

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2023

Kristýna Voltrová

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Brucella abortus

Bakalářská práce

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2022/2023

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Kristýna Voltrová**
Osobní číslo: **C19310**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Téma práce: ***Brucella abortus***
Téma práce anglicky: ***Brucella abortus***
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

Zpracujte literární rešerši na dané téma bakalářské práce. V rešerši se zaměřte na charakteristiku rodu *Brucella*, její antigenní strukturu a faktory virulence. V další části se zaměřte na patogenезi diagnostiku bakterie *Brucella abortus* (včetně kultivace a molekulárně biologických metod). V poslední části se zaměřte na onemocnění způsobené touto bakterií a léčbu této nemoci. Dále zjistěte výskyt brucelózy v posledních 5 letech.

Bakalářskou práci zpracujte v souladu se Směrnicí UPa č. 7/2019 ve znění dodatku č. 2 "Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací".

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucího bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Iveta Brožková, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: **23. prosince 2022**
Termín odevzdání bakalářské práce: **30. června 2023**

prof. Ing. Petr Němec, Ph.D. v.r.
děkan

LS.

doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D. v.r.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2023

Prohlašuji:

Práci s názvem *Brucella abortus* jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 21. 6. 2023

.....
Kristýna Voltrová

PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych ráda poděkovala vedoucímu své bakalářské práce Ing. Ivetě Brožkové, Ph.D. za odbornou pomoc, cenné rady a připomínky, které mi pomohli při zpracování tématu.

ANOTACE

Tato bakalářská práce je zaměřena na bakterii *Brucella abortus*, která je jedním z nejčastějších původců celosvětově rozšířeného onemocnění brucelóza, které je znovu aktuálním problémem v České republice. V dané práci jsou uvedeny faktory virulence, pomocí nichž bakterie působí na organismus zvířete či člověka. Práce je dále zaměřena na jednotlivé diagnostické metody, které jsou podstatné pro včasné rozpoznání onemocnění a samotného původce. Závěrečná část je zaměřena na léčbu, prevenci a výskyt onemocnění brucelóza na našem území v předešlých letech až do současnosti.

KLÍČOVÁ SLOVA

Brucella abortus, faktory virulence, lipopolysacharid, erytritol, brucelóza, klinické příznaky, diagnostika, léčba a prevence, brucelóza v České republice

TITLE

Brucella abortus

ANNOTATION

This bachelor thesis focuses on the bacterium *Brucella abortus*, which is one of the one of the most frequent causative agents of the worldwide spread disease brucellosis, which is again a current problem in the Czech Republic. The virulence factors through which the bacterium acts on the animal or human organism are presented in the thesis. The thesis also focuses on individual diagnostic methods that are essential for early detection of the disease and the causative agent itself. The final part focuses on the treatment, prevention and occurrence of brucellosis in our territory in previous years up to the present.

KEYWORDS

Brucella abortus, virulence factors, lipopolysacharide, erythritol, brucellosis, clinical signs, diagnosis, treatment and prevention, brucellosis in the Czech republic

OBSAH

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK	10
SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK.....	11
TERMINOLOGIE.....	13
ÚVOD	16
1 Rod <i>Brucella</i>	17
1.1 Taxonomie rodu <i>Brucella</i>	17
1.2 Základní charakteristika rodu <i>Brucella</i>	19
1.3 <i>Brucella abortus</i>	20
2 Faktory virulence.....	21
2.1 Lipopolysacharid.....	21
2.1.1 Antigenní determinanty	23
2.2 Erythritol	24
3 Patogeneze	25
3.1 Brucelóza zvířat	25
3.1.1 Klinické projevy u samic.....	26
3.1.2 Klinické projevy u samců.....	27
3.1.3 Klinické projevy u telat	27
3.2 Patologie.....	27
4 Brucelóza.....	31
4.1 Klinické příznaky	32
5 Diagnostika.....	35
5.1 Mikroskopické vyšetření.....	37
5.1.1 Gramovo barvení	37
5.1.2 Průkaz katalázy.....	37
5.1.3 Průkaz oxidázy	38
5.1.4 Důkaz ureázy	38
5.2 Kultivace	39
5.3 Serologické vyšetření	42

5.3.1	Test na principu aglutinace.....	44
5.3.2	Standardní aglutinační test	45
5.3.3	Enzymová imunoanalýza na imunosorbentech	45
5.4	Diagnostika založena na polymerázové řetězové reakci.....	46
6	Léčba a prevence	48
6.1	Rezistence <i>B. abortus</i>	48
6.2	Léčba	48
6.2.1	Léčba hospodářských zvířat	48
6.2.2	Léčba lidské brucelózy	48
6.3	Kontrola a prevence	49
6.3.1	Kontrola a prevence u zvířat.....	49
6.3.2	Imunizace	50
6.3.3	Kontrola a prevence prováděna u lidí.....	52
7	Výskyt brucelózy v České republice	54
7.1	Kazuistiky	55
7.1.1	První případ onemocnění – žena, narozena 1998	55
7.1.2	Druhý případ onemocnění – žena, narozena 1998	56
7.1.3	Třetí případ onemocnění – muž, narozený 1963	56
7.1.4	Čtvrtý případ onemocnění – žena, narozena 1961	56
8	ZÁVĚR.....	58
	POUŽITÁ LITERATURA.....	60

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

Obrázek 1 Brucella po obarvení dle Grama (převzato z Anantha et al., 2019).	17
Obrázek 2 Schéma struktury LPS Brucella abortus.....	22
Obrázek 3 Děloha krávy infikované B. abortus	28
Obrázek 4 Placenta krávy po abortu.	29
Obrázek 5 Obsah tekutiny v hrudní a břišní dutině potraceného telete (převzato z Özen et al., 2021).	29
Obrázek 6 Princip přenosu brucelózy (upraveno dle Khurana et al., 2021).	30
Obrázek 7 Přirození hostitelé a potenciální riziko zoonózy u kmenů rodu Brucella.	32
Obrázek 8 Interpretace výsledků průkazu oxidázy (upraveno dle Shields a Cathcart, 2010).	38
Obrázek 9 Srovnání výsledků testu na Christensenově ureázovém agaru (upraveno dle Brink, 2010).	39
Obrázek 10 Růst B. abortus na krevním agaru	40
Obrázek 11 Růst B. abortus na brucella agaru.	41
Obrázek 12 Růst B. abortus na Thayer-Martinův agar	41
Obrázek 13 Kultura B. abortus na Farrellově médiu.	42
Obrázek 14 Průkaz protilátek proti Brucella spp. metodou RBT	44
Obrázek 15 Gelová elektroforéza poskytující pozitivní výsledek na B. abortus	47
Obrázek 16 Graf zobrazující evidované případy brucelózy na území České republiky v letech 2013 – 2022 (vytvořeno dle zdroje Infekce v ČR – ISIN, 2022; Infekce v ČR - ISIN, 2023).	55
Tabulka 1 Klasifikace druhů <i>Brucella</i> v závislosti na hostiteli a rozdílu v patogenitě..	18
Tabulka 2 Ureázová aktivita a oxidační metabolismus jednotlivých druhů <i>Brucella</i> ...	20
Tabulka 3 Charakteristické znaky jednotlivých druhů brucela a jejich biotypů.....	36
Tabulka 4 Seznam diagnostických testů na brucelózu: " <i>předepsané testy</i> " jsou vyžadovány OIE a " <i>alternativní testy</i> " jsou vhodné pro diagnostiku nákazy v místním prostředí a mohou být také použity při vývozu/dovozu zvířat po oboustranné dohodě.	43
Tabulka 5 Rozdělení metod v závislosti na záměru stanovení	43
Tabulka 6 Vlastnosti vakcíny proti rodu <i>Brucella</i>	51

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

ATB	antibiotika
<i>B. abortus</i>	<i>Brucella abortus</i>
<i>B. canis</i>	<i>Brucella canis</i>
<i>B. ceti</i>	<i>Brucella ceti</i>
<i>B. inopinata</i>	<i>Brucella inopinata</i>
<i>B. melitensis</i>	<i>Brucella melitensis</i>
<i>B. microti</i>	<i>Brucella microti</i>
<i>B. neotomae</i>	<i>Brucella neotomae</i>
<i>B. ovis</i>	<i>Brucella ovis</i>
<i>B. papionis</i>	<i>Brucella papionis</i>
<i>B. pinnipedialis</i>	<i>Brucella pinnipedialis</i>
<i>B. suis</i>	<i>Brucella suis</i>
<i>B. vulpus</i>	<i>Brucella vulpus</i>
BBAT	test s pufovaným brucelovým antigenem
BCV	vakuoly obsahující brucelu
cELISA	kompetitivní ELISA
CFT/RKV	komplement fixační test
CMP	chloramfenikol
CTR	ceftriaxon
DC	dendritické buňky
DOX	doxyciklin
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ELISA	enzymová imunoanalýza na imunosorbentech
FPA	fluorescenční polarizační imunoanalýza
FRET	test fluorescenčního rezonančního přenosu energie
G-	gramnegativní
G+	grampozitivní
GEN	gentamycin
GIT	gastrointestinální trakt
iELISA	nepřímé metody ELISA
IFA	nepřímému stanovení fluorescenčních protilátek
IFNA-γ	interferon gama

LFA	Lateral flow assays
LPS	lipopolysacharid
MD-2	myeloidní diferenciační faktor 2
MPS	mononukleárního fagocytárního systému
MRT	mléčný kroužkový test
NH	hapténový test
OIE	Světová organizace pro zdraví zvířat
PCR	Diagnostika založena na polymerázové řetězové reakci
PEN	penicilin
PRR	receptory pro rozpoznávání vzorů
R-LPS	drsňý lipopolysacharid
RBT	Rose Bengal test
Rha4NFo	4,6-dideoxy-4-formamido- α -d-mannopyranózou
RIF	rifampicin
SAT	standardní aglutinační test
S-LPS	hladký lipopolysacharid
STR	streptomycin
TET	tetracyklin
TLR	Toll-like
TLR4	Toll-like receptor 4
TRI	trimetoprimu
UV	ultrafialové záření
WHO	Světová zdravotnická organizace

TERMINOLOGIE

absces	ohraničená dutina vyplněná hnisem
aerobní	proces nebo prostředí s dostatečným množstvím O ₂
aerosol	heterogenní směs malých pevných nebo kapalných částic v plnu
agonista	látka, která připomíná svým působením přirozenou látku (např. hormon nebo neurotransmitter) tím, že se váže na specifický buněčný receptor a aktivuje jeho funkci
alantochorion	složený plodový obal obratlovců
anaeroby	bakterie žijící za nepřítomnosti kyslíku
anafylatoxin	látka či sloučenina schopna vyvolat anafylaxi (alergickou reakci)
atenuovaný	oslabené kmeny bakterie/virů používané k očkování „živá vakcína“
bioterrorismus	forma terorismu, která jako prostředek nátlaku nebo ozbrojených akcí využívá biologické zbraně
burzitida	zánětlivé postižení tíhových váčků v okolí kloubů a úponů šlach
discitida	zánět na meziobratlové ploténky nebo místa na disku
endometritida	zánět sliznice děložní
epididymitida	zánět nadvarlete
eradikace	úplné vymýcení choroby včetně původců onemocnění z populace
exsudát	zánětlivý extravaskulární výpotek
indurace	zatvrdnutí tkáně zmnožením vaziva
fluktuující léze	nestálé poškození, postižení, porucha orgánu či tkáň
hepatosplenomegalie	zvětšení jater a sleziny
hostitelská specifita	rozmezí druhů, které je parazit schopen využít jako hostitele
hygrom	dutina vyplněná tekutinou
<i>in vitro</i>	mimo živé tělo, ve zkumavce
<i>in vivo</i>	v živém nebo na živém těle, zaživa

interference	vzájemné ovlivňování, prolínání nebo střetávání jevů či hmoty
intermitentní	střídavý, přerušovaný, občasný, nespojitý, periodický, vracející se, přerývaný
konjugát	bílkovina s navázaným enzymem
léze	oblast v orgánu či tkáni, která je narušená či poškozena v důsledku zranění či onemocnění
lokus	genetický termín označující přesné místo na chromozomu, na němž se vyskytuje příslušný gen či polymorfismus
lumbální punkce	výkon umožňující odběr mozkomíšního moku z páteřního kanálu
lymfadenopatie	označení pro jaké onemocnění lymfatických uzlin, žláz, které se nacházejí na krku, v podpaží, na hrudi v tříslech a na břiše
mastitida	zánět mléčné žlázy
meningitida	zánět mozkových blan
nechutenství	nezájem pacienta o potravu, její odmítání, které může vyvrcholit až odporem k jídlu
nika	souhrn životních podmínek umožňující životaschopnou existenci určitého druhu organismu
opsonizace	proces, při kterém jsou "označeny" buňky nebo částice určené k fagocytóze
orchitida	zánět varlete
osteomyelitida	zánět kostní dřene
parestezie	porucha smyslového vnímání, která se projevuje brněním, mravenčením, svěděním či pálením kůže
patogen/etiologické agens	biologický faktor/činitel schopný zapříčinit onemocnění hostitele
placentitida	zánět placenty
pneumonitida	zánět vmezeřené plicní tkáně
predilekce	preferování jedné strany
recidiva	znovuobjevení příznaků/nemoci již potlačených, které byli považovány za vyléčené
rekonvalescence	postupné obnovování sil po nemoci

relaps	opětovné objevení příznaků/nemoci, která byla již v klidovém stadiu
rezistence	odolnost určitého organismu vůči daným podmínkám
sekvestrace	uvolnění, odloučení odumřelé tkáně od živé tkáně
spondylitida	zánět obratle
spondylodiscitida	infekce páteře, nejčastěji vznikající hematogenní cestou
subdurální empyém	nahromadění hnisu mezi tvrdou plenou mozkovou a arachnoideou
subferbrilie	zvýšení tělesné teploty na 37 až 38 °C
tenosynovitida	zánět synoviální výstelky a šlachové pochvy
tropismus	afinita či pohyb k něčemu, zaměřenost k určité struktuře, určitému orgánu
ulcerace	tvorba vředu
undulantní horečka	vlnovitá horečka, kdy dochází k plynulému a pozvolnému stoupání a klesání naměřených hodnot tělesné teploty v průběhu několika dní
vertigo	závrať
vezikula	dutina vyplněná čirým obsahem
virulence	míra patogenity nějakého mikroorganismu
zoonóza	onemocnění nebo infekce, které jsou přirozeně přenosné přímo nebo nepřímo mezi zvířaty a lidmi

ÚVOD

Česká republika se již od roku 1964 řadí mezi země v nichž brucelóza nepředstavuje aktuální riziko pro zdraví zvířat a lidí, lze ji tedy označit, jako zemi prostou nákazy. I přestože, se onemocnění na našem území v současné době nevyskytuje, v méně pokročilých zemí je možné jej zaznamenat s velkým nárůstem nakažených. U nás se vyskytuje pouze v ojedinělých případech, a to formou importované nákazy. Proto je nesmírně důležité, aby se dané onemocnění neopomíjelo, a dbalo se především na zvýšenou opatrnost při manipulaci se zvířaty a jejich biologickým materiálem, či jiným biologickým materiálem.

Brucelóza je v České republice sledována a monitorována veterinárním dozorem. Ten zajišťuje vyšetření všech zvířat určených k chovu či plemenitbě, která byla importována ze třetích zemí, nebo zemí Evropské unie, které se neřadí mezi země prosté brucelózy. Jaké testy, a jak dané onemocnění vyšetřovat v našem státě určují Metodiky kontroly zdraví.

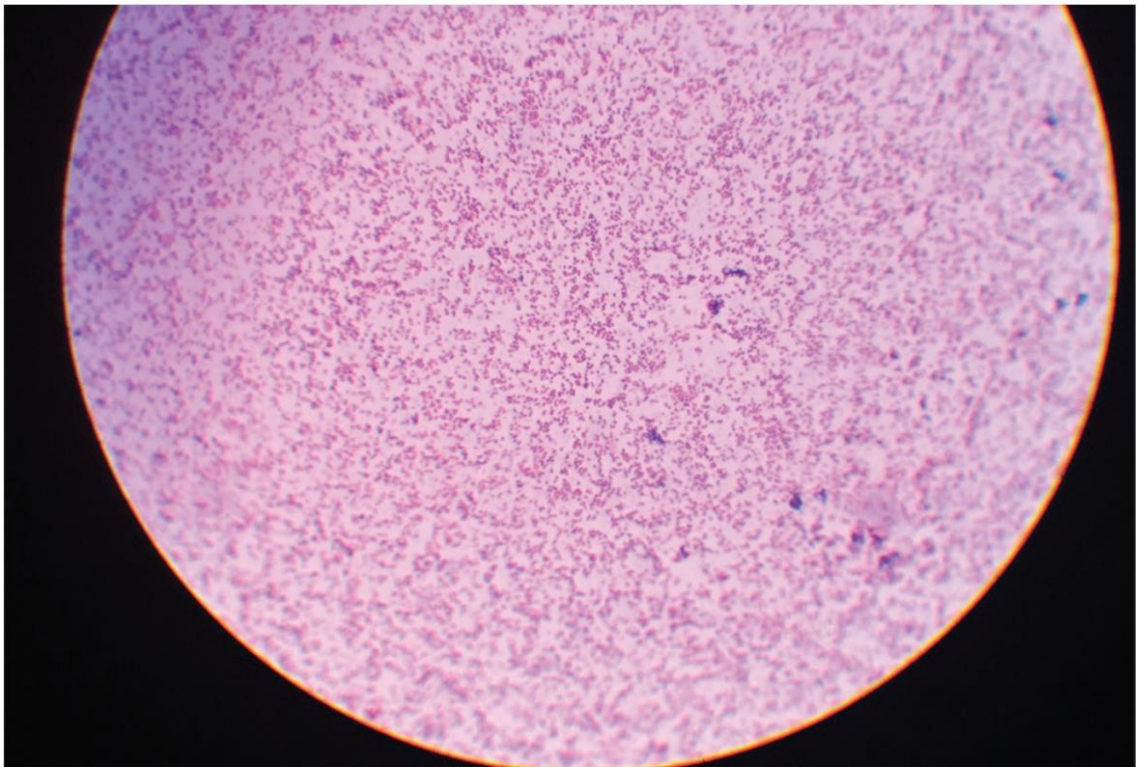
Tato bakalářská práce se zaměřuje na jednoho z hlavních původců této zoonózy, a to na *Brucella abortus*. Soustředí se nejen na taxonomické zařazení patogenu, základní charakteristiku, ale i na faktory virulence, kterými bakterie působí na organismus zasaženého jedince. Detailně se také zaměřuje na vstupní brány, které vedou k nákaze zvířete, klinické projevy u daného druhu a pohlaví zvířete. Následně se věnuje možnostem přenosu na člověka a klinickými symptomy. Zmíněny jsou též možnosti, vhodné pro diagnostiku dané bakterie. V neposlední řadě se práce zabývá možnostmi terapie a prevence. Na závěr je zde zaznamenána současná situace výskytu na našem území, spolu s kazuistikou posledních hlášených případů brucelózy u člověka za posledních deset let.

1 Rod *Brucella*

1.1 Taxonomie rodu *Brucella*

Rod *Brucella* se řadí do čeledi *Brucellaceae*, řádu *Rhizobiales*. Bakterie tohoto rodu jsou schopné infikovat širokou škálu savců od hlodavců, přes delfíny, hospodářská zvířata až po člověka (Rajendhran, 2021; Leclercq *et al.*, 2020).

Po několik let bylo do rodu *Brucella* řazeno pouze šest klasických druhů, ovšem v posledních letech bylo ze suchozemských a mořských savců izolováno dalších šest druhů. Dosud bylo rozpoznáno dvanáct druhů *Brucella* z nichž každý má svou hostitelskou specifitu (tabulka č.1), i přesto, že mohou infikovat i jiná zvířata. Zástupci rodu *Brucella*, které v současné době známe jsou *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. canis*, *B. neotomae*, *B. ceti*, *B. pinnipedialis*, *B. microti*, *B. inopinata*, *B. papionis* a *B. vulpis*. Z těchto zástupců jsou pro člověka, z hlediska zoonózy, nejpodstatnější *B. abortus*, dále *B. melitensis*, *B. canis* a *B. suis* (Rajendhran, 2021; Leclercq *et al.*, 2020; Liu *et al.*, 2020; Zurovac Sapundzic *et al.*, 2022).



Obrázek 1 *Brucella* po obarvení dle Grama (převzato z Anantha *et al.*, 2019).

Tabulka 1 Klasifikace druhů *Brucella* v závislosti na hostiteli a rozdílu v patogenitě (Upraveno dle Sabra et al., 2021).

Zástupce rodu <i>Brucella</i>	Vnímaví jedinec	Výskyt
<i>B. abortus</i>	kráva, jak, velbloud, buvol, kojot	Celosvětově rozšířená
<i>B. melitensis</i>	ovce, koza, velbloud	Asie, Latinská Amerika, Středomoří a některé státy jižní Evropy
<i>B. suis</i>	prase, sob	USA, jihovýchodní Asie, Jižní Amerika
<i>B. canis</i>	Pes	Celosvětově rozšířená
<i>B. ovis</i>	Ovce	Celosvětově rozšířená
<i>B. neotomae</i>	Hlodavci	Izolován z lesních krys v Severní Americe
<i>B. pinnipediae</i>	ploutvonožci – mrož, tuleň, lachtan	Sporadický lidský patogen
<i>B. cetaceae</i>	izolována od kytovců (delfín, velryba, sviňucha)	Sporadický lidský patogen
<i>B. inopinata</i>	není znám	Případ hlášený u abscesu lidského prsu (rána po implantátu)
<i>B. microti</i>	Hraboš	Případ během epizootie v České republice (2001)
<i>B. papionis</i>	Pavián	Případ 13letého paviána odchyceného v Tanzanii
<i>B. vulpis</i>	liška obecná	Případ 2 lišek červených v Rakousku

1.2 Základní charakteristika rodu *Brucella*

Rod *Brucella* patří mezi gramnegativní fakultativně intracelulární, aerobní, nesporulující bakterie. Tyto bakterie se vyskytují ve formě krátkých tyčinek jejichž velikost se pohybuje v rozmezí 0,5 – 0,7 x 0,6 – 1,5 µm. Bakterie rodu *Brucella* jsou uspořádány individuálně, zřídka se vyskytují v párech, malých skupinách nebo jako krátké řetízky. Jsou nepohyblivé, netvoří bičíky a jejich pomnožení probíhá pomalu za optimální teploty 37 °C a pH 6,6 – 7,4. *Brucella* spp. jsou bakterie, které pro svůj růst vyžadují bohaté kultivační medium, aby byl podpořen adekvátní růst. Při teplotě v rozmezí 25 až 40 °C rostou na Brucella agaru, Tryptozovém agaru, MacConkey agaru, Masopeptonovém agaru a na krevním agaru. Kolonie na kultivačním médiu jsou malé, vypouklé s celým okrajem, existují i odchylky, které závisí na kultivačním médiu a kmenu bakterie (Rajendhran, 2021; Sabra *et al.*, 2021; Saavedra *et al.*, 2019; Coloma-Rivero *et al.*, 2022; Zurovac Sapundzic *et al.*, 2022; Kumaresan *et al.*, 2021).

Jednotlivé druhy rodu *Brucella* jsou superoxididismutáza pozitivní a kataláza pozitivní, zároveň většina z nich je též oxidáza pozitivní. I přes to, že se jedná o aerobní bakterie tak mnohé druhy vyžadují ke svému růstu přidavek CO₂. Metabolismus rodu *Brucella* je převážně oxidativní, závislí především na nízkomolekulárních zdrojích uhlíku, kterými jsou sacharidy a aminokyseliny. Díky této skutečnosti lze pro identifikaci kmenů využít jejich oxidační aktivitu vůči různým aminokyselinám a sacharidům (tabulka č.2) (Saavedra *et al.*, 2019; Kumaresan *et al.*, 2021).

Identifikace fenotypu pomocí biochemických testů nebyla průkazná pro všechny druhy rodu *Brucella* pro jejich vysokou podobnost. Jelikož antigenní rozdíly mezi *Brucella* spp. jsou nepatrné, je rozlišení jednotlivých druhů založeno přibližně na 25 biologických a fyziologických charakteristikách (fenotyp). Klasická mikrobiologická identifikace se provádí na základě produkce H₂S, nároků na CO₂, citlivosti na barviva (thionin a fuchsin), ureázové aktivity (tabulka č.2), aglutinaci s monospecifickými séry A a M, disociačních testů s krystalovou violetí a trypaflavinem a aglutinaci s hrubým brucelovým antisérem. Za poslední desetiletí bylo v diagnostických laboratořích vyvinuto a zavedeno několik metod založených na PCR, které umožňují prokázat čisté kultury brucel a odlišit jednotlivé druhy a biovary brucel, jakož i vakcinační kmeny (Saavedra *et al.*, 2019; Ali *et al.*, 2019; Kurmanov *et al.*, 2022; Tekle *et al.*, 2019).

Tabulka 2 Ureázová aktivita a oxidační metabolismus jednotlivých druhů *Brucella*

+ pozitivní, - negativní, V proměnlivý (upraveno dle Saavedra et al., 2019).

		<i>B. melitensis</i>	<i>B. abortus</i>	<i>B. canis</i>	<i>B. neotomae</i>	<i>B. suis</i>	<i>B. ovis</i>
Aminokyseliny	L-Alanin	+	+	V	V	V	V
	L-Asparagin	+	+	-	+	V	+
	L-Glutamát	+	+	+	+	V	+
	L-Arginin	-	-	+	-	+	-
	DL-Citrulin	-	-	+	-	+	-
	L-Lysin	-	-	+	-	V	-
	DL-Ornitin	-	-	+	-	+	-
Sacharidy	L-Arabinóza	-	+	V	+	V	-
	D-galaktóza	-	+	V	+	V	-
	D-ribóza	-	+	+	V	+	-
	D-xylóza	-	V	-	-	-	-
	D-glukóza	+	+	+	+	+	-
	Isoerytritol	+	+	V	+	+	-
Ureázová aktivita		1 hodina	1 hodina	5 minut	1 hodina	5 minut	7 dní

1.3 *Brucella abortus*

Přes to, že se rod *Brucella* řadí mezi aerobní bakterie, existují i druhy které pro svůj optimální růst vyžadují 5-10 % CO₂. Mezi tyto druhy se právě řadí *B. abortus*, která pro svůj růst vyžaduje 10 % CO₂ (Islam et al., 2019; Duncombe, 2020).

B. abortus je významný původcem brucelózy u skotu, bizonu a buvolů. Jedná se o fakultativně intracelulární patogen mající osm biovarů a to 1 – 7 a biovar 9. *B. abortus* je jedním z významných původců brucelózy u lidí čím se řadí mezi bakterie způsobující zoonózy. *B. abortus* může být na člověka přenesena přímým kontaktem s infikovaným zvířetem, konzumací masa z nemocných zvířat či konzumací mléčných výrobků, které nebyly podrobeny pasterizaci (Saavedra et al., 2019; Islam et al., 2019;).

2 Faktory virulence

B. abortus může infikovat mnoho typů buněk např. epitelové buňky, makrofágy, dendritické buňky a placentární trofoblasty. Bakterie se nachází a množí uvnitř hostitelských buněk, ve které tvoří vakuoly obsahující brucelu (BCV). Tento rod neprodukuje žádné běžné faktory virulence, mezi které se řadí kapsidy, cytolyziny, exotoxiny, pili nebo fimbrie, vylučované proteázy, bičíky, fágově kódované toxiny. Mezi faktory virulence, které jsou u *Brucella* spp. zaznamenány patří lipopolysacharid, erytritol, ureázy, reduktázy oxidu dusnatého, katalázy, superoxid dismutázy, cyklických-1-2-glukanů a cytochromoxidázy (Rajendhran J., 2021; Abdulkaliq *et al.*, 2022; Adem a Duguma, 2020).

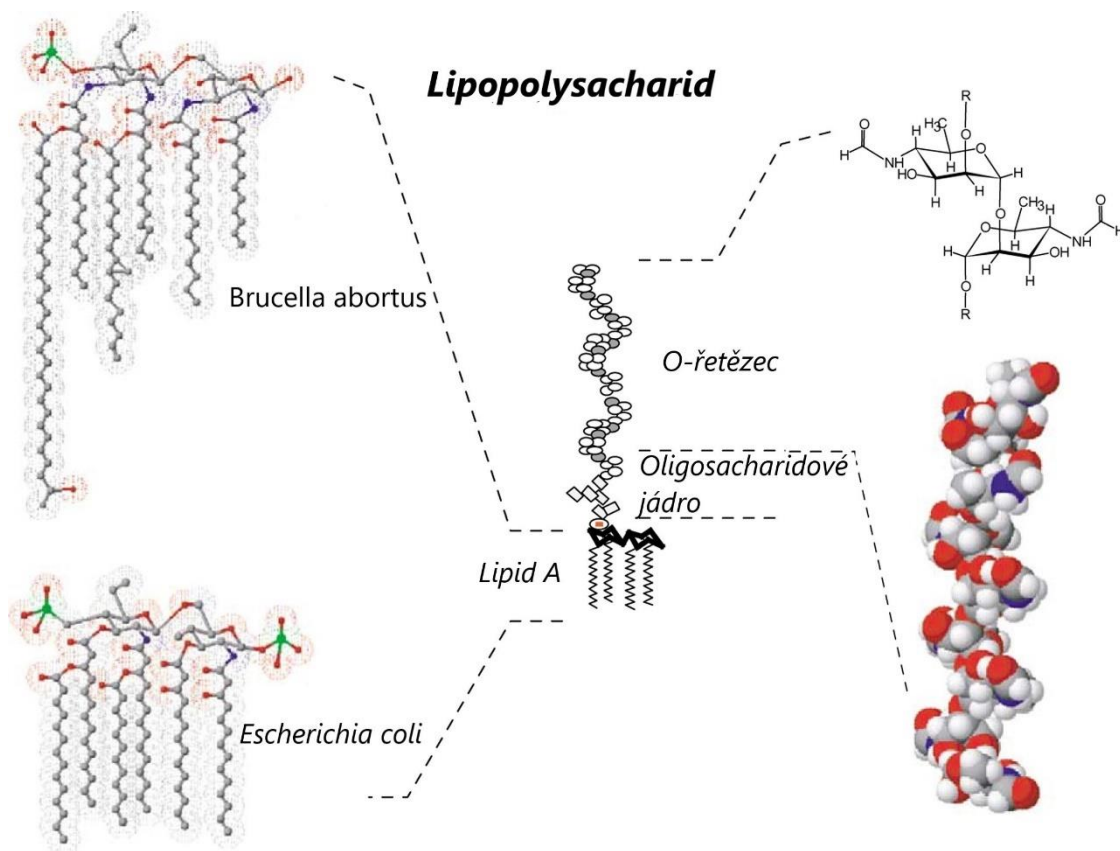
2.1 Lipopolysacharid

Jako většina gramnegativních bakterií obsahuje vnější membrána brucel LPS. LPS je důležitým faktorem virulence, přičemž hraje klíčovou funkci pro přežívání tohoto patogenu uvnitř hostitele a při úpravě imunitních reakcí, což umožňuje přetrvávání infekce (Pellegrini *et al.*, 2022).

Rod *Brucella* se vyznačuje dvojí morfologií kolonií (hladkou a drsnou). Morfologicky hladké kmeny rodu *Brucella* obsahují hladký LPS s O-řetězcem, jsou označovány jako S-LPS a jsou mezi ně řazeny *B. abortus*, *B. melitensis* a *B. suis*. Morfologicky drsné druhy mají nedostatek LPS s O-řetězcem, jsou označovány jako R-LPS a jsou mezi ně řazeny *B. ovis* a *B. canis*. Pro morfologii brucel obecně platí že druhy s drsnou morfologií vykazují sníženou virulenci nebo jsou oslabené, s výjimkou druhů *B. ovis* a *B. canis*. Tyto dva druhy jsou přirozeně drsné a virulentní. Oproti LPS jiných G- *enterobakterií*, jako jsou *Salmonella* spp. či *Escherichia coli*, vykazuje LPS brucel odlišné fyzikálně-chemické vlastnosti, což má za následek odlišné biologické vlastnosti. Například nízkou endotoxicitu, nízkou schopnost navodit imunitní odpověď a zvýšenou odolnost vůči degradaci makrofágy. Tyto vlastnosti mají *B. abortus* a *B. melitensis*, které nejsou schopny aktivovat makrofágy ani komplement, přičemž jejich endotoxická aktivita je extrémně snižena (Abdulkaliq *et al.*, 2022; Hull a Schumaker, 2018; López-Santiago *et al.*, 2019; Pellegrini *et al.*, 2022).

V LPS *Brucella* spp. jsou tři hlavní složky a to lipid A, oligosacharidové jádro a hydrofilní polysacharidový řetězec složený z O-antigenu (O-řetězec), který je dominantní imunitní složkou. Lipid-A *B. abortus* má kostru tvořenou z diaminoglukózy (namísto glukosaminem) s delšími acylovými skupinami (C18-C19, C28 spíše než C12 a C14), které jsou s jádrem spojeny pouze amidovými vazbami namísto amidovými a esterovými vazbami (obrázek č.2).

Lipid A působí na vrozenou imunitu a také na buňky, jako jsou monocyty nebo makrofágy. (Hasan *et al.*, 2021; Amjadi *et al.*, 2019; López-Santiago *et al.*, 2019; Afshari *et al.*, 2020).



Obrázek 2 Schéma struktury LPS *Brucella abortus*

Lipid A *B. abortus* má diaminoglukosovou kostru provázanou amidovými vazbami s dlouhými acylovými skupinami (C18-C19, C28), tím se liší od klasického LPS *E. coli*. O-řetězec je *N*-formyl perosaminový homopolymer (nahore vpravo). Oligosacharidové jádro je tvořeno 3-deoxy-*D*-manno-2 oktulosonovou kyselinou, mannosou a glukosaminem (dolní část vpravo) (upraveno dle Lapaque N. *et al.*, 2005).

Specifický O-řetězec LPS brucel umožňuje bakteriím proniknout do hostitelské buňky prostřednictvím interakce s lipidovými rafty na povrchu. Lipidové rafty jsou složeny z cholesterolu a glykosfingolipidů, které podporují biologické procesy související s membránou, jako je transmembránová signalizace a fúze membrán. Při interakci mezi brucelami a lipidovými rafty hostitelské buňky je podstatnou molekulou LPS, který může zabránit komplement zprostředkované bakteriální lýzi a apoptóze hostitelské buňky. O-řetězec brucel taktéž brání ukládání komplementu a aktivaci lektinové cesty komplementu (Pellegrini *et al.*, 2022; Jiao *et al.*, 2021).

Vrozená imunita rozeznává mikroorganismy podle charakteristických molekul, jako je LPS lipid A (bioaktivní část LPS označována též jako „endotoxin“), který prostřednictvím receptorů Toll-like (TLR) indukuje prozánětlivé molekuly a malé GTPázy ze skupiny p47, jež

se podílejí na kontrole intracelulárních patogenů. LPS u *B. abortus* vykazuje nízkou toxicitu a bylo předpokládáno, že jeho atypická struktura zpomaluje imunitní odpověď hostitele, čímž podporuje vznik chronického onemocnění. Lipid A bakterie rodu *Brucella* je disacharid 2,3-diaminoglukózy nahrazený C16, C18, C28 a dalšími velmi dlouhými acylovými řetězci. Tato specifická struktura je nedostatečným agonistou TLR4/ myeloidní diferenciační faktor 2 (MD-2), který brání rozpoznání receptory pro rozpoznávání vzorů (PRR) a hraje zásadní roli během infekce. Studie ukázaly, že LPS bakterie rodu *Brucella* nevyvolával zánětlivé reakce u makrofágů a dendritických buněk (DC), tedy dvou nejdůležitějších strážců imunitního systému, což bylo přisuzováno jeho špatnému rozpoznávání pomocí TLR4/MD-2, který je obecně považován za hlavní receptorový komplex pro vázání a signalizaci LPS (Jiao *et al.*, 2021; Pellegrini *et al.*, 2022; López-Santiago *et al.*, 2019; Roop *et al.*, 2021).

Rozvětvení pěti cukrů v jádru LPS brucel, které spojuje lipid A s O-řetězcem, je syntetizováno mannosyltransferázou. Bylo prokázáno, že jádro tvoří faktor virulence, jelikož mutanty wadC mannosyltransferázy zvyšují interakci s MD-2. To má za následek vyšší produkci cytokinů. Oproti tomu ztrátou O-řetězce se vytvářejí oslabené linie, které umožňují infikované buňce přenést vezikulu obsahující brucelu do lysozomu, kde je bakterie zlikvidována. *B. abortus* je schopna se vyhnout tomuto mechanismu a tak zabránit intracelulární smrti. To naznačuje, že postranní řetězec O LPS se podílí na transportu vezikuly obsahující brucelu mimo lysozom. Kromě toho LPS *B. abortus* brání aktivaci komplementu, čímž se také vyhýbá opsonizaci subkomponentem C3b. Toto snižuje rozpoznávání fagocytujícími buňkami prostřednictvím receptorů pro komplement. Navíc zabraňuje tvorbě anafylatoxinů C3a a C5a, což brání následné prozánětlivé reakci (Pellegrini *et al.*, 2022; López-Santiago *et al.*, 2019).

2.1.1 Antigenní determinanty

U buněčných stěn brucel bylo zjištěno, že obsahují unikátní LPS s O-antigenem tvořeným neobvyklým cukrem, 4,6-dideoxy-4-formamido- α -d-mannopyranózou (Rha4NFo), ve formě dvou odlišných řetězců, známých jako antigen A a antigen M. Antigen A je tvořen pouze α -1,2 navázanou skupinou Rha4NFo, která tvoří dlouhou vnitřní sekvenci O-antigenů, zatímco kratší antigen M má za každými čtyřmi jednotkami α -1,2 navázané d-Rha4NFo, které tvoří čepičku O-antigenů. O-antigeny brucel jsou strukturně jedinečné, a to způsobuje jejich složitou sérologii. Jelikož protilátky proti O-antigenům rodu *Brucella* jsou užitečné pro diagnostiku infekcí, mělo by se při tvorbě ideálních kandidátů na vakcíny vycházet z ochranného epitopu,

který by nenarušoval diagnostiku. V současné době jsou k dispozici celobuněčné vakcíny, které vyvolávají tvorbu protilátek anti-A a M. Proto nelze infikovaná zvířata odlišit od vakcinovaných, neboť obě produkují protilátky specifické pro A i M. Antigen A je hlavním antigenem u *B. abortus* a *B. suis*, zatímco antigen M převažuje u *B. melitensis*. Tyto antigenní struktury představují hlavní faktory virulence a jsou také cílem mnoha imunologických testů (Rohokale a Guo, 2023; Khurana *et al.*, 2021; Hao *et al.*, 2021; Duncombe, 2020; Priyanka a Sk, 2019).

2.2 Erythritol

Erythritol je čtyřuhlíkový cukerný alkohol, který je metabolizován a následně slouží jako zdroj energie a uhlíku pro *B. abortus* a další kmeny rodu *Brucella*. *B. abortus* má v posledním trimestru těhotenství silný tropismus k děloze, což je převážně způsobeno vysokou koncentrací erythritolu a steroidních hormonů, které jsou produkovány placentou. Tento cukerný alkohol je brucelami dále využíván jako stimulant růstu, který upřednostňuje před glukózou. Při uvolňování erythritolu z placenty do oběhového systému dochází k přesunu brucel z lymfatických uzlin a k jejich migraci do reprodukčních tkání. Jako nové centrum infekce se stává oblast choriových klků, ty se na fetální straně placenty rozšiřují do kotyledonů. Zde se brucela může pomnožit do velice vysokého množství (10^{13} bakterií/gram tkáně) a vyvolat průnik zánětlivých buněk, nekrózu trofoblastu, zánět cév a ulceraci alantochorionu. V konečném důsledku dochází k narušení metabolické výměny mezi matkou a plodem, což má za následek ztrátu plodu (abort) (Roop *et al.*, 2021; Hull a Schumaker, 2018; Xiao *et al.*, 2022; Huy *et al.*, 2022).

3 Patogeneze

K přenosu brucel dochází buď požitím, přes spojivku, vdechnutím a přes poraněnou kůži. Po průniku *B. abortus* jsou bakteriální buňky schopny přežít uvnitř nefagocytujících nebo fagocytujících buněk hostitele. Mezi hlavní cílové buňky této bakterie patří makrofágy, trofoblastické a dendritické buňky. Uvnitř makrofágů a dendritických buněk se patogen vyhýbá imunitní odpovědi hostitele, díky čemuž se může množit a šířit do dalších tkání s využitím buněčného tropismu. Pokud se brucela vyskytuje u samic, které v průběhu infekce zabřeznou, dostanou se bakterie do trofoblastu a mléčné žlázy, ve kterých se velmi rychle množí a vyvolávají potrat. V případě nebřezích zvířat se bakterie dále množí a prostřednictvím různých tělesných exkretů a sekretů se vylučují do prostředí. Bakterie jsou často izolovány z mléka, lymfatických uzlin, sleziny a dělohy. Nicméně infikované mohou být i klouby, kosti, mozek a oči. U samců jsou bakterie běžně izolovány z pohlavních orgánů a přidružených lymfatických uzlin. Během časné akutní fáze se do spermatu vylučuje značné množství bakterií, ale později v chronické fázi vylučování postupně klesá. K vylučování bakterií dochází pravidelně po mnoho let nebo může být přerušované. U samic se brucely dostávají prostřednictvím hematogenní cesty do placenty a následně do plodu. V alantoické tekutině u samic dochází ke stimulaci růstu brucel, čímž se děloha a reprodukční trakt těhotné samice stávají místem bakteriální predilekce. Za důležitou příčinu potratů u zvířat se považuje zvýšená hladina erythritolu v placentě a plodové vodě, který se tvoří od pátého měsíce březosti (Pal *et al.*, 2020; Khurana *et al.*, 2021; Priyanka a Sk, 2019; Mustafa *et al.*, 2023; Sarma a Singh, 2022).

Erytrofagocytující trofoblasty se koncentrují v placentomu v blízkosti chorioalantoidní membrány, což vede k prasknutí buněk a následnému vzniku vředů. K potratu tak dochází v důsledku poškození způsobeného bakteriemi na placentě a také v důsledkem hormonálních změn vyvolaných stresem. Protože jsou brucely intracelulární patogeny, schopné přežít ve fagocytujících buňkách pomocí různých mechanismů k oslabení imunitního systému hostitele, mohou v hostiteli přecházet z chronické do akutní formy a do formy přenašeče (Khurana *et al.*, 2021; Mustafa *et al.*, 2023).

3.1 Brucelóza zvířat

K nákaze zvířete brucelózou může dojít několika různými cestami. Nejčastěji k nákaze dojde přes gastrointestinální trakt (GIT), po perorálním požití bakterie z placenty, plodu a vaginálního či děložního výtoky. Dále se do těla bakterie dostává přes spojivku nebo přes

dýchací ústrojí po vdechnutí patogenu (Amjadi, 2019; Hull a Schumaker, 2018; Moreno a Barquero-Calvo, 2020; Meng, Zhuqing, 2020).

U brucelózy jejíž původcem je *B. abortus* je inkubační doba různě dlouhá a mají na ní vliv určité faktory. Délka inkubační doby závisí na stáří a pohlaví jedince, stádiu březosti, virulenci infikujícího kmene, dávce a způsobu nákazy. Inkubační doba se pohybuje v rozmezí dvou týdnů do několika měsíců, současně je nepřímě úměrná stádiu březosti, neboť k potratu obvykle dochází v pozdní fázi březosti. Jako je ovlivněna inkubační doba onemocnění tak i klinické projevy jsou danými faktory do značné míry ovlivněny. Obecně lze říci, že u brucelózy koz (*B. melitensis*), brucelózy prasat (*B. suis*) a brucelózy skotu (*B. abortus*) se mohou u zvířat vyskytovat mastitida, pyrexie, slabé potomstvo a spontánní potraty (Hull a Schumaker, 2018; Khurana *et al.*, 2021; Amjadi, 2019; Moreno a Barquero-Calvo, 2020; Aliyev *et al.*, 2022; Tulu, 2022).

V porovnání s lidskou brucelózou je charakteristickým znakem infekce spontánní potrat u nakažených přežvýkavců. Jedním z rozdílů, kterými se jednotlivé druhy kontrastně liší, je přítomnost sacharidu erythritolu, který hraje významnou roli v tomto klinickém projevu u zvířat. Erythritol, produkováný placentou březích zvířat má v konečném důsledku vliv na metabolickou výměnu mezi matkou a plodem, která vede až k potratu. Placentární, fetální tkáň a související tekutiny vyloučené při potratech jsou hlavním zdrojem přenosu bakterie ve zvířecí populaci. Samotné bakterie mohou v prostředí přežívat až jeden rok v závislosti na příznivých podmínkách např. vlhkost, teplota, složení půdy, působení ultrafialového záření (UV), atd. Pokud u jedince nedojde k abortu může nastat vertikální přenos na potomstvo a infekce tak nadále přetrvává. Mléčné žlázy jsou cílovým orgánem brucel, přes které je možno prostřednictvím mleziva a mléka vylučovat životaschopné bakteriální buňky. Tato cesta je klíčová při brucelóze člověka v případě konzumace nepasterizovaných mléčných výrobků z infikovaného jedince (Hull a Schumaker, 2018; Mustafa *et al.*, 2023; Ferrero *et al.*, 2020; Sarma a Singh, 2022).

3.1.1 Klinické projevy u samic

Délka březosti skotu je přibližně devět měsíců. U skotu infikovaného bakterií *B. abortus* je hlavním projevem infekce selhání reprodukce, které se projeví spontánním potratem mezi pátým a osmým měsícem březosti. K potratu u infikovaného skotu dochází obvykle jen v první březosti po infekci, ovšem jedinci mohou zůstat infikováni po celý život. U zvířat, která nejsou březí, může být po prvním potratu onemocnění asymptomatické. Pokud u jedince nedojde

k abortu může dojít k narození slabých potomků, kteří zůstávají ve stádě jako přenašeči (Lindahl *et al.*, 2019; Hull a Schumaker, 2018; Khurana *et al.*, 2021; Priyanka a Sk, 2019;).

Významným rysem onemocnění je mastitida. Mléčná žláza i přídatné lymfatické uzliny jsou běžnou nikou pro množení brucel, které se takto vyhýbají imunitní obraně. Bakterie rodu *Brucella* jsou vylučovány do mléka infikovaných krav v období laktace. To představuje sekundární cestu přenosu na vnímavá telata. Nicméně tato sekundární cesta infekce je nejdůležitější zoonotickou cestou přenosu na člověka. U nakažených jedinců může být dále zaznamenána snížená plodnost, endometritida, zadržení plodových obalů a hygromy kloubů (Hull a Schumaker, 2018; Khurana *et al.*, 2021; Sarma a Singh, 2022).

3.1.2 Klinické projevy u samců

V případě akutní infekce býků jsou klinickými projevy orchitida a epididymitida jedná-li se o chronický průběh infekce může se u zasaženého jedince vyskytnout hygrom. Po akutní zánětlivé fázi následuje v semenných váčcích chronická fáze se značnou fibrinoidní indurací. V těchto místech vznikají oblasti suché nekrózy, které se obalují fibrinózní tkání, jež se nakonec smršťuje, takže varlata jsou často menší než normálně. U některých případů může docházet ke změkčení s tvorbou měkké fluktuující léze, která obsahuje řídký hnisavý exsudát (Khurana *et al.*, 2021; Priyanka a Sk, 2019; Mustafa *et al.*, 2023; De Macedo *et al.*, 2019).

Ačkoli *B. abortus* ovlivňuje mužské pohlavní ústrojí, předpokládá se, že nakažené sperma při přirozené plemenitbě není dostatečnou cestou přenosu. Ovšem u býčího spermatu, které je využíváno při inseminaci, existuje výrazné riziko díky nitroděložnímu zavedení spermatu v porovnání s vaginální aplikací při přirozené plemenitbě (Hull a Schumaker, 2018; Meng a Zhuqing, 2020; Pinn-Woodcock *et al.*, 2023).

3.1.3 Klinické projevy u telat

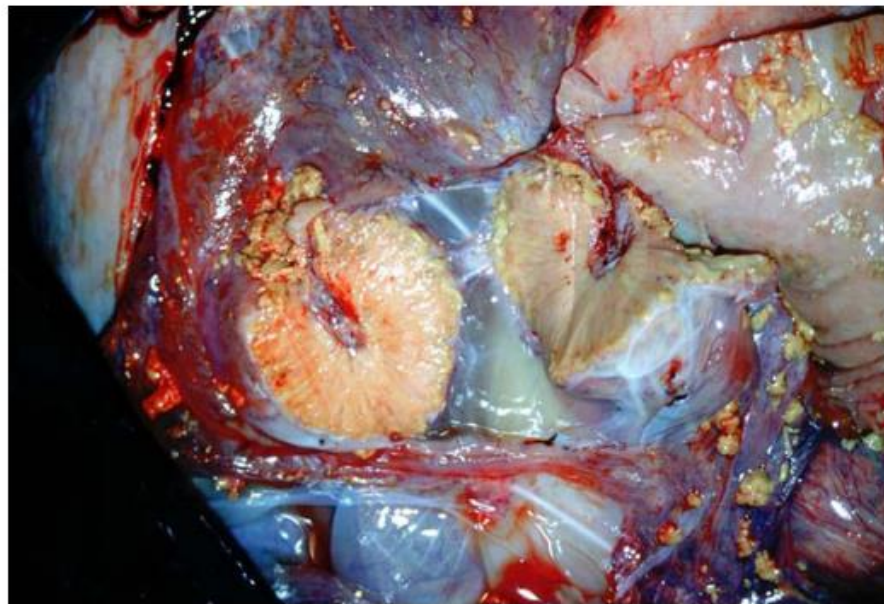
Telata narozená v termínu mohou velmi brzy po narození uhynout. U novorozených a potracených telat se objevuje fibrinózní pleuritida spojená s intersticiální pneumonií. Telata se také mohou nakazit v raném období vývoje, ale až do dospělosti se u nich neprojeví žádné příznaky nemoci (Khurana *et al.*, 2021; Priyanka a Sk, 2019; Mustafa *et al.*, 2023).

3.2 Patologie

Při infekcích způsobených brucelou se u zvířat běžně vyskytují granulomatózní zánětlivé léze, které jsou často patrné v lymfatických tkáních a orgánech s hlavním zapojením

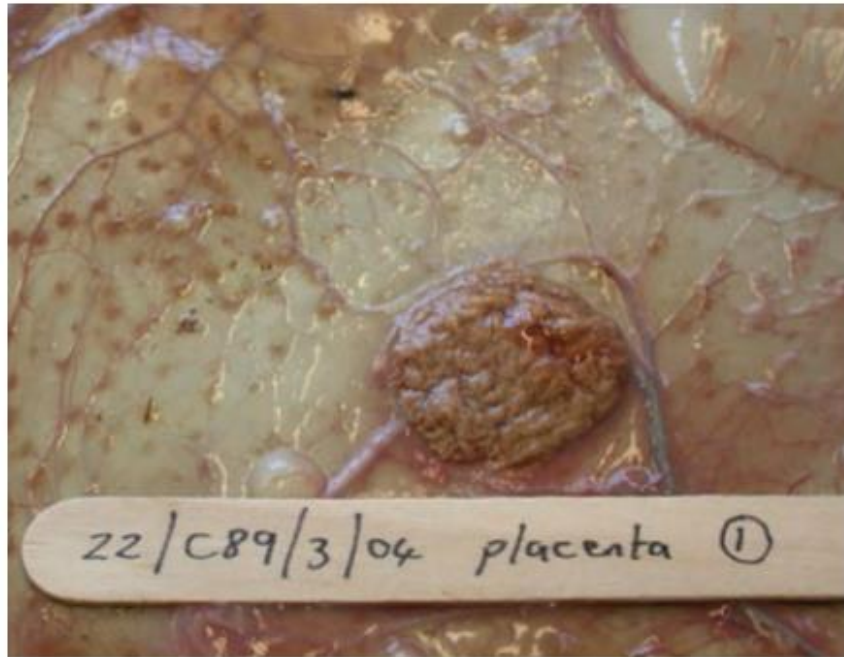
mononukleárního fagocytárního systému (MPS). Trvalé výskyty a lokalizace bakterií v těchto tkáních následují po rozsáhlém rozšíření brucel v generalizované fázi infekce. Neplodnost u samců a potraty u samic jsou následkem lokalizace brucel v samčím a samičím pohlavním ústrojí (Khurana *et al.*, 2021; Mazlan *et al.*, 2021; Pinn-Woodcock *et al.*, 2023).

Zasažení gravidní dělohy skotu se vyznačuje charakteristickou nekrotickou placentitidou (obrázek č.3). Ta může být rozsáhlá a akutní a může vést k časnému úhynu plodu s následným potratem nebo k chronické či subakutní placentitidě vedoucí k pozdnímu potratu nebo porodu mrtvého či infikovaného telete. Placenty jsou zduřelé nebo překrvené a pokryté lepkavým hnědým nebo žlutavým exsudátem, který sahá hluboko do krypt (obrázek č.3 a č.4). Interkotyledonární oblasti jsou ztlustělé, často vypadají téměř kožovitě a často dochází ke ztrátě přirozeného načervenalého zbarvení (obrázek č.3 a č.4). U abortovaného plodu se vyskytuje zvětšení sleziny a jater spolu s výrazným nárůstem tekutin v tělní dutině (obrázek č.5). Dále pro něj může být typická nepřítomnost ochlupení ve čtvrtém až sedmém měsíci vývoje nebo také může být abortovaný plod plně vyvinut, bez charakteristických změn (Khurana *et al.*, 2021; Moreno a Barquero-Calvo, 2020; Mustafa *et al.*, 2023).



Obrázek 3 Děloha krávy infikované *B. abortus*

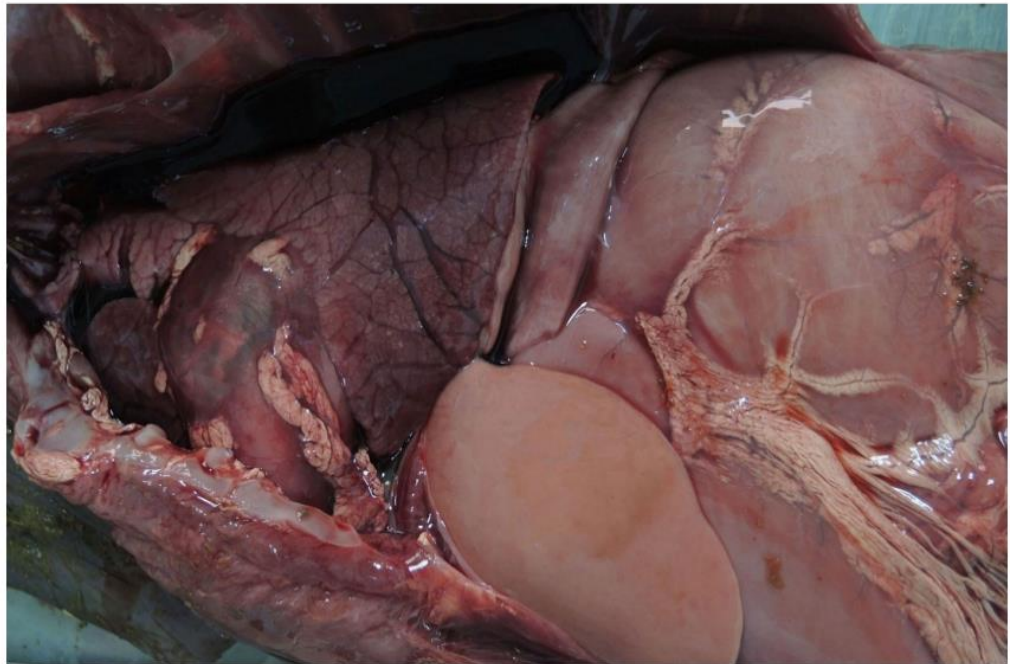
*Děloha obsahuje mnohočetný fibrinózní exsudát na povrchu karunkul. Řez povrchem placenty s fibrinózním nekrotickým exsudátem a multifokálním krvácením (nekrotizující placentitida) (převzato z Neta *et al.*, 2010).*



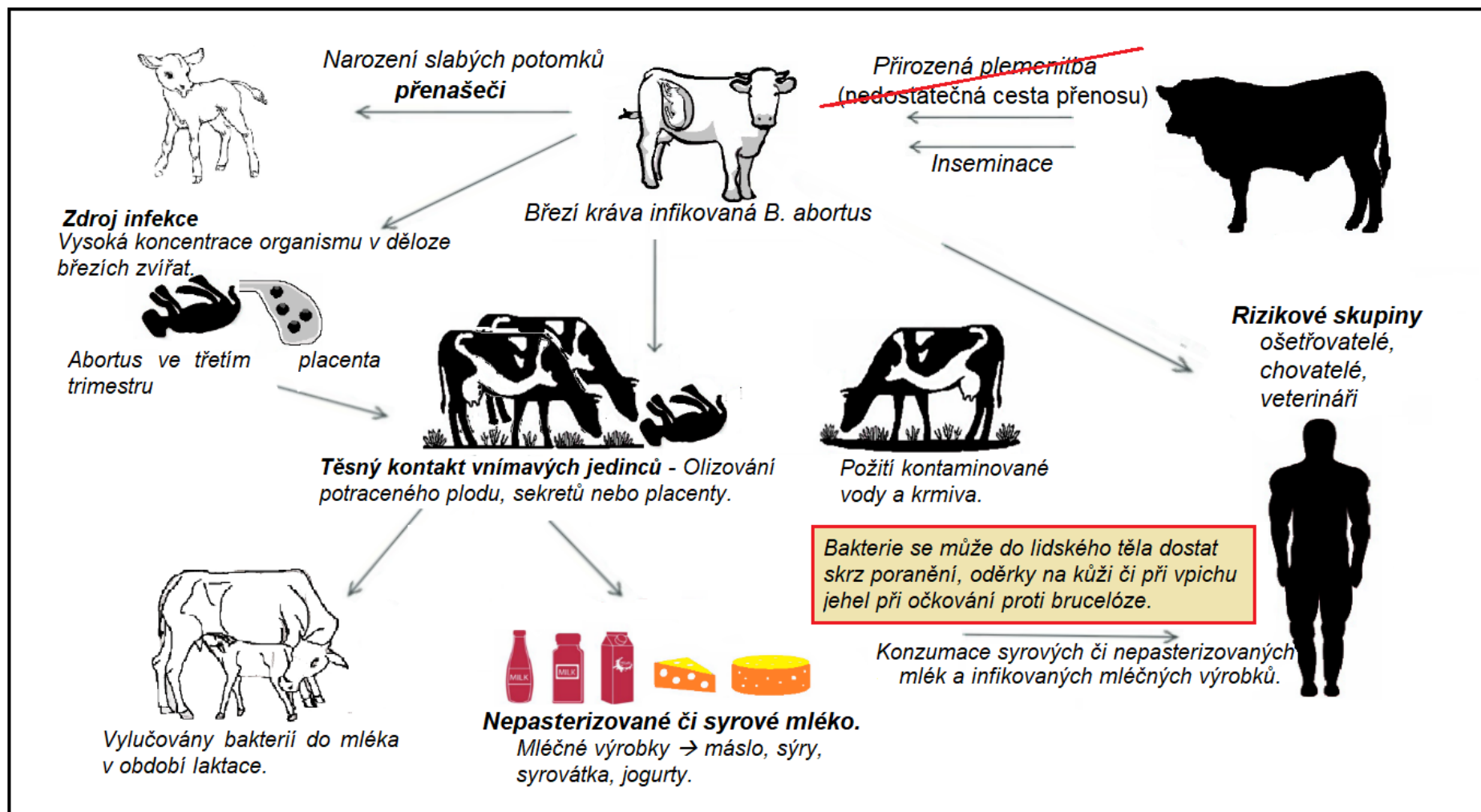
Obrázek 4 Placenta krávy po abortu.

V interkotyledonárních oblastech jsou nažloutlé kotyledony s malými žlutými ložisky. (převzato z Millar a Stack, 2012).

Na plicích je patrná pneumonitida bronchopneumonického typu. U některých případů dochází k fibrinové exsudaci a překrvení, u jiných převažuje buněčná infiltrace bronchiolů, alveolů, peribronchiální tkáně a perialveolární tkáně (Khurana *et al.*, 2021; De Oliveira *et al.*, 2022).



Obrázek 5 Obsah tekutiny v hrudní a břišní dutině potraceného telete (převzato z Ůzen *et al.*, 2021).

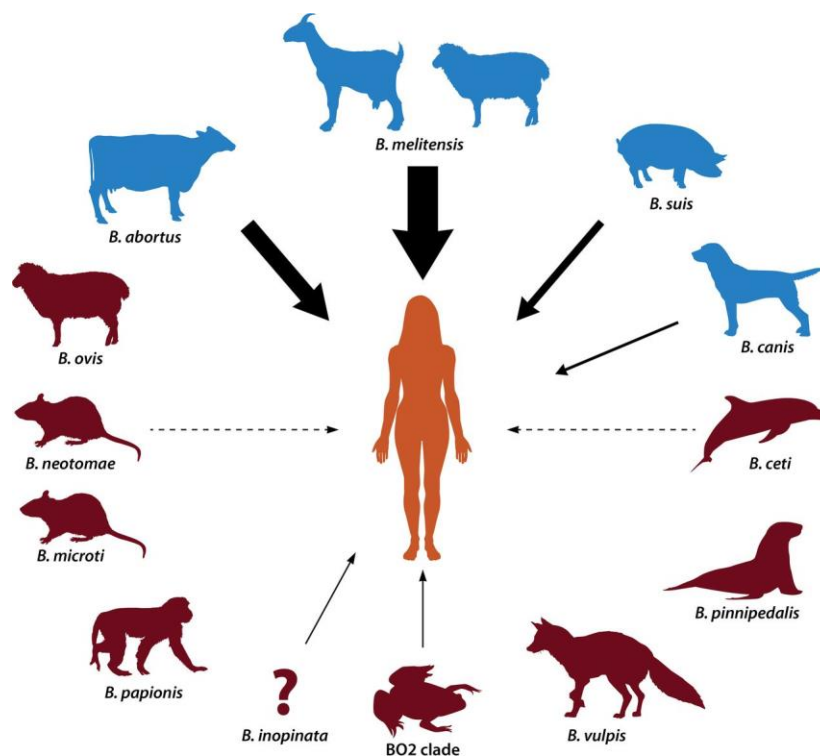


Obrázek 6 Princip přenosu brucelózy (upraveno dle Khurana et al., 2021).

4 Brucelóza

Brucelóza je jednou z nejrozšířenějších zoonózou na světě a nadále představuje velký problém pro veřejné zdraví, avšak podle Světové zdravotnické organizace (WHO) patří mezi sedm nejvíce opomíjených nemocí (Aliyev *et al.*, 2022; Sabra, *et al.*, 2021; Hull a Schumaker, 2018).

Jako první popsal původce brucelózy sir David Bruce v roce 1887 z jater zemřelého vojáka na ostrově Malta. Tenkrát jej označil jako *Micrococcus melitensis*. Teprve o deset let později izoloval Bernard Bang bakterii *Bacillus abortus*, kterou na počest sira Bruce označil jako *Brucella melitensis*, respektive *Brucella abortus*. Klinická brucelóza zvířat a lidí má celou řadu synonym, které se v různých částech světa stále používají. Označuje se jako středomořská horečka, undulantní horečka, maltská horečka, nakažlivé zmetání, Bangova nemoc, neapolská horečka, krymská horečka a Corpsova nemoc. Toto onemocnění je vyvoláno mikroorganismy patřícími do rodu *Brucella*, které se chovají jako fakultativní intracelulární patogeny prasat, přežvýkavců a dalších zvířat. Ačkoli neexistují spolehlivé údaje o celosvětové míře výskytu brucelózy, jako celosvětový odhad se obvykle uvádí 500 000 nových případů ročně. Přestože došlo v mnoha zemích k významnému pokroku v tlumení nákazy, stále jsou oblasti, kde infekce u domácích zvířat přetrvává. V tomto důsledku je přenos nákazy na člověka běžný, zejména v severní a východní Africe, zemích Středomoří, na Blízkém východě, v střední a jižní Asii a ve Střední a Jižní Americe. Díky této skutečnosti se výskyt odhaduje na 5 000 000 až 12 500 000 nemocných ročně a jen málo zemí je oficiálně prostých této nákazy (Aliyev *et al.*, 2022; Sabra *et al.*, 2021; Hull a Schumaker, 2018; Mirzaei *et al.*, 2021; Buttigieg *et al.*, 2018; Almashhadany *et al.*, 2022).



Obrázek 7 Přirození hostitelé a potenciální riziko zoonózy u kmenů rodu *Brucella*.

Otazník značí, že přirozený hostitel pro *B. inopinata* není znám. Přerušované šipky označují, že uvedené druhy *Brucella* byly izolovány při onemocnění člověka, ale přímý přenos z příslušného přirozeného hostitele na člověka nebyl prokázán. Druhy *Brucella* označené modře jsou uznávanými původci zoonóz a tloušťka plných šipek představuje relativní četnost, s jakou tyto hostitelé slouží jako zdroj nákaz pro člověka (převzato z Roop *et al.*, 2021).

4.1 Klinické příznaky

Brucelóza postihuje lidi všech věkových kategorií bez rozdílu pohlaví. Bakterie rodu *Brucella* jsou považovány za bioteroristický organismus. Vzhledem k nízké infekční dávce 10 – 100 bakterií, schopnosti perzistence v prostředí, kdy je *B. abortus* schopna přežít až 114 dní ve vodovodní vodě, rychlému přenosu různými cestami a v neposlední řadě pro obtížnou léčbu antibiotiky. Bakterie rodu *Brucella* lze snadno převést do aerosolu a v téhle formě dobře přežívají (Kaden *et al.*, 2018; Lai *et al.*, 2021; El-sayed a Awad, 2018; Rathish *et al.*, 2022).

K infekci člověka dochází náhodně. Člověk se brucelózou snadno nakazí konzumací nepasterizovaného mléka a dalších mléčných výrobků nebo nedostatečně tepelně opracovaného masa nakažených zvířat. Při ohnisku nákazy v malém měřítku může dojít k naze brucelou při výkonu povolání u různých zaměstnání, např. u pracovníků na jatkách, a to formou aerosolu tekutin, penetrací, poraněním a postříkáním sliznice. Na zdraví jsou ohroženi chovatelé a pastevcí, kteří přicházejí do kontaktu s potrácenými plody a placentami. Veterinární lékaři a technici bývají obvykle infikováni náhodou při vakcinaci očkovací látkou proti *B. abortus*

kmenem S19 a *B. melitensis* nebo infikovanými tekutinami při diagnostice zvířat. Navíc vzhledem k tomu, že brucelóza je jednou z nejvíce rozšířených laboratorních infekcí, je třeba při manipulaci s infikovanými vzorky a kulturami dodržovat nezbytná bezpečnostní opatření. K přenosu z člověka na člověka může dojít krevní transfuzí, transplantací orgánů nebo vertikálním přenosem z matky na potomka prostřednictvím kojení (Sabra *et al.*, 2021; Buttigieg *et al.*, 2018; Lai *et al.*, 2021).

Jakmile se bakterie dostanou do organismu, místní profesionální fagocyty, tedy DC, neutrofilů a makrofágy, internalizují bakterie a přesunou se do nejbližších drenážních lymfatických uzlin. Tím dochází k následné distribuci do různých orgánů retikuloendoteliálního systému, včetně jater, kostní dřeně, sleziny a plic. Pro člověka představuje brucelóza systémovou infekci a infikován může být kterýkoliv orgán. Ovšem existují i určité predispozice pro játra a klouby a v nižší míře i pro srdce a mozek. Projevy brucelózy jsou různorodé, klamné a často nespecifické a mohou se podobat jiným neinfekčním i infekčním onemocněním. U brucelózy se vyskytuje celá řada klinických projevů od asymptomatických až po závažná onemocnění. Inkubační doba se pohybuje v rozmezí 1 až 4 týdnů, někdy však může trvat i řadu měsíců s příznaky nebo bez nich. Podle závažnosti a trvání příznaků se brucelóza dělí na tři klinické formy a to na akutní (počáteční 2 měsíce), subakutní (2-12 měsíců) a chronickou (více než 12 měsíců). Subakutní forma se nevyznačuje žádnými výraznými příznaky a je diagnostikována na základě pozitivního sérologického vyšetření. Je častá u pracovníků jatek, veterinářů a zemědělců. U chronické formy se probíhající nemoc řadí do dalších tří kategorií. První kategorie je relaps což je onemocnění projevující se vysokým titrem IgG protilátek po léčbě antibiotiky nebo také horečkou. Druhou kategorií představuje chronická lokalizovaná infekce, vyznačující se střídavou horečkou po dlouhé době a recidivou infekčních ložisek. Poslední kategorií je pozdní rekonvalescence zde se můžeme setkat s přetrváváním některých příznaků bez horečky nebo jiných objektivních příznaků. U většiny případů se onemocnění projevuje nespecifickými příznaky, jako je nechutenství, pocení, horečka, ztráta chuti k jídlu, lymfadenopatie nebo hepatosplenomegalie, hluboká svalová slabost či bolestivost pohybového aparátu. Pokud se infekce neléčí, může dojít k vlnitým horečkám v důsledku opakujícím se bakteriémickým epizod, po kterých se objevují nová infekční ložiska. Díky tvorbě těchto ložisek může dojít k poškození specifických tkání a orgánů a způsobit urogenitální, neurologické, osteoartikulární a kardiologické komplikace. Za nejčastější komplikaci brucelózy je považováno osteoartikulární poškození, kdy jsou nejčastěji zasaženy páteřní a sakroiliakální klouby. K typickým komplikacím brucelárního poškození páteře patří spondylitida a spondylodiscitida. Dalšími osteoartikulárními projevy, avšak s nižší mírou výskytu, jsou

periferní artritida, burzitida, discitida, tenosynovitida a osteomyelitida. Vzácnou komplikací spinální brucelózy je epidurální absces, ale pokud není včas léčen, může vést k trvalému neurologickému poškození nebo i smrti. Pro člověka nejsou typické klinické potraty způsobené infekcí brucelózou. Proto člověk představuje konečného hostitele, neboť potraty představují hlavní způsob přenosu bakterie, a to především ve zvířecí populaci (Amjadi *et al.*, 2019; Gonzalez-Espinoza *et al.*, 2021; Hull a Schumaker, 2018; Esmailnejad-Ganji a Esmailnejad-Ganji, 2019; Zhang *et al.*, 2019; Sargsyan *et al.*, 2019).

5 Diagnostika

Aby bylo možné brucelózu tlumit a eradikovat, má mimořádný význam její rychlá a přesná diagnostika. V diagnostice brucelózy se používají dvě hlavní skupiny testů, testy zjišťující imunitní reakci na jejich antigeny, a testy prokazující přítomnost daného organismů. V rámci sledování a laboratorního potvrzení infekce způsobené rodem *Brucella* lze použít několik biologických vzorků. Odebrané vzorky lze vyšetřit zmražené či čerstvě odebrané v laboratoři. Jako vzorky lze použít krev, mléko, vaginální stěry, sperma, plodové obaly, plodovou vodu, potracený plod a uhynulé tělo. V klasické mikrobiologické identifikaci kmenů brucel se uplatňuje morfologie kolonií, mikroskopický vzhled, citlivost na bazický fuchsin a thionin, biochemické vlastnosti, jako je potřeba CO₂, produkce H₂S, metabolické vlastnosti, sérotypizace a fágová typizace (tabulka č.3). V programech eradikace, kontroly a dozoru nad přežvýkavci se běžně používají metody nepřímé diagnostiky. Imunologické testy jsou nezbytné v rámci každého kroku zásahu proti brucelóze jako je hodnocení prevalence, posouzení účinnosti eliminačních a kontrolních opatření a potvrzení eradikace nákazy prostřednictvím dozoru. Pro diagnostiku brucelózy lidí se z důvodů velmi pomalého růstu bakterií rodu *Brucella* *in vitro* využívají sérologické testy jako screeningové testy pro předběžnou diagnostiku brucelózy (Saavedra *et al.*, 2019; Ducrotoy *et al.*, 2018; Almashhadany *et al.*, 2022).

Tabulka 3 Charakteristické znaky jednotlivých druhů brucela a jejich biotypů

+ pozitivní; - negativní; +/- variabilní (upraveno dle Güven).

<i>Brucella</i> spp	Biotyp	Potřeba 10 % CO ₂	Produkce H ₂ S	Citlivost na barviva					Aglutinace		
				Bazický fuchsin		Thionin			Anti- A	Anti- M	Anti- R
				b	c	a	b	c			
<i>B. melitensis</i>	1	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-
	2	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-
	3	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-
<i>B. abortus</i>	1	+/-	+	+	+	-	-	-	+	-	-
	2	+/-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
	3	+/-	+	+	+	+	+	+	+	-	-
	4	+/-	+	+	+	-	-	-	-	+	-
	5	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-
	6	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-
	7	-	+/-	+	+	-	+	+	+	+	-
	8	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-
	9	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-
<i>B. susis</i>	1	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-
	2	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-
	3	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-
	4	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-
	5	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-
<i>B. neotomae</i>	1	-	+	-	-	+		+	+	-	+
<i>B. ovis</i>	1	+	-	+	+	-		+	-	-	+
<i>B. canis</i>	1	-	-	-	-	+		+	-	-	+

5.1 Mikroskopické vyšetření

B. abortus jsou drobné ($0,5-0,7 \times 0,6-1,5 \mu\text{m}$), fakultativně intracelulární, nepohyblivé, pomalu rostoucí, nesporulující gramnegativní kokotyčinky (Di Bonaventura *et al.*, 2021; Bosilkovski *et al.*, 2021; Handayani *et al.*, 2022).

5.1.1 Gramovo barvení

Gramovo barvení, k němuž se často přistupuje jako k prvnímu testu, využívá jako základní barvivo krystalovou violet' nebo methylenovou modř. Organismy, které si zachovávají toto základní barvivo a pod mikroskopem se jeví jako purpurově hnědé, se označují jako grampozitivní organismy (G+). Organismy, které nepřijímají primární barvivo, vidíme pod mikroskopem červeně a jedná se o gramnegativní organismy (G-). Základním principem barvení dle Grama je schopnost bakteriální buněčné stěny ponechat si barvivo krystalovou violet' během odbarvování rozpouštědlem. G+ mikroorganismy obsahují větší množství peptidoglykanu v porovnání s G- organismy, které mají nízký obsah tohoto polysacharidu ale vyšší obsah lipidů v buněčné stěně. Na začátku barvení všechny bakterie přijímají krystalovou violet', avšak při použití rozpouštědla se lipidová vrstva u gramnegativních organismů rozpustí. Po rozpuštění lipidové vrstvy G- bakterie ztrácejí primární barvivo. Naopak rozpouštědlo dehydratuje buněčnou stěnu G+ bakterií a uzavírá póry, které brání difuzi komplexu fialové barvy a jódu, a bakterie tak zůstávají obarvené. Při barvení gramnegativních bakterií je zásadním krokem délka odbarvování, poněvadž delší působení odbarvovacího činidla může odstranit všechna barviva z obou typů bakterií (Tripathi a Sapra, 2020; Staining, 2018; Alkasher, 2020; Pal, 2021).

Dle Grama jsou bakterie *B. abortus* kokotyčinky, které se barví červeně. To vypovídá o tom, že *B. abortus* není rezistentní vůči alkoholu a ztrácí primární barvivo, poté může barvivo fuchsin/safranin proniknout do buněčné stěny a dát jí červenou barvu (Handayani *et al.*, 2022).

5.1.2 Průkaz katalázy

Tento test je určen ke zjištění, jestli bakterie produkují enzym katalázu. Pozitivní reakce je charakterizována tvorbou kyslíkových bublinek, které indikují, že bakterie produkují enzym katalázu, který neutralizuje peroxid vodíku H_2O_2 a rozkládá jej na vodu (H_2O) a kyslík (O_2). Primárními producenty enzymu katalázy jsou fakultativní anaeroby a obligátně aerobní bakterie (Ismail *et al.*, 2018; Al-Joda a Jasim, 2021; Rahman *et al.*, 2019; Bhalla *et al.*, 2018).

5.1.3 Průkaz oxidázy

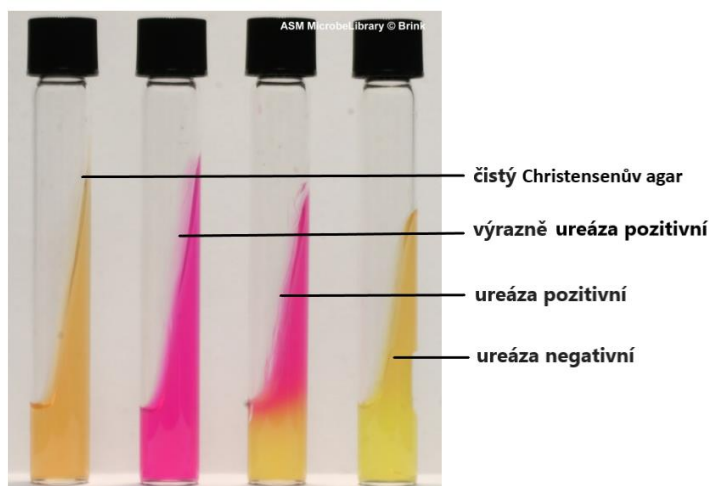
Oxidázový test pomáhá identifikovat mikroorganismy, které produkují enzym cytochromoxidázu. Pomocí tohoto testu lze rozlišovat mezi oxidáza-pozitivní skupinou *Pseudomonacea* a oxidáza-negativní skupinou *Enterobacteriacea*. Cytochromoxidáza funguje na základě přenosu elektronů mezi donorem (elektronový transportní řetězec) a akceptorem (kyslík), přičemž konečným akceptorem je voda. Elektronový donor se pomocí cytochromoxidázy oxiduje a jeho odstín se změní na tmavě fialový (Al-Joda a Jasim, 2021; Aslantürk, 2018; Evurani *et al.*, 2019; Hossain *et al.*, 2019).



Obrázek 8 Interpretace výsledků průkazu oxidázy (upraveno dle Shields a Cathcart, 2010).

5.1.4 Důkaz ureázy

Ureázový test se používá k identifikaci bakterií, které produkují enzym ureázu. Ureáza je enzym, který rozkládá močovinu na CO_2 a NH_3 . Tato zkouška je založena na změně barvy indikátoru fenolové červeně, který je obsažen v Christensenově ureázovém agaru, v důsledku alkalizace média při hydrolýze močoviny. Na dané medium se inokulační kličkou naočkuje kolonie *B. abortus* a nechá se inkubovat při 37 °C, 10 % CO_2 po dobu 6 hodin. U takto přichystaného preparátu se každých 30 minut, až do uplynutí požadované doby 6 hodin, pozoruje vývoj růžového zbarvení, které značí pozitivní nález (Patel a Shah, 2018; Cui *et al.*, 2022; Omoregie *et al.*, 2018; Al-Joda a Jasim, 2021).



Obrázek 9 Srovnání výsledků testu na Christensenově ureázovém agaru (upraveno dle Brink, 2010).

5.2 Kultivace

Za "zlatý standard" laboratorní diagnostiky brucelózy se považuje kultivace, protože růst bakterií v kultivačních médiích může sloužit jako jednoznačný průkaz infekce. Výběr vzorků pro izolaci bakterie rodu *Brucella* se většinou řídí podle pozorovaných příznaků. Zpravidla zahrnují vaginální sekrety, mléko, vzorky tkáně z vemene, genitální a mléčné lymfy, žaludeční obsah potracených plodů, plodové obaly, hygromové tekutiny a další. Zatímco u zvířat lze bakterie rodu *Brucella* získat především z infikované placenty, lymfatických uzlin a mléka, u člověka jej lze izolovat z moči, mozkomíšního moku a krve. Ke kultivaci bakterií rodu *Brucella* je k dispozici široké spektrum kultivačních médií a každé z nich má své výhody i nevýhody. U kultivace tekutých vzorků se obecně upřednostňují bujóny, kdežto pro kultivaci ostatních vzorků lze použít pevná média s 2,5 % agaru. V případě izolace pomalu rostoucích druhů brucel se používají selektivní půdy, protože mají schopnost potlačovat růst většiny komenzálních bakterií a bakterií z prostředí. Kolonie brucel se na médiu objeví po 2 až 30 dnech inkubace a jsou průhledné, s hladkým povrchem a neporušenými okraji. Mezi často používaná média pro kultivaci brucel patří krevní agar (obrázek č.10), bramborový agar, sérový dextrózový agar, tryptózový agar, tryptózový sójový agar, brucella agar (obrázek č.11), Thayer-Martinův agar (obrázek č.12) a Farrellovo médium (obrázek č.13). *Brucella* agar je selektivní médium určené pro kultivaci bakterií rodu *Brucella* z diagnostických vzorků a jiného potenciálně kontaminovaného materiálu. Toto kultivační médium obsahuje peptony, dextrózu, kvasnicový extrakt a krev, a díky tomu slouží ke kultivaci všech náročnějších aerobních, mikroaerofilních a anaerobních mikroorganismů. Thayer-Martinův agar představuje selektivní

médium používané pro izolaci patogenních bakterií rodu *Neisseria*, včetně *Neisseria gonorrhoeae* a *Neisseria meningitidis*. Dále se toto médium využívá pro analýzu vzorků obsahujících smíšenou flóru bakterií a hub. Zmíněné médium obsahuje antimikrobiální látky, mezi které se řadí vankomycin (potlačující růst grampozitivních bakterií), nystatin (inhibující plísně) a kolistin, který inhibuje růst gramnegativních bakterií s výjimkou bakterií rodu *Brucella*. Dále, Farrellovo médium je speciální selektivní médium určené výhradně pro kultivaci bakterií rodu *Brucella*. Toto médium ve svém základu obsahuje antibiotika, která inhibují růst doprovodné mikroflóry, kterou mohou být plísně, dále i grampozitivní a gramnegativní bakterie jiné než *Brucella* spp (Di Bonaventura *et al.*, 2021; Ducrotoy *et al.*, 2018; Ledwaba *et al.*, 2020; Maha *et al.*, 2021; Abaker *et al.*, 2021).



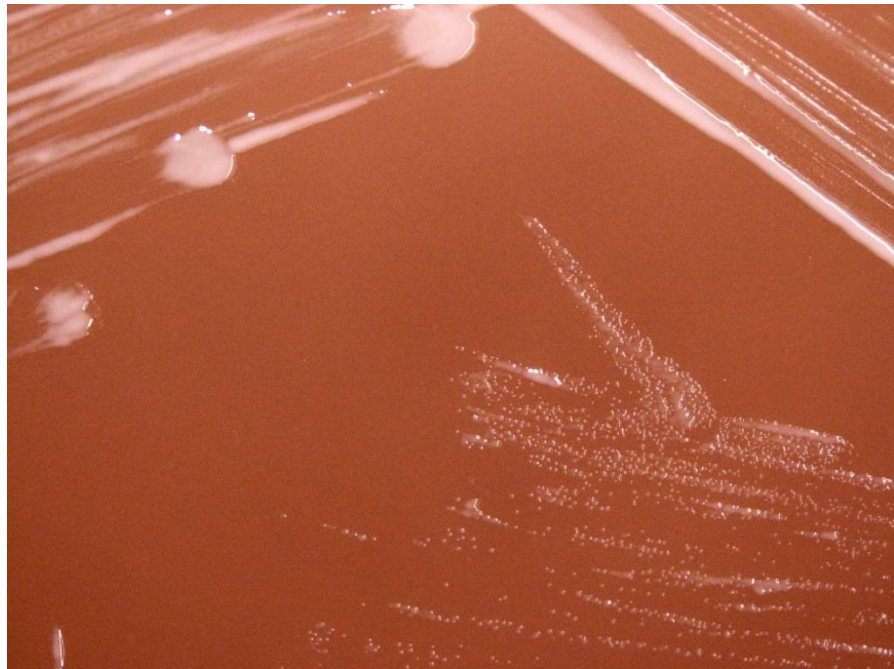
Obrázek 10 Růst *B. abortus* na krevním agaru

Kultivace bakterií při 37 °C, 5 – 10 % CO₂ po dobu 3 – 5 dnů. Na krevním agaru se bakterie *B. abortus* rostou jako nehemolytické s hladkým, kulatým, vypouklým okrajem, průsvitné, medové barvy, s modravým leskem (převzato z Al-Mossawy *et al.*, 2019; Najum, 2012).



Obrázek 11 Růst *B. abortus* na brucella agaru.

Kultivace bakterií při 37 °C, 5 – 10 % CO₂ po dobu 82 hodin. Bakterie *B. abortus* na brucella agaru rostou jako malé, kulaté, lesklé, hladké nebo někdy také hlenovité kolonie (převzato z Wang et al., 2018; De Nardi Júnior et al. 2015; Shrimali et al., 2017).



Obrázek 12 Růst *B. abortus* na Thayer-Martinův agar

Vzorek byl kultivován anaerobně s 10 % CO₂ při 37 °C po dobu 3-5 dnů (převzato z Maha et al.,2021; Parker, 2014).



Obrázek 13 Kultura *B. abortus* na Farrellově médiu.

Vzorek kultivován na příslušném médiu při 37 °C anaerobně s 10 % CO₂ po dobu 2 týdnů (převzato z Millar a Stack, 2012; Júnior et al., 2017).

5.3 Serologické vyšetření

Sérologické testy mají význam pro sledování, kontrolu a eradikaci nákazy po celém světě a zároveň představují nepřímou metodu detekce brucelózy. Dané vyšetření je zaměřeno na detekci specifických protilátek, které se v krvi začínají tvořit zhruba do týdne po infekci bakteriemi rodu *Brucella*. Jako první se objevují IgM, poté se začnou tvořit IgG. Tyto protilátky se stanovují v séru vyšetřovaného jedince. Mezi běžně používané testy pro sledování brucelózy patří mléčný kroužkový test (MRT), komplement fixační test (CFT), Rose Bengal test (RBT), standardní aglutinační test (SAT), imunoaglutinace, Coombsův test a enzymová imunoanalýza na imunosorbentech (ELISA) (tabulka č.4). K sérologickým testům se používá několik antigenů, které se získávají většinou z *B. melitensis* a *B. abortus*, přičemž k nepřímému stanovení fluorescenčních protilátek (IFA) se používají celobuněčné preparáty. Nicméně většina sérologických testů používaných pro laboratorní diagnostiku brucelózy se dělí na metody zaměřené na kmeny s hladkým LPS (S-LPS) a na metody zaměřené na cytosolové proteiny (tabulka č.5). U sérologických testů jsou však dvě hlavní nevýhody a to je možnost zkřížené reaktivity bakteriálních antigenů s nespecifickými protilátkami a druhá je falešně negativní, jestliže je titr antigenu nebo protilátky velmi nízký. Aby se tyto nevýhody překonaly,

doporučuje Světová organizace pro zdraví zvířat (OIE) spojit dva sérologické testy souběžně, aby se zvýšila citlivost při diagnostice infekce způsobené brucelami (Di Bonaventura *et al.*, 2021; Naz *et al.*, 2020; Khurana *et al.*, 2021; Saavedra *et al.*, 2019).

Tabulka 4 Seznam diagnostických testů na brucelózu: "předepsané testy" jsou vyžadovány OIE a "alternativní testy" jsou vhodné pro diagnostiku nákazy v místním prostředí a mohou být také použity při vývozu/dovozu zvířat po oboustranné dohodě.

Zkratky: (BBAT) test s puřrovaným brucelovým antigenem; (FPA) fluorescenční polarizační imunoanalýza; (NH) haptanový test; (IFN γ) interferon gama (upraveno dle Saavedra *et al.*, 2019).

Název onemocnění (původce onemocnění)	Stanovené testy	Alternativní testy
Brucelóza skotu (<i>B. melitensis</i> , <i>B. abortus</i>)	BBAT, CFT, ELISA, FPA, SAT, FPA, SAT	BBAT+NH, MRT, IFN- γ
Brucelóza ovcí a koz (kromě <i>B. ovis</i>)	BBAT, CFT	Brucellinův test, FPA, NH
Brucelóza ovcí (<i>B. ovis</i>)	CFT	ELISA
Brucelóza prasat (<i>B. suis</i>)	ELISA	BBAT, FPA

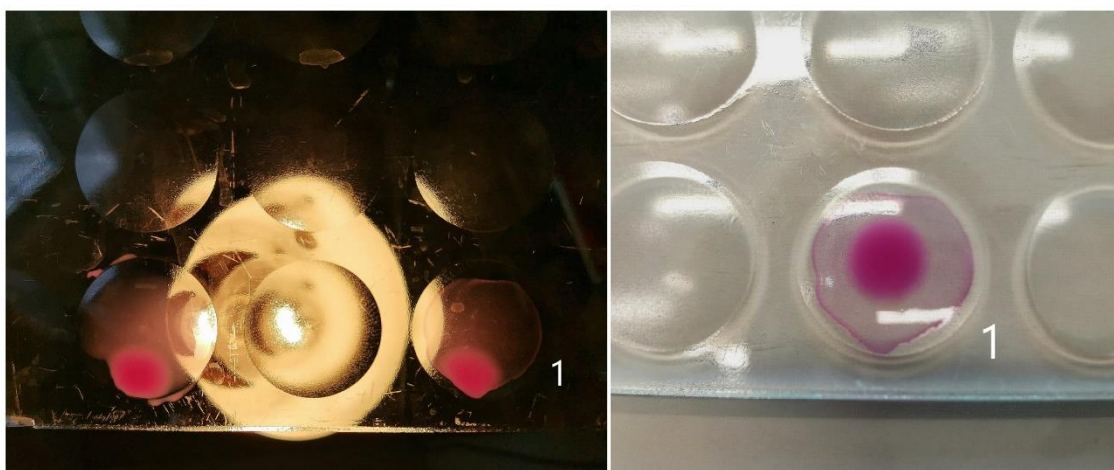
Tabulka 5 Rozdělení metod v závislosti na záměru stanovení

Zkratky: (test 2-ME) test využívající 2-merkaptóethanol k eliminaci typu IgM a zanechání pouze izotypu IgG; (FRET) test fluorescenčního rezonančního přenosu energie, jenž značí daný antigen a jeho komplementární protilátku odpovídajícími typy fluoroforů a měří množství energie přenesené po excitaci donorového fluoroforu proti S-LPS Brucelly; (FPA) fluorescenční polarizační imunoanalýza spočívá v měření rozdílu rotační rychlosti malých molekul antigenu v roztoku, označených fluorochromem, a téhož antigenu konjugovaného s jeho protilátkou, proti brucelárnímu S-LPS (vytvořeno dle Di Bonaventura *et al.*, 2021).

Metody zaměřené na S-LPS	Metody zaměřené na cytosolové proteiny
RBT	
SAT	
test 2-ME	
Coombsův test	ELISA
CFT	
FRET	
FPA	

5.3.1 Test na principu aglutinace

Rose Bengal test (RBT) je jednoduchou metodou diagnostiky brucelózy. Spolu s Lateral flow assays (LFA) lze snadno provést v místě odběru vzorku, čímž se značně zkrátí doba potřebná k diagnostice. Použitím kombinované diagnostiky RBT a LFA je možné využít pro přesnou diagnostiku brucelózy. RBT se provádí pomocí 8 % suspenze usmrcených buněk kmene *B. abortus* obarvených barvivem Rose bengal a pufovaných na pH 3,6-3,7. Metoda RBT spočívá v jednoduchém bodovém aglutinačním testu, při kterém se na destičce smísí kapky antigenu obarveného Rose Bengal a séra. Každá vzniklá aglutinace znamená pozitivní reakci. Výkon testu je jednoduchý a nevyžaduje technické znalosti ani speciální laboratorní vybavení. Ačkoli je test schopen poskytnout výsledky do 4 minut, séra s vysokými titry neaglutinujících protilátek mohou k prokázání charakteristických bakteriálních shluků nebo typického okraje potřebovat až 8 minut. Zároveň se jedná o účinný screeningový test, který je možné použít jako diagnostický test pro kontrolu jednotlivých zvířat či stád a také u lidí. Toto vyšetření je efektivní při diagnostice akutní brucelózy u lidí a dosud je využíváno při diagnostice chronických případů. Metoda RBT je vysoce citlivá, a to bez ohledu na stadium infekce. Nicméně podobně jako všechny testy, které detekují protilátky proti LPS, může poskytovat falešně pozitivní výsledky. Falešně pozitivní výsledek může být u vakcinovaných zvířat a u zvířat a lidí, kteří jsou již imunizováni kmenem S19. Díky této skutečnosti je důležité každý pozitivní výsledek potvrdit dalším testem, například SAT nebo CFT (Khurana *et al.*, 2021; Yagupsky *et al.*, 2019; Saavedra *et al.*, 2019; Bayu, 2018).



Obrázek 14 Průkaz protilátek proti *Brucella spp.* metodou RBT

1 Pozitivní kontrola, která se projevila tvorbou vloček s projasněnou tekutinou (obrázek, Kristýna Voltrová).

5.3.2 Standardní aglutinační test

Standardní aglutinační test (SAT) představuje dnes nejběžnější sérodiagnostický test používaný k diagnostice infekcí *B. abortus*, *B. melitensis* a *B. suis*. Vzhledem k tomu, že SAT detekuje pouze protilátky proti S-LPS brucel, není užitečný pro diagnostiku onemocnění vyvolaného R-LPS druhem *B. canis*. Tento serologický test je založen na sedimentaci komplexů IgM protilátek s antigeny *B. abortus*. Reakce je pomalá, vzhledem k tomu, že vyžaduje inkubaci přes noc při 37 °C. Analýza SAT se provádí tak, že se ve zkumavkách nebo v jamkách mikrotitrační destičky smísí dvojkovým ředěním sérum pacienta s brucelovým antigenem získaným z tepelně usmrceného kmene *B. abortus*. Po inkubaci a bez protřepání zkumavek lze reakci odečíst pouhým okem, pod lupou nebo za použití fluorescenčního světla a tmavého pozadí. Jestliže došlo k aglutinaci, shluky komplexů antigen-protilátka se usadí a zanechají čistý supernatant. Pokud je výsledek testu negativní, zůstane suspenze nezměněná a zakalená (Yagupsky *et al.*, 2019; Saavedra *et al.*, 2019; Khurana *et al.*, 2021).

5.3.3 Enzymová imunoanalýza na imunosorbentech

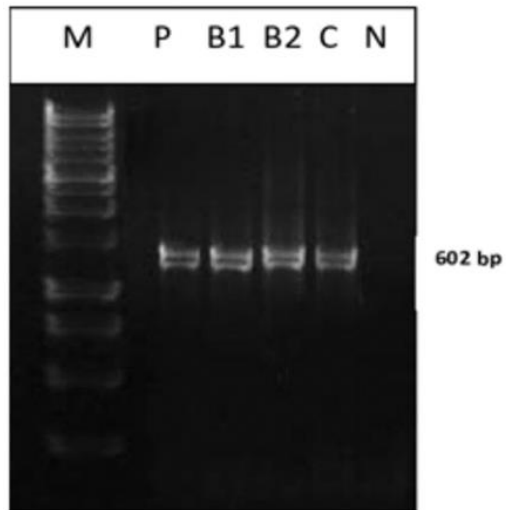
ELISA jsou metody, které spočívají v imobilizaci jedné z aktivních složek na pevné fázi. Převážná většina metod ELISA používaných v diagnostice brucelózy jsou nepřímé metody ELISA (iELISA). IELISA jsou testy, při nichž je antigen navázán na pevnou fázi, zpravidla polystyrenovou mikrotitrační destičku, takže protilátka, je-li ve vzorku přítomna, se naváže na imobilizovaný antigen a může být detekována vhodným konjugátem antiglobulinu a enzymu. Při iELISA jsou všechny jamky mikrotitrační destičky potaženy (LPS) brucel. Odebrané vzorky se naředí a inkubují v jamkách. Veškeré protilátky charakteristické pro bakterie rodu *Brucella* přítomné ve vzorku utvoří komplex LPS-protilátka a zůstanou navázány v jamkách. Do jamek se po promytí přidá konjugát proti hovězím IgG značené peroxidázou, který vytvoří komplex antigen-protilátka-konjugát. Ke vzniklému komplexu se přidá enzymový substrát, který reaguje se vzniklým komplexem vytvořením modré barvy, která po zablokování zežloutne. Intenzita barvy určuje míru protilátek přítomných v testovaném vzorku. Metoda však není tak specifická jako ostatní testy a nedokáže rozlišit protilátky stimulované vakcínou od protilátek vzniklých při infekci v terénu. Proto by měl být považován spíše za screeningový než konfirmační test při testování vakcinovaných stád u kterých se vyskytují falešně pozitivní výsledky (Bayu, 2018; Saxena *et al.*, 2018; Saavedra *et al.*, 2019; Legesse *et al.*, 2022).

Jinou diagnostickou metodou je kompetitivní ELISA (cELISA). V tomto testu je antigen brucel imobilizován na destičce stejně jako u nepřímé ELISA. Následně se vyšetřované sérum spolu s monoklonálními protilátkami zaměřenými proti epitopu na antigenu inkubují při 37 °C.

Tyto monoklonální protilátky proti brucelám jsou konjugovány s enzymem, jehož přítomnost se zjistí, pokud se naváže na antigen. To nastane pouze v případě, že ve zkoumaném vzorku séra není protilátka, která se váže přednostně (Bayu, 2018; Saxena *et al.*, 2018; Saavedra *et al.*, 2019).

5.4 Diagnostika založena na polymerázové řetězové reakci

Diagnostika založena na polymerázové řetězové reakci (PCR) byla v nedávných letech přijata a velmi rychle nahrazuje standardní diagnostické testy v klinických laboratořích. PCR nejen detekuje, ale také dokáže přesně rozlišit mezi akutní, subakutní a chronickou infekcí zároveň je možné jej použít pro identifikaci a typizaci. Počátečním a zásadním krokem PCR je izolace DNA, neboť její vlastnost má značný vliv na citlivost metody. Krev představuje snadný zdroj DNA ke stanovení infekce způsobenu rodem *Brucella*. Dále lze k detekci brucel použít i řadu dalších klinických vzorků včetně séra, moči a synoviálního, mozkomíšního nebo pleurálního moku a hnisu. Původně byla pro určování bakterií vyvinuta PCR. Stejně tak se nyní tyto postupy používají pro identifikaci brucelózy klinických vzorků zvířat a lidí. Spolehlivou technikou pro detekci brucelózy je použití jediného páru primerů, která je zaměřená na detekci jedinečného genetického lokusu, který je společný všem druhům *Brucella*, jako je operon 16S a 23S rRNA, inserční sekvence IS711 nebo gen *bcp31*. Při použití směsi některých párů primerů pro zvětšení genů *BCSP31*, *OMP2B*, *OMP31*, které kódují vnější membránové proteiny. Lze snadno detekovat čtyři druhy brucel a to *B. suis*, *B. melitensis*, *B. abortus* a *B. canis*. K průkazu *Brucella* spp. lze použít jak konvenční, tak real-time PCR. Metody PCR použité k detekci některých biovarů *B. abortus*, jimiž se rozlišil kmen S19 a RB51 tak umožnily využití očkování proti patogennímu kmenu *B. abortus* (Khan a Zahoor, 2018; Ur Rahman *et al.*, 2019; Khurana *et al.*, 2021; Saavedra *et al.*, 2019).



Obrázek 15 Gelová elektroforéza poskytující pozitivní výsledek na *B. abortus*

IS711 PCR testu (602 bp) ze získaných kolonií z kultivačního média a bujónu. Pás M představuje molekulární marker, pás P pozitivní kontrolu, pás B1-B2 bujón, pás C kolonie a pás N negativní kontrolu (převzato ze Rahman, 2019).

6 Léčba a prevence

6.1 Rezistence *B. abortus*

Bakterie *B. abortus* mohou zůstat životoschopné ve zmrzlině až jeden měsíc, v chlazeném mléce 10 dní, a v másle čtyři měsíce. Tato skutečnost může být snadno zvrácena a bakterie lze v potravinách usmrtit pasterizací při 60 °C po dobu 10 minut. Pro usmrcení bakterie v prostředí se využívá desinfekce 1 % fenolem po dobu 15 minut (Sawant *et al.*, 2022; Parija, 2023).

6.2 Léčba

6.2.1 Léčba hospodářských zvířat

Všeobecně platí, že terapie zvířat infikovaných brucelou se nedoporučuje. Je to způsobeno především vysokou mírou neúspěšné léčby, náklady a potencionálními problémy plynoucími z udržování nemocných zvířat v současném eradikačním procesu. Léčba není většinou úspěšná díky mezibuněčné sekvestraci organismů v mléčných žlázách, reprodukčních orgánech a lymfatických uzlinách. Vzhledem k tomu je málo pravděpodobné že by se léčba u zvířat prováděla. Pokud by ovšem nemocné zvíře bylo léčeno je základním krokem léčby všech forem brucelózy podání účinných antibiotik (ATB) a včasné zahájení léčby. Je-li to považováno za potřebné, tak jako účinná léčba se ukázala antibiotická kúra tetracyklinem (TET), chloramfenikolem (CMP), streptomycinem (STR), gentamycinem (GEN) dále pak kombinace rifampicinu (RIF) a doxycyklinu (DOX) preventivně po dobu 6 – 8 týdnů. Protože je bakterie intracelulární parazit, upřednostňuje se použití kombinací dvou nebo více léků. Četnost onemocnění může během prvních šesti měsíců po léčbě dosáhnout až 15 %. Dlouhodobé podávání antibiotik může napomoci předcházet meningitidě, recidivě infekce, osteomyelitidě a relapsu. Standardní režim léčby u dospělých zvířat zahrnuje intramuskulární injekci 1 g streptomycinu (STR) po dobu 14 dnů a perorální podání 100 mg doxycyklinu (DOX) dvakrát denně po dobu 45-50 dnů (Sawant *et al.*, 2022; Bhave a Khillare; Bayu, 2018; Wareth *et al.*, 2022).

6.2.2 Léčba lidské brucelózy

Vzhledem ke složité povaze onemocnění, možnému relapsu, vedlejším účinkům ATB a vzniku rezistence, je léčba této infekce náročná. Nicméně se předpokládá že dlouhodobá léčba ATB je pro zdraví člověka prospěšná. Jako efektivní proti infekci se v naprosté většině případů

jeví kombinovaná léčba antibiotiky, přičemž však stav onemocnění stále neztrácí na významu. Ve zdravotnictví se hojně používá několik běžných ATB, například tetracyklin, rifampicin, sulfamethoxazol a trimetoprim (TRI), aminoglykosid, chinolon, streptomycin, chloramfenikol a doxycyklin. Nejlepších výsledků dosáhla v určitých případech aplikace antibiotik v určitém pořadí. Obdobně byl popsán případ, kdy se léčba doxycyklinem po dobu šesti měsíců, po níž následovala léčba streptomycinem po dobu tří týdnů, ukázala jako velmi účinná proti brucelóze u člověka. Z jiné studie vyplynulo, že jatrorrhizin v kombinaci s alkaloidem columbaminem byly účinnější proti brucelóze způsobené bakterií *B. abortus* při srovnání s kombinací streptomycinu a rifampicinu. Standardem pro léčbu lidské brucelózy je již dlouho tetracyklin, který se pacientovi podává každých šest hodin po 500 mg. Tato terapeutická dávka je podávána po dobu nejméně šesti týdnů. Dle doporučení WHO se při akutní formě brucelózy u dospělých podává rifampicin v terapeutické dávce 600 až 900 mg společně s doxycyklinem v dávce 100 mg dvakrát denně po dobu nejméně šesti týdnů. Pro léčbu brucelózy u těhotných žen se však v běžné praxi používá léčba pouze rifampicinem a u dětí se doporučuje kombinovaná léčba trimetoprimem a sulfametoxazolem. Například u subdurálního empyému komplikovaného intracerebrálním abscesem způsobeným brucelovou infekcí byla v Číně efektivně použita ATB terapie ceftriaxonem (CTR), doxycyklinem a rifapentinem. Na základě těchto poznatků několik zpráv předpokládá, že kombinovaná terapie rifampicinem a doxycyklinem po dobu šesti týdnů je dostatečná k eradikaci infekce způsobenou rodem *Brucella* i souvisejících komplikací. Uvedená kombinace doxycyklinu a rifampicinu byla rovněž experimentálně ověřena. Třebaže je v praxi používáno několik terapeutických prostředků, díky nimž je onemocnění léčitelné, je pro úplnou léčbu brucelózy zapotřebí účinný terapeutický prostředek (Khan a Zahoor, 2018; Bhave a Khillare; Erkyihun *et al.*, 2022; Azimi *et al.*, 2018; Meng *et al.*, 2018; Kaya *et al.*, 2018).

6.3 Kontrola a prevence

6.3.1 Kontrola a prevence u zvířat

Cílem kontroly brucelózy u zvířat je především předejít vzniku onemocnění, které má dopad na lidské zdraví, a snížit ekonomické ztráty. Prevenci a kontrolu brucelózy je možno uskutečnit na základě pochopení regionálních a místních rozdílů v společenských zvyklostech, chovatelských postupech, infrastruktúře a epidemiologických vzorcích onemocnění. Obvyklé přístupy ke kontrole brucelózy zahrnují hygienickou likvidaci potracených plodů, plodových obalů a výkalů s následnou dezinfekcí kontaminovaného prostoru, karanténu dovážených zvířat

a rozhodnutí pro nebo proti imunizaci negativních zvířat. Druhou důležitou strategií pro tlumení je zkvalitnění kontroly pohybu zvířat veterinárními pracovníky ve stádech i mimo ně a zavedení vhodných diagnostických služeb. Sem se řadí standardizace řízení kvality diagnostických souprav/reagencí a vakcín (Bayu, 2018; Erkyihun *et al.*, 2022; Elbehiry *et al.*, 2018; Avila-Granados *et al.*, 2019).

6.3.2 Imunizace

Potlačení brucelózy lze dosáhnout pomocí vakcinace, která posiluje imunitu populace vůči této nákaze, tudíž minimalizuje riziko potratů a šíření infekce. Aktuálně neexistuje žádná účinná vakcína určená pro lidské pacienty, třebaže pro hospodářská zvířata je k dispozici několik vakcín proti bakterii rodu *Brucella*. Navzdory tomu, že existují účinné vakcíny zabráňující šíření brucelózy, nebyla tato choroba ve většině zemí světa vymýcena. Existující vakcíny mají několik nevýhod, například interference s imunitní odpovědí navozenou diagnostickými metodami, jiné způsobují potraty u březích zvířat, zatímco imunita, kterou vytvářejí, nechrání očkovaný skot po celý jeho reprodukční život. Aby mohla být vakcína použita musí splňovat určité vlastnosti (tabulka č.6). Mezi běžně používané vakcíny proti brucelóze zvířat patří živé neboli atenuované vakcíny zbavené faktorů virulence (*B. abortus* kmen 19, *B. abortus* kmen RB51, *B. abortus* 45/20, *B. suis* S-2, oslabený kmen *B. melitensis* kmen Rev.1 a surový kmen *B. melitensis* M111), přičemž *B. abortus* kmen S19, *B. abortus* kmen RB51 jsou nejčastěji používané u vakcinace skotu (Głowacka *et al.*, 2018; Bayu, 2018; Erkyihun *et al.*, 2022; López-Santiago *et al.*, 2019; Khan a Zahoor, 2018; Saxena a Raj, 2018; Gómez *et al.*, 2018).

Tabulka 6 Vlastnosti vakcíny proti rodu Brucella (upraveno dle López-Santiago et al., 2019)

Vlastnosti vakcíny proti rodu <i>Brucella</i>
1. Musí být vytvořena živými bakteriemi schopnými vyvolat silnou imunitní odpověď typu <i>Th1</i> .
2. Nesmí vyvolávat tvorbu protilátek, které by mohly interferovat s diagnostickými testy k odhalení infikovaných zvířat, a to bez ohledu na způsob nebo dávkování a věk zvířat.
3. Musí se jednat o oslabený kmen, který nevyvolává onemocnění ani <i>perzistentní</i> infekci u zvířat.
4. Musí být pro člověka nepatogenní, což zabrání náhodné <i>kontaminaci</i> při podání vakcíny.
5. Musí navodit dlouhodobou imunitu pouze jednou dávkou, aniž by způsobovala potraty, a to i při podání březím samicím.
6. Při použití posilovacích dávek nesmí vyvolat tvorbu protilátek.
7. Musí být stálá a nesmí se vracet do virulentního stavu <i>in vitro</i> nebo <i>in vivo</i> .
8. Musí být cenově dostupná pro její masové použití a snadno vyrobiteľná a podávaná.

***B. abortus* S19**

Uvedený kmen byl původně izolován roku 1923 z mléka. Kmen *B. abortus* S19 byl izolován náhodně, poté co byl virulentní kmen ponechán rok při pokojové teplotě, během čehož došlo k delecí 720 bp v katabolických genech pro erythritol. Jeho použití jako očkovací látky u skotu začalo v roce 1941. Kmen S19 je indikovaný pro použití u telat, protože u dospělých samců způsobuje epididymitidu a u březích samic je spojován s potraty. Živočichové očkování kmenem *B. abortus* S19 produkují protilátky proti LPS, a to vzhledem k tomu, že kmen se vyskytuje v formě S (hladké), není proto možné rozlišit mezi zvířaty očkoványými tímto kmenem a přirozeně infikovanými zvířaty. Nově došlo ke zjištění, že imunitní odpověď se liší mezi plemeny skotu, neboť plemeno Shawial reagovalo na vakcínu S19 méně než kříženci (Moreno *et al.*, 2022; Gheibi *et al.*, 2018; López-Santiago, 2019; Kumar *et al.*, 2020; Jacob a Curtiss, 2021; Chacón-Díaz *et al.*, 2021; Shome *et al.*, 2023).

***B. abortus* RB51**

Příslušný kmen *B. abortus* RB51 byl získán postupnou subkultivací virulentního hladkého kmene *B. abortus* 2308 na kultivační médium s rifampicinem a penicilinem (PEN), kdy byl poté izolován ve formě jediné hrubé kolonie. Tento kmen RB51 se vyskytuje v formě R (drsne) a není u něj přítomen polysacharidový řetězec O LPS. Má vysokou stabilitu a nedochází u něj k návratu k virulentnímu kmenu vyskytujícímu se v formě S (hladké).

Nepřítomnost O-řetězce tak neindikuje tvorbu protilátek, což nám umožňuje rozlišit mezi přirozeně infikovanými a očkovanými zvířaty. Zato však kmen vyvolává silnou buněčnou odpověď typu Th1, která propůjčuje vysokou ochranou účinnost. Taková účinnost je způsobena navozením odpovědi interferonu gama (IFN- γ), která vede k aktivaci cytotoxických T lymfocytů, jež likvidují infikované buňky, a zvýšením baktericidní aktivity makrofágů. Značnou nevýhodou je skutečnost, že byl vybrán jako rezistentní k rifampicinu, neboť v případě, že nelze podat streptomycin, je antibiotikem první volby proti brucelóze (Gheibi *et al.*, 2018; López-Santiago, 2019; Averaimo *et al.*, 2022; Ghobrial *et al.*, 2023; Olsen a Boggiatto, 2022; Dorneles *et al.*, 2021).

***B. abortus* 45/20**

Jedná se o kmen odvozený z izolovaného ve formě S získaného z infikované krávy (tzv. 45) v roce 1922. Po subkultivaci přes morče byl získán kmen 45 a po 20 pasážích se izolovala bakterie ve formě fenotypového projevu R; z tohoto důvodu byl kmen pojmenován 45/20. U tohoto kmene bylo nutné ho podávat inaktivovaný zahříváním spolu s adjuvans. Bohužel analýzy týkající se ochrany a protilátkové odpovědi vykazovaly vysokou míru variability, což zpochybnilo účinnost vakcíny. Mimo jiné se u některých zvířat projevil alergické reakce v místě vpichu vakcíny. Kvůli těmto nepříjemnostem bylo využití tohoto kmene jako vakcíny pozastaveno (López-Santiago, 2019; Maruf *et al.*, 2019; Veselovsky *et al.*, 2020; Stranahan a Arenas-Gamboa, 2021).

6.3.3 Kontrola a prevence prováděna u lidí

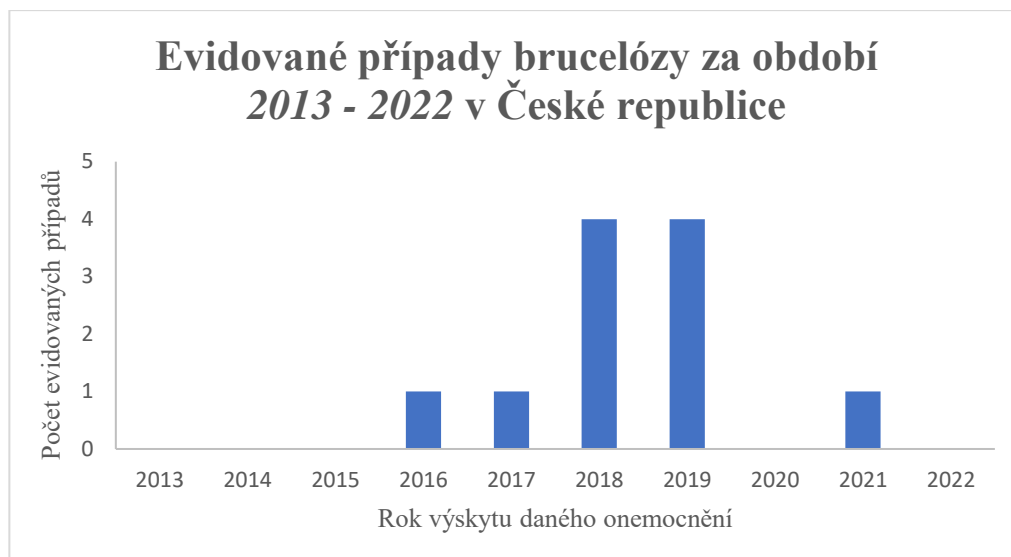
Klíčovým úkolem v endemických oblastech je kontrola brucelózy. K tlumení brucelózy u člověka je zapotřebí tlumit onemocnění zvířat a zamezit jeho přenosu na člověka. Díky dlouhodobým a nákladným programům vakcinace zvířat a pozdějšímu vybíjení infikovaných zvířat se podařilo brucelózu v malém počtu ekonomicky vyspělých zemí zvládnout nebo dokonce vymýtit. Pro prevenci nákazy lidí má velký význam hygiena potravin, zejména pasterizace mléka, mléčných výrobků a sterilizace masa před jeho konzumací. Pokud živočišné produkty určené ke konzumaci člověkem neprošli těmito úpravami neměli by být vůbec konzumovány. Také pravidelná sterilizace laboratorních nástrojů a laboratorního nádobí by vedla ke snížení rizika infekce u pracovníků laboratorních klinik. Aby bylo možné zvládnout takovou nákazu, jako je brucelóza, je nutné vyžadovat přístup "*Jedno zdraví*". "*Jedno zdraví*" představuje koncept založený na propojení zdraví lidí a zvířat, rostlin a ekosystémů a prosazuje

společné úsilí na místní, národní a globální multidisciplinární úrovni s cílem dosáhnout optimální úrovně zdraví a spolupráce mezi různými obory při řešení komplexních zdravotních problémů. Pro využití tohoto konceptu v souvislosti s brucelózou je mimořádně důležitá přesná identifikace zdrojů nákazy a příprava cílených strategií pro tlumení nákazy u zvířat. Existují důkazy o tom, že v oblasti řízení nákazy může správný přístup a účinné zásahy vést k redukci případů brucelózy (Dadar *et al.*, 2021; O'Callaghan, 2020; Ghanbari *et al.*, 2020; Khan a Zahoor, 2018; Bhave a Khillare).

7 Výskyt brucelózy v České republice

Onemocnění brucelóza je celosvětově rozšířené zoonotické onemocnění, které je nejvíce zaznamenávané v takzvaných endemických oblastech, mezi které se řadí Jižní a Střední Amerika, oblasti okolo Středozevního moře a Střední a Blízký východ. Oproti tomu ve vyspělých zemích, mezi něž je řazena i Česká republika, byla brucelóza u hospodářských zvířat vymýcena zhruba před 60 lety, díky zavedeným veterinárním opatřením. V současné době se brucelóza lidí v České republice omezuje na ojedinělé importované případy, kdy k přenosu došlo buď potřísněním oční spojivky či potřísněním kůže tělními tekutinami nebo exkrety nemocných zvířat, vdechnutím aerosolu, pozřením syrového mléka infikovaných zvířat či nepasterizovaných výrobků z něho připravených. V porovnání s mléčnými výrobky je konzumace masa více bezpečná, kvůli nízkému obsahu bakterií. Mezi rizikové skupiny ohroženy profesionální brucelózou jsou řezníci, ošetřovatelé dobytka, veterináři a laboratorní pracovníci. Velmi ojedinělý přenos je z matky na dítě při porodu či pohlavním stykem (Zhang *et al.*, 2021; Shojaei *et al.*, 2022; Amonov *et al.*, 2022; Vráblíková *et al.*, 2020; Stárek, 2019).

Přestože že se v České republice brucelóza již několik let nevyskytuje, lze se nakazit v zahraničí a v Česku se tak následně může objevit jako importovaná nákaza (obrázek č.17). Příkladem, kdy byla brucelóza u člověka na našem území zaznamenána je rok 2018. V tomto roce se skupina čtyř českých turistů z Opavska, nakazila brucelózou při cestování po Arménii, kde konzumovali nepasterizované mléko a mléčné výrobky z horských farem. Jednalo se především o kozí mléko a mléčné výrobky z něj vyrobené. Onemocnění se u jedné z postižených osob projevovalo jako únava, bolest v kyčli, následně horačka, bolest hlavy a kašel, na základě čehož byla stanovena diagnostika zánět mozkových blan. U pacienta byla provedena symptomatická léčba, po níž bylo pozorováno zlepšením zdravotního stavu, ovšem nedlouho poté došlo k relapsu. Konečnou diagnózu se povedlo stanovit koncem roku, kdy ve spolupráci s veterináři, byli provedeny testy na brucelózu běžně používaných ve veterinární praxi. U zbylých pacientů byl průběh onemocnění mírnější a projevoval se přetrvávající únavou, občasně zvýšenou teplotou a bolestí kloubů. (Stárek, 2019)



Obrázek 16 Graf zobrazující evidované případy brucelózy na území České republika v letech 2013 – 2022 (vytvořeno dle zdroje *Infekce v ČR – ISIN, 2022; Infekce v ČR - ISIN, 2023*).

7.1 Kazuistiky

7.1.1 První případ onemocnění – žena, narozena 1998

První případ onemocnění byl zaznamenán u studentky vysoké školy narozené 1998. V den 24.9.2018 byla žena přijata pro nespécifické příznaky, které pociťovala od 20.9.2018 na infekční oddělení Slezské nemocnice v Opavě. Příznaky, se kterými byla dotyčná přijata byli teplota 38,5 °C, bolest hlavy, únava, hypotenze a pocit slabosti. Později se přidaly bolesti nohou, bolesti pravého kyčelního kloubu, parestezie, vertigo a mírný kašel s bolestí v krku. Výsledky laboratorních vyšetření vykazovaly známky jaterní poruchy a nízkou hladinu zánětlivých parametrů. Po vyšetření mozkomíšního moku byl pacientce diagnostikován aseptický zánět mozkových blan (aseptická meningitida) a dne 11.10.2018 byla propuštěna do domácí péče (Vráblíková *et al.*, 2020).

Dne 18.10.2019 musela být pacientka znovu hospitalizována na infekčním oddělení Slezské nemocnice v Opavě, neboť po vysazení léků se u pacientky začali znovu objevovat zimnice, silné bolesti hlavy, teplota, třes, bolest stehna, kyčle a páteře. Opětovným vyšetřením byla potvrzena aseptická meningitida. Toto zjištění mělo za následek zahájení standardní léčby a usilovné pátrání po potencionálním původci, 9.11.2018 byla pacientka pro zlepšení stavu z nemocnice propuštěna (Vráblíková *et al.*, 2020).

K opětovné znovu hospitalizována do nemocnice došlo 14.11.2018 pro další ataku onemocnění s přidruženou kožní vyrážkou. Byla provedena lumbální punkce, kterou se opět potvrdil aseptický zánět mozkových blan. Serologické testy, provedené na případné zoonózy

vycházeli negativně. Ovšem pro podezření na jiný typ brucelózy, došlo k zahájení spolupráce s laboratoří Státního veterinárního ústavu (SVÚ) v Olomouci. V SVÚ byli provedeny metody RBT, reakce vazby na komplement (RVK nebo též CFT) a pomalá aglutinace, které měly pozitivní výsledek a tím se potvrdilo onemocnění brucelóza (Vráblíková *et al.*, 2020).

Po propuštění pacientky 14.12.2018 bylo zahájeno epidemiologické šetření, pomocí kterého se zjistilo že dotyčná absolvovala individuální turistický pobyt v období 1.7.2018 – 18.7.2018 v Jerevanu (hlavní město Arménie), v Geghamských horách, na západním pobřeží jezera Serevan. Zde spolu se třemi spolucestujícími konzumovala nepasterizované ovčí, kozí, kobyli a kravské mléko a mléčné výrobky od tamních pastevců (Vráblíková *et al.*, 2020).

7.1.2 Druhý případ onemocnění – žena, narozena 1998

Druhým případ je zaznamenán u studentky vysoké školy, narozené 1998, která cestovala s první pacientkou. V tomto případě se od 26.10.2018 projevovali zdravotní potíže typu slabost, schvácenost, horečka až 40 °C obzvláště v pozdních hodinách a suchý kašel. Na začátku listopadu dotyčná navštívila svého praktického lékaře. Ten diagnózu uzavřel jako „viróza“. I poté potíže u pacientky přetrvávali, a navíc se přidružily další zdravotní potíže, jako jsou otoky kotníků a bolesti kloubů. Byla hospitalizována na infekčním oddělení od 19.12.2018 do 21.12.2018 v nemocnici v Opavě, kde se podařilo ve spolupráci s laboratoří Státního veterinárního ústavu cíleně diagnostikovat onemocnění brucelózou (Vráblíková *et al.*, 2020).

7.1.3 Třetí případ onemocnění – muž, narozený 1963

Brucelóza byla pozorována i u dalšího spolucestujícího první pacientky, a to muže narozeného 1963. Ten od 18.9.2018 pociťoval bolest obou kolenních kloubů, pravého kotníku a celkovou únavu. V tomto případě byl po cíleném vyšetření dne 19.12.2018 zaregistrován pozitivní nález *B. abortus* (Vráblíková *et al.*, 2020).

7.1.4 Čtvrtý případ onemocnění – žena, narozena 1961

Poslední pozitivní na brucelózu z této skupiny je středoškolská učitelka a účetní, narozena 1961. U této pacientky byly cíleně dne 19.12.2018, SVÚ Olomouc provedeny serologické vyšetření na brucelózu ovšem s negativním výsledkem (Vráblíková *et al.*, 2020).

První příznaky onemocnění se začaly objevovat 25.12.2018. Jako u předchozích případů i zde byl prvotním symptomem celková únava, dále doplněná nezvyklými intermitentními bolestmi hlavy, vleklými subferbriliemi do 37,8 °C (Vráblíková *et al.*, 2020).

V den 21.1.2019 se u pacientky znovu provedlo serologické vyšetření RBT a pomalá aglutinace. Tentokrát testy vyšli pozitivně čímž byla potvrzena brucelóza, kterou se však nepodařilo blíže určit (Vráblíková *et al.*, 2020).

8 ZÁVĚR

Cílem bakalářská práce zpracované na téma *Brucella abortus* bylo bližší seznámení se s jednou ze čtyř bakterií, která se řadí mezi hlavní původce brucelózy. Ta se postupem času, díky veterinárním opatřením, eradikačním programům a monitoringu nákazy stala jednou z opomíjených nákaz. Ovšem kvůli nedávnému výskytu tohoto onemocnění v České republice, kde se řadí mezi tzv. prosté nákazy, je důležité se nad daným tématem pozastavit a znovu si připomenout podstatné informace. I když se v současné době onemocnění na našem území běžně nevyskytuje, je možné jej v ojedinělých případech zaznamenat. Hlavní příčinu výskytu představuje zejména konzumace mléka a mléčných výrobků od zvířat chovaných v zemích, v nichž tato bakterie představuje riziko pro lidské zdraví. Dle použitých zdrojů je možné dohledat výskyt onemocnění na našem území. Na základě nejnovějších informací lze říct, že až na několik případů se onemocnění u nás v současné době nevyskytuje.

Dle dostupných zdrojů se *Brucella abortus* řadí mezi gramnegativní, fakultativně intracelulární, aerobní, nesporulující bakterie, vyskytující se ve formě tyčinek. Ty využívají celou škálu faktorů virulence, pomocí nichž poškozují organismus příslušného jedince. V této práci jsou popsány především dva hlavní faktory, které jsou pro bakterie rodu *Brucella* charakteristické a zároveň mají souvislost s patogenezí a klinickými projevy. U patogeneze je prioritní se zaměřit na možnosti přenosu, klinické projevy nákazy a patologické změny u zvířat. Zvířata, obzvláště skot, představují rezervoár onemocnění pro člověka. Brucelózou jsou nejvíce ohroženi lidé, kteří jsou s infikovanými zvířaty každodenně v těsném kontaktu, tedy zejména veterináři, chovatelé zvířat, zaměstnanci jatek či laboratorní pracovníci. V České republice je díky eradikačním programům toto riziko minimalizováno.

Významnou kapitolu práce tvoří diagnostika, která představuje podstatnou složku pro tlumení, eradikaci a včasné rozpoznání bakterie *Brucella abortus*. Diagnostických vyšetření, která je možno použít, je celá řada. Vhodnou diagnostickou metodu je možné si zvolit v závislosti na vyšetřovaném materiálu, přesnosti a rychlosti stanovení. Ze zdrojů použitých ke zpracování této práce je patrné, že velké množství metod lze považovat za nepřesné, protože u zvířat nedokážou rozlišit vakcinované od infikovaných jedinců. Dle získaných informací se v praxi nejčastěji uplatňují metody molekulárně biologické. Pro diagnostiku onemocnění hraje taktéž podstatnou roli anamnéza, která může být v případě nespecifických příznaků vodítkem pro správnou diagnostiku a následnou léčbu, nebo také prevenci.

Léčba je poměrně náročná, a to především z důvodu užívání antibiotik, která musí být podávána dlouhodobě a v dostatečném množství. U zvířat se léčba neprovádí, kvůli vysokým

rizikům neúspěšné léčby, vysokým nákladům na léčbu, a následným udržováním nemocného zvířete. Aby bylo možné se nákaze vyhnout, či jej úplně vymýtit, představuje zde klíčovou roli prevence a kontrola. Prevence je podstatou zdravého chovu a úplné eradikace.

Z uvedených skutečností vyplývá, že brucelóza vyvolaná druhem *Brucella abortus* by měla být pro svůj každoroční počet nakažených stále aktuálním tématem, které by se nemělo opomíjet. Zároveň je důležité veřejnost informovat o skutečnosti, že díky její vysoké odolnosti, přežívání ve formě aerosolu a malé infekční dávce představuje vysoké riziko bioterorismu.

POUŽITÁ LITERATURA

ABAKER, Maha Hassan Abd Alrahim, et al. Development of National Diagnostic Standard Operating Procedures (SOPs) for Isolation, Identification and Typing of *Brucella* Isolates. 2021. PhD Thesis. Sudan University of Science & Technology.

ABDULKALIQ AWADH, Halah, et al. Molecular identification of intracellular survival related *Brucella melitensis* virulence factors. *Biomedicine*, 2022, 42.4: 761-765.

ADEM, A.; DUGUMA, A. Characteristics and intracellular life of *Brucella* organism: a review. *J. Microb. Biochem. Technol*, 2020, 12.3: 431.

AFSHARI, Hossein; MALEKI, Masoud; SALOUTI, Mojtaba. Immunological effects of two new nanovaccines against *Brucella* based on OPS and LPS antigens conjugated with PLGA nanoparticles. *European Polymer Journal*, 2020, 139: 110021.

ALI, Shahzad, et al. Molecular Typing of *Brucella abortus* Strains Isolated from cattle in different districts of Pakistan based on Bruce-Ladder-PCR and MLVA-16 Assays. *Pak Vet J*, 2019, 39: 463-5.

ALIYEV, Jeyhun, et al. Identification and molecular characterization of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* isolated from milk in cattle in Azerbaijan. *BMC Veterinary Research*, 2022, 18.1: 1-9.

AL-JODA, Ban Mahmood Shaker; JASIM, Aziz H. Biochemical testing revision for identification several kinds of bacteria. *Journal of University of Babylon for Pure and Applied Sciences*, 2021, 29.2: 168-176.

ALKASHER, Imbarkah; BADI, Wejdan. Gram-positive vs gram-negative. 2020.

ALMASHHADANY, Dhary Alewy; ZEFENKEY, Zean Fetehallah; ODHAH, Mohammed Naji Ahmed. Epidemiological study of human brucellosis among febrile patients in Erbil-Kurdistan region, Iraq. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 2022, 16.07: 1185-1190.

AL-MOSSAWY, Furat K.; MOHAMMED, Nadira S.; AL-ZUBAIDY, Ibrahim A. Determination of *Brucella. abortus* Biovars infected human in the middle and southern of Iraq. *Journal of Biotechnology Research Center*, 2019, 13.2: 17-25.

AMJADI, Omolbanin, et al. A review of the immunopathogenesis of Brucellosis. *Infectious Diseases*, 2019, 51.5: 321-333.

AMONOV, Sobirjon; MAJIDOVA, Dilnoza; SARIBOYEV, Faxriddin. PREVENTION OF BRUCELOSIS. *Science and innovation in the education system*, 2022, 1.6: 133-135.

ANANTHA, Tejashree, et al. A fatal, rare case of bilateral, upper, lower limbs and abdominal gangrene associated with brucellosis. *Journal of Laboratory Physicians*, 2019, 11.04: 388-390.

ASLANTÜRK, Özlem Sultan. *In vitro* cytotoxicity and cell viability assays: principles, advantages, and disadvantages. *Genotoxicity-A predictable risk to our actual world*, 2018, 2: 64-80.

AVERAIMO, Daniela, et al. Detection of *Brucella abortus* Vaccine Strain RB51 in Water Buffalo (*Bubalus bubalis*) Milk. *Pathogens*, 2022, 11.7: 748.

AVILA-GRANADOS, Lisa M., et al. Brucellosis in Colombia: Current status and challenges in the control of an endemic disease. *Frontiers in veterinary science*, 2019, 6: 321.

AZIMI, Gholamhassan, et al. Bioassay-directed isolation of quaternary benzyloquinolines from *Berberis integerrima* with bactericidal activity against *Brucella abortus*. *Research in Pharmaceutical Sciences*, 2018, 13.2: 149.

BAYU, M. D. Overview on common pathological changes and diagnostic methods of caprine and ovine Brucellosis. *J Veter Sci Med*, 2018, 6.2: 12.

BHALLA, Gurpreet S., et al. Methods of phenotypic identification of non-tuberculous mycobacteria. *Practical Laboratory Medicine*, 2018, 12: e00107.

BHAVE, Sujata; KHILLARE, Rajpal S. BRUCELLOSIS: ITS ZOONOTIC AND PUBLIC HEALTH SIGNIFICANCE.

BOSILKOVSKI, Mile; KERAMAT, Fariba; ARAPOVIĆ, Jurica. The current therapeutical strategies in human brucellosis. *Infection*, 2021, 49.5: 823-832.

BRINK, Benita. Urease test protocol. *American society for microbiology*, 2010, 1-7.

BUTTIGIEG, Sandra C., et al. Brucellosis control in Malta and Serbia: a One Health evaluation. *Frontiers in veterinary science*, 2018, 5: 147.

COLOMA-RIVERO, Roberto F., et al. *Brucella* and its hidden flagellar system. *Microorganisms*, 2022, 10.1: 83.

CUI, Ming-Juan, et al. A quantitative, high-throughput urease activity assay for comparison and rapid screening of ureolytic bacteria. *Environmental Research*, 2022, 208: 112738.

DADAR, Maryam, et al. Importance of brucellosis control programs of livestock on the improvement of one health. *Veterinary Quarterly*, 2021, 41.1: 137-151.

DE MACEDO, Auricelio Alves, et al. *Brucella-associated* cervical bursitis in cattle. *Tropical animal health and production*, 2019, 51: 697-702.

DE NARDI JÚNIOR, Gerado, et al. Comparison of Brucella agar, CITA and Farrell media for selective isolation of *Brucella abortus* from semen of bovine bulls. African Journal of Microbiology Research, 2015, 9.9: 617-620.

DE OLIVEIRA, Thalita Evani Silva, et al. Infectious Disease Agents Associated with Pulmonary Alterations in Aborted Bovine Fetuses. Animals, 2022, 12.13: 1596.

DI BONAVENTURA, Giovanni, et al. Microbiological laboratory diagnosis of human brucellosis: An overview. Pathogens, 2021, 10.12: 1623.

DORNELES, Elaine, et al. Efficacy of *Brucella abortus* S19 and RB51 vaccine strains: a systematic review and meta-analysis. Authorea Preprints, 2021.

DUCROTOY, Marie J., et al. A systematic review of current immunological tests for the diagnosis of cattle brucellosis. Preventive veterinary medicine, 2018, 151: 57-72.

DUNCOMBE, Lucy. Characterisation of a unique epitope at the non-reducing end of the *Brucella* O-polysaccharide. 2020.

ELBEHIRY, Ayman, et al. The Development of Diagnostic and Vaccine Strategies for Early Detection and Control of Human Brucellosis, Particularly in Endemic Areas. Vaccines, 2023, 11.3: 654.

EL-SAYED, Amr; AWAD, Walid. Brucellosis: Evolution and expected comeback. International journal of veterinary science and medicine, 2018, 6.sup1: S31-S35.

ERKYIHUN, Gashaw Adane; GARI, Fikru Regassa; KASSA, Gezahegne Mamo. Bovine brucellosis and its public health significance in Ethiopia. Zoonoses, 2022.

ESMAEILNEJAD-GANJI, Seyed Mokhtar; ESMAEILNEJAD-GANJI, Seyed Mohammad Reza. Osteoarticular manifestations of human brucellosis: a review. World journal of orthopedics, 2019, 10.2: 54.

EVURANI, S. Amuche, et al. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria from Kunun-Zaki on selected clinical pathogens. South Asian Journal of Research in Microbiology, 2019, 3.4: 1-8.

FERRERO, Mariana C., et al. Pathogenesis and immune response in *Brucella* infection acquired by the respiratory route. Microbes and Infection, 2020, 22.9: 407-415.

GHANBARI, Mahboubeh Khaton, et al. One health approach to tackle brucellosis: a systematic review. Tropical medicine and health, 2020, 48: 1-10.

GHEIBI, Azam, et al. Development of new generation of vaccines for *Brucella abortus*. Heliyon, 2018, 4.12: e01079.

GHOBRIAL, Ramy F., et al. Comparative Immune Responses and Cytokine Gene Expressions in Sheep Vaccinated with *Brucella abortus* RB51 Vaccine and *Brucella melitensis* Rev. 1 Vaccine. *Journal of Advanced Veterinary Research*, 2023, 13.1: 1-8.

GIULIANO, Christopher; PATEL, Chandni R.; KALE-PRADHAN, Pramodini B. A guide to bacterial culture identification and results interpretation. *Pharmacy and Therapeutics*, 2019, 44.4: 192.

GŁOWACKA, Patrycja, et al. –Virulence Factors, Pathogenesis and Treatment. *Polish journal of microbiology*, 2018, 67.2: 151-161.

GÓMEZ, Leonardo, et al. Brucellosis vaccines based on the open reading frames from genomic island 3 of *Brucella abortus*. *Vaccine*, 2018, 36.21: 2928-2936.

GONZÁLEZ-ESPINOZA, Gabriela, et al. *Brucella*: Reservoirs and niches in animals and humans. *Pathogens*, 2021, 10.2: 186.

GÜLBAZ, Güven. Kars yöresinde satışı sunulan çiğ süt, peynir ve tereyağında *brucella* türlerinin izolasyonu identifikasyonu ve moleküler tekniklerle belirlenmesi.

HANDAYANI, Tri; PRIYOATMOJO, Dadang; TRINUGRAHA, Afi Candra. Outer Membrane Protein (OMP) Profiles of *Brucella abortus* Local Isolate by SDS-PAGE Procedure. In: *International Conference on Improving Tropical Animal Production for Food Security (ITAPS 2021)*. Atlantis Press, 2022. p. 28-31.

HAO, Tiantian, et al. Synthesis and immunogenicity of *Brucella* monovalent neoglycoconjugate. *Carbohydrate Research*, 2021, 499: 108196.

HASAN, THUALFAKAR HAYDER; KADHUM, H.; ALASEDI, KASIM KADHIM. *Brucella* spp. virulence factors. *International Journal of Pharmaceutical Research*, 2021, 13.1.

HOSSAIN, Akbar, et al. Isolation, characterization and purification of *Rhizobium* strain to enrich the productivity of groundnut (*Arachis hypogaea* L.). *Open Agriculture*, 2019, 4.1: 400-409.

HULL, Noah C.; SCHUMAKER, Brant A. Comparisons of brucellosis between human and veterinary medicine. *Infection ecology & epidemiology*, 2018, 8.1: 1500846.

HUY, Tran XN, et al. *Brucella* Phagocytosis Mediated by Pathogen-Host Interactions and Their Intracellular Survival. *Microorganisms*, 2022, 10.10: 2003.

CHACÓN-DÍAZ, Carlos, et al. *Brucella abortus* S19 GFP-tagged vaccine allows the serological identification of vaccinated cattle. *Plos one*, 2021, 16.11: e0260288.

Infekce v ČR – ISIN (dříve EPIDAT): Výskyt vybraných hlášených infekcí v České republice, leden - březen 2023 porovnání se stejným obdobím v letech 2014-2022 (počet

případů). Státní zdravotní ústav SVÚ [online]. 2.4.2023 [cit. 2023-04-30]. Dostupné z: <https://szu.cz/publikace/data/infekce-v-cr/>

Infekce v ČR – ISIN (dříve EPIDAT): Výskyt vybraných hlášených infekcí v České republice, leden - prosinec 2022 porovnání se stejným obdobím v letech 2013-2021 (počet případů). Státní zdravotní ústav SVÚ [online]. 12.2.2023 [cit. 2023-04-30]. Dostupné z: <https://szu.cz/publikace/data/infekce-v-cr/>

ISLAM, Md Sadequl, et al. First isolation, identification and genetic characterization of *Brucella abortus* biovar 3 from dairy cattle in Bangladesh. *Veterinary Medicine and Science*, 2019, 5.4: 556-562.

ISMAIL, Y. S.; YULVIZAR, C.; MAZHITOV, B. Characterization of lactic acid bacteria from local cow s milk kefir. In: IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. IOP Publishing, 2018. p. 012019.

JACOB, Jessica M.; CURTISS 3RD, Roy. Characterization of *Brucella abortus* S19 as a challenge strain for use in a mouse model of brucellosis. *Microbes and Infection*, 2021, 23.4-5: 104809.

JIAO, Hanwei, et al. The mechanism of facultative intracellular parasitism of *Brucella*. *International journal of molecular sciences*, 2021, 22.7: 3673.

JÚNIOR, G. Nardi, et al. Performance of microbiological, serological, molecular, and modified seminal plasma methods in the diagnosis of *Brucella abortus* in semen and serum of bovine bulls. *Biologicals*, 2017, 48: 6-9.

KADEN, Rene, et al. *Brucella abortus*: determination of survival times and evaluation of methods for detection in several matrices. *BMC Infectious Diseases*, 2018, 18.1: 1-6.

KAYA, Safak, et al. Cytopenia in adult brucellosis patients. *The Indian Journal of Medical Research*, 2018, 147.1: 73.

KHAN, Muhammad Zahoor; ZAHOOR, Muhammad. An overview of brucellosis in cattle and humans, and its serological and molecular diagnosis in control strategies. *Tropical medicine and infectious disease*, 2018, 3.2: 65.

KHURANA, Sandip Kumar, et al. Bovine brucellosis—a comprehensive review. *Veterinary Quarterly*, 2021, 41.1: 61-88.

KUMAR, D. Ravi, et al. Differential expression of cytokines in PBMC of *Bos indicus* and *Bos taurus* × *Bos indicus* cattle due to *Brucella abortus* S19 antigen. *Animal Biotechnology*, 2020, 31.2: 148-154.

KUMARESAN, Mahalakshmi, et al. Incidental Laboratory Identification of *Brucella melitensis* in a Case With Pancytopenia. Journal homepage: <http://www.ijcma.com>, 10.10: 2021.

KURMANOV, Berzhan, et al. Assays for identification and differentiation of *Brucella* species: A review. *Microorganisms*, 2022, 10.8: 1584.

LAI, Shengjie; CHEN, Qiulan; LI, Zhongjie. Human brucellosis: an ongoing global health challenge. *China CDC Weekly*, 2021, 3.6: 120.

LAPAQUE, Nicolas, et al. *Brucella* lipopolysaccharide acts as a virulence factor. *Current opinion in microbiology*, 2005, 8.1: 60-66.

LECLERCQ, Sébastien O.; CLOECKAERT, Axel; ZYGMUNT, Michel S. Taxonomic organization of the family *Brucellaceae* based on a phylogenomic approach. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 10: 3083.

LEDWABA, Maphuti Betty, et al. Investigating selective media for optimal isolation of *Brucella* spp. in South Africa. 2020.

LEGESSE, Abinet, et al. Comparative Evaluation of RBPT, I-ELISA, and CFT for the Diagnosis of Brucellosis and PCR Detection of *Brucella* species from Ethiopian Sheep, Goats, and Cattle sera. 2022.

LINDAHL, Johanna F., et al. Risk factors for *Brucella* seroprevalence in peri-urban dairy farms in five Indian cities. *Tropical medicine and infectious disease*, 2019, 4.2: 70.

LIU, Zhi-guo, et al. Seroprevalence of human brucellosis and molecular characteristics of *Brucella* strains in Inner Mongolia Autonomous region of China, from 2012 to 2016. *Emerging Microbes & Infections*, 2020, 9.1: 263-274.

LÓPEZ-SANTIAGO, Rubén, et al. Immune response to mucosal *brucella* infection. *Frontiers in Immunology*, 2019, 10: 1759.

MAHA, Abd Alrahim, et al. Evaluation of six culture media for supporting the isolation of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis*. 2021.

MARUF, A. A., et al. Comparison of humoral immune responses between heat-inactivated *Brucella abortus* biovar 3 and strain RB51 vaccines in indigenous cattle of Bangladesh. *J. Vet. Med. OH Res*, 2019, 1.2: 247-259.

MAZLAN, Mazlina, et al. Pathological changes, distribution and detection of *Brucella melitensis* in foetuses of experimentally-infected does. *Veterinary Quarterly*, 2021, 41.1: 36-49.

MENG, Fanjie; PAN, Xiangpo; TONG, Wenzhen. Rifampicin versus streptomycin for brucellosis treatment in humans: A meta-analysis of randomized controlled trials. *PLoS One*, 2018, 13.2: e0191993.

MENG, Yang; ZHUQING, He. Exploration Practice of Diagnosis, Treatment and Prevention of Bovine *Brucella*. In: E3S Web of Conferences. EDP Sciences, 2020. p. 03047.

MILLAR, Michael; STACK, Judy. Brucellosis—what every practitioner should know. *In Practice*, 2012, 34.9: 532-539.

MIRZAEI, Rasoul, et al. Immunometabolism in human brucellosis: an emerging field of investigation. *Microbial Pathogenesis*, 2021, 158: 105115.

MORENO, Edgardo; BARQUERO-CALVO, Elías. The role of neutrophils in brucellosis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2020, 84.4: e00048-20.

MORENO, Edgardo; BLASCO, José-María; MORIYÓN, Ignacio. Facing the human and animal brucellosis conundrums: the forgotten lessons. *Microorganisms*, 2022, 10.5: 942.

MUSTAFA, S., et al. Brucellosis in Cattle and Buffaloes. *One Health Triad*, Unique Scientific Publishers, Faisalabad, Pakistan, 2023, 2: 25-33.

NAJUM, A. A. Serological, bacteriological and molecular study of aborted cows, buffalos and women infected with *Brucella*. *Al-Qadisiyah Journal of Veterinary Medicine Sciences*, 2012, 11.2: 167-176.

NAZ, S., et al. Comparison of molecular and serological tests for detection of *Brucella abortus* in asymptomatic bovine breeding bulls. *JAPS: Journal of Animal & Plant Sciences*, 2020, 30.4.

NETA, Alcina V. Carvalho, et al. Pathogenesis of bovine brucellosis. *The Veterinary Journal*, 2010, 184.2: 146-155.

O'CALLAGHAN, David. Human brucellosis: recent advances and future challenges. *Infectious Diseases of Poverty*, 2020, 9.04: 1-2.

OLSEN, S. C.; BOGGIATTO, P. M. Characterization of the duration of immunity of *Brucella abortus* strain RB51 vaccination in cattle after experimental challenge. *Preventive Veterinary Medicine*, 2022, 206: 105705.

OMOREGIE, Armstrong Ighodalo, et al. Integrating biotechnology into geotechnical engineering: a laboratory exercise. *Transactions on Science and Technology*, 2018, 5.2: 76-87.

ÖZEN, Hasan, et al. Brucellosis in a water buffalo (*Bubalus bubalis*) herd in Balikesir province of Turkey: a bacteriological and pathological investigation. *The Thai Journal of Veterinary Medicine*, 2021, 51.1: 133-140.

PAL, Mahendra, et al. Human and animal brucellosis: A comprehensive review of biology, pathogenesis, epidemiology, risk factors, clinical signs, laboratory diagnosis, public health significance, economic importance, prevention and control. *American Journal of Infectious Diseases*, 2020, 8.4: 118-126.

PAL, Sujoy. *Bacterial Systematics*. 2021.

PARIJA, Subhash Chandra. *Brucella*. In: *Textbook of Microbiology and Immunology*. Singapore: Springer Nature Singapore, 2023. p. 597-606.

PARKER, Todd. Culture of *Brucella abortus* bacteria on Thayer-Martin (TM) agar medium [foto]. 2014. In: *Public Health Image Library (PHIL)* [online]. [cit. 2023-06-20]. Dostupné z: <https://phil.cdc.gov/details.aspx?pid=17113>

PATEL, Neha; SHAH, Urvesh. Evaluation of “rapid urease test performed on broth of blood culture bottles indicated positive by automated blood culture system”-as a tool for early diagnosis of brucellosis. 2018.

PELLEGRINI, Joaquin Miguel; GORVEL, Jean-Pierre; MÉMET, Sylvie. Immunosuppressive Mechanisms in Brucellosis in Light of Chronic Bacterial Diseases. *Microorganisms*, 2022, 10.7: 1260.

PINN-WOODCOCK, Toby, et al. A one-health review on brucellosis in the United States. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 2023, 1.aop: 1-12.

PRIYANKA, S. B.; SK, Kashyap. Bovine brucellosis, A review on background information and perspective. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 2019, 7.2: 607-613.

RAHMAN, Md Atikur, et al. Isolation, identification and antibiotic sensitivity pattern of *Salmonella* spp. from locally isolated egg samples. *Am. J. Pure Appl. Sci*, 2019, 1.1: 1-11.

RAHMAN, Md Siddiqur. *Brucella abortus* killed vaccine: The achievement of 52 years (1967-2019) in Bangladesh. *EC Veterinary Science*, 2019, 14-21.

RAJENDHRAN, Jeyaprakash. Genomic insights into *Brucella*. *Infection, Genetics and Evolution*, 2021, 87: 104635.

RATHISH, Balram, et al. Comprehensive review of bioterrorism. *StatPearls* [Internet], 2022.

ROHOKALE, Rajendra; GUO, Zhongwu. Development in the Concept of Bacterial Polysaccharide Repeating Unit-Based Antibacterial Conjugate Vaccines. *ACS infectious diseases*, 2023, 9.2: 178-212.

ROOP, R. Martin, et al. Uncovering the hidden credentials of *Brucella* virulence. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2021, 85.1: e00021-19.

SAAVEDRA, Maria José, et al. Etiology: the Genus *Brucella*. Brucellosis in Goats and Sheep: an endemic and re-emerging old zoonosis in the 21st century, 2019, 21-58.

SAAVEDRA, Maria José; FERNANDES, Conceição; QUEIROGA, Cristina. Laboratory diagnosis of brucellosis. Brucellosis in Goats and Sheep: an endemic and re-emerging old zoonosis in the 21st century, 2019, 151-180.

SABRA, Alia; EL MASRY, Bouchra; SHAIB, Houssam. A Review of Brucellosis: A Recent Major Outbreak in Lebanon. Journal of Environmental Science and Public Health, 2021, 5.1: 56-76.

SARGSYAN, Lilit, et al. Acute and chronic brucellosis eleven-year audit from a tertiary hospital in Armenia. The Journal of Infection in Developing Countries, 2019, 13.05.1: 042S-050S.

SARMA, Olympica; SINGH, Preetinder. Brucellosis: A major abortion causing disease of livestock with zoonotic potential. 2022.

SAWANT, Ajay R., et al. Brucellosis in India: Its pathogenesis, clinical manifestations, and diagnostic procedures: Brucellosis in India. Letters In Animal Biology, 2022, 2.2: 01-05.

SAXENA, Hari Mohan; RAJ, Sugandha. A novel immunotherapy of Brucellosis in cows monitored non invasively through a specific biomarker. PLOS Neglected Tropical Diseases, 2018, 12.4: e0006393.

SAXENA, Neharika; SINGH, Balbir Bagicha; SAXENA, Hari Mohan. Brucellosis in sheep and goats and its serodiagnosis and epidemiology. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, 2018, 7.1: 1848-1877.

SHIELDS, Patricia; CATHCART, Laura. Oxidase test protocol. American Society for Microbiology, 2010, 1-9.

SHOJAEI, Maryam Sadat, et al. An educational intervention based on family-centered empowerment model to modify high-risk behaviors of brucellosis via mother education. Scientific Reports, 2022, 12.1: 18869.

SHOME, Rajeswari, et al. Characterization of humoral and cellular immune responses elicited by reduced doses of *Brucella abortus* S19 (caltfoot) vaccine in cattle calves of India. Research in Veterinary Science, 2023.

SHRIMALI, M. D., et al. Isolation, identification and molecular characterization of *Brucella abortus* from bovines. Journal of Pure and Applied Microbiology, 2017, 11.2: 933-939.

STAINING, PRINCIPLE OF GRAM. GRAM STAINING. Microbiology Practical Manual, -E-book, 2018, 11.

STÁREK, Jiří. Brucelóza – informace o onemocnění [online]. Praha: Krajská hygienická stanice Středočeského kraje se sídlem v Praze, Březen 2019, [cit. 2023-04-30]. Dostupné z: <https://khsstc.cz/bruceloza-informace-o-onemocneni/>

STRANAHAN, Lauren W.; ARENAS-GAMBOA, Angela M. When the going gets rough: The significance of *Brucella* lipopolysaccharide phenotype in host–pathogen interactions. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 713157.

TEKLE, Muluken, et al. Isolation and identification of *Brucella melitensis* using bacteriological and molecular tools from aborted goats in the Afar region of north-eastern Ethiopia. *BMC microbiology*, 2019, 19.1: 1-6.

TRIPATHI, Nishant; SAPRA, Amit. Gram staining. 2020.

TULU, Dereje. Bovine brucellosis: epidemiology, public health implications, and status of brucellosis in Ethiopia. *Veterinary Medicine: Research and Reports*, 2022, 21-30.

UR RAHMAN, Mujeeb, et al. Serological and Molecular Techniques for the Diagnostic of Brucellosis. *VNUHCM Journal of Science and Technology Development*, 2019, 22.4: 400-408.

VESELOVSKY, S. Yu, et al. The application of a split-conjugated anti-brucellosis vaccine as a provoking factor” for identification of brucellosis in animals. *Adv. Anim. Vet. Sci*, 2020, 8.5: 524-530.

VRÁBLÍKOVÁ, Vera, MARTINKOVÁ, Irena, ONDRUŠOVÁ, Hedvika. Klastř importovaných případů brucelózy v Moravskoslezském kraji, 2018: A cluster of imported cases of brucellosis in the Moravian-Silesian Region, 2018 [online]. 2020, 31 - 35 [cit. 2023-04-30]. Dostupné z: <https://docplayer.cz/193018202-Klastr-importovanych-pripadu-brucelozy-v-moravskoslezskem-kraji-2018.html>

WANG, Qian, et al. *Brucella melitensis* and *B. abortus* in eggs, larvae and engorged females of *Dermacentor marginatus*. *Ticks and tick-borne diseases*, 2018, 9.4: 1045-1048.

WARETH, Gamal, et al. The perspective of antibiotic therapeutic challenges of brucellosis in the Middle East and North African countries: Current situation and therapeutic management. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2022, 69.5: e1253-e1268.

XIAO, Yu, et al. Inflammatory Mechanism of *Brucella* Infection in Placental Trophoblast Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23.21: 13417.

YAGUPSKY, Pablo; MORATA, Pilar; COLMENERO, Juan D. Laboratory diagnosis of human brucellosis. *Clinical microbiology reviews*, 2019, 33.1: e00073-19.

ZHANG, Ning, et al. Brucellosis awareness and knowledge in communities worldwide: A systematic review and meta-analysis of 79 observational studies. *PLoS neglected tropical diseases*, 2019, 13.5: e0007366.

ZHANG, Siwen, et al. Prevalence and relevant factors of positive RF in brucellosis patients with arthralgia. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2021, 15.9: e0009749.

ZHAO, Rugang; DING, Rui; ZHANG, Qiang. Safety and efficacy of polyetheretherketone (PEEK) cages in combination with one-stage posterior debridement and instrumentation in Lumbar *Brucella* Spondylitis. *Clinical Neurology and Neurosurgery*, 2020, 199: 106259.

ZUROVAC SAPUNDZIC, Zorana, et al. First Report of *Brucella* Seroprevalence in Wild Boar Population in Serbia. *Veterinary Sciences*, 2022, 9.10: 575.