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-8-116>
162. Žutić, J., Stanojević, S., Plavšić, B., & Vojinović, D. (2013). Prevalence and significance of brucellosis in the Republic of Serbia. In *Book of abstracts of the Symposium Brucellosis in Croatia and Neighbouring Countries* (pp. 1–2). Croatian Academy of Sciences and Arts & Croatian Veterinary Institute.
163. Žutić, J., Vojinović, D., Stanojević, S., Cvetojević, Đ. J., & Plavšić, B. (2016). Seroepizootiological situation of brucellosis in the Republic of Serbia. U *Zbornik radova sa 2. međunarodnog simpozijuma veterinarske medicine* (str. 30–35). Beograd: Naučni institut za veterinarstvo Srbije.
164. Žutić, J., Cvetojević, D., Veljović, L., Radanović, O., Stanojević, S., & Kureljušić, B. (2017). First report of *Brucella suis* biovar 2 in outdoor-reared pigs (*Sus scrofa domesticus*) in Serbia. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*, 41(5), 700–704. <https://doi.org/10.3906/vet-1702-15>

PRILOG 1.

UZORKOVANJE DIVLJIH SVINJA za potrebe izrade doktorske disertacije

Oznaka uzorka: _____

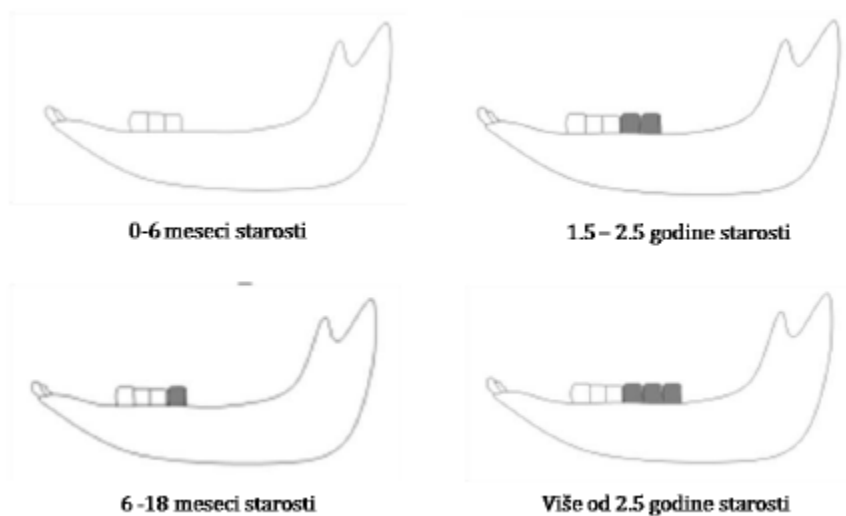
Uzorak:

- ☐ Krv (iz srca ili grudne šupljine)
- ☐ Testisi
- ☐ Materica
- ☐ Tonzile
- ☐ Cervikalni limfni čvorovi
- ☐ Slezina

Lovište/koordinate mesta ulova: _____

Pol: M Ž

Starost jedinke procenjena prema šemi: _____



Vodič za određivanje starosti divljih svinja na osnovu broja stalnih molara prema preporuci *SCHEDA Ecological Associates, inc.*

BIOGRAFIJA

Zorana Zurovac Sapundžić rođena je 29. juna 1991. godine u Sarajevu, Bosna i Hercegovina. Osnovno i srednje obrazovanje, uz završenu osnovnu muzičku školu, stekla je u Grockoj, a 2010. godine upisala je integrisane akademske studije na Fakultetu veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu. Kao dobitnik CEEPUS stipendije (*Central European Exchange Program for University Studies*), ostvarila je studijske boravke na Univerzitetu veterinarske medicine u Beču, Austrija (*Veterinärmedizinische Universität Wien*), tokom 2013. i 2016. godine. Nakon završenih studija sa prosečnom ocenom 9,60, iste godine upisala je doktorske akademske studije na matičnom fakultetu. Sve ispite predviđene programom doktorskih studija položila je sa prosečnom ocenom 9,65.

Svoje stručno znanje i iskustvo sticala je kroz rad u različitim institucijama iz oblasti veterinarske medicine. Profesionalni put započela je na Fakultetu veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu, gde je bila angažovana na Katedri za farmakologiju i toksikologiju i Katedri za histologiju i embriologiju. Stručno iskustvo dalje je nadogradila u Direkciji za nacionalne referentne laboratorije i Specijalističkom veterinarskom institutu u Pančevu. Od 2020. godine zaposlena je u Naučnom institutu za veterinarstvo Srbije. Do sada je kao autor i koautor objavila 36 naučnih publikacija, uključujući radove u međunarodnim i nacionalnim časopisima, kao i saopštenja sa naučnih skupova.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписана Зорана Зуровац Сапунџић

број уписа 2016/5019

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

„Утврђивање присуства и раширености *Brucella* врста код дивљих свиња на територији Републике Србије“

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

Потпис докторанда

У Београду, 06.08.2026.



Прилог 2.

**Изјава о истоветности штампане и електронске
верзије докторског рада**

Име и презиме аутора: Зорана Зуровац Сапунцић

Број уписа: 2016/5019

Студијски програм: Докторске академске студије

Наслов рада: „Утврђивање присуства и раширености *Brucella* врста код дивљих свиња на територији Републике Србије“

Ментор 1: проф. др Соња Радојичић

Ментор 2: др сци. вет. мед. Јадранка Жутић

Потписана: Зорана Зуровац Сапунцић

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, 06.08.2026.



Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

„Утврђивање присуства и раширености *Brucella* врста код дивљих свиња на територији Републике Србије“

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, 06.08.2026.



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

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

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

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

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

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