

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

Fakulta tropického zemědělství



**Fakulta tropického
zemědělství**

Výskyt bakterie *Brucella suis* u lovné zvěře v České republice

Bakalářská práce

Praha 2023

Vypracoval:

Jakub Dvořák

Vedoucí práce:

RNDr. Jiří Černý, Ph.D.

Konzultant:

dr. Jignesh Italiya

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Jakub Dvořák

Tropické zemědělství

Název práce

Výskyt bakterie *Brucella suis* u lovné zvěře v České republice

Název anglicky

Detection of *Brucella suis* in game samples collected in Czechia

Cíle práce

Mnohé bakterie rodu *Brucella* patří mezi nebezpečné lidské i zvířecí patogeny a některé z nich jsou dokonce počítány mezi potenciálně využitelné biologické zbraně. Jedním ze zástupců rodu *Brucella* je i bakterie *Brucella suis*. U domácích zvířat byla tato bakterie v Evropě eradikována. Lidé se ale mohou nakazit právě od volně žijících zvířat, kteří slouží jako rezervoár pro tuto bakterii. *Brucella suis* byla v minulosti opakovaně detekována u různých druhů lovné zvěře napříč Evropou. Informace o její prevalenci v České republice jsou ale omezené. Cílem této práce je proto rozšířit naše znalosti o prevalenci *B. suis* v rezervoárových zvířatech v České republice.

Metodika

Vzorky sér a pevných orgánů (např. slezina, játra) budou sbírány ve spolupráci s místními mysliveckými sdruženími napříč celou Českou republikou v několika loveckých sezónách. Ze sebraných vzorků bude vyizolována DNA, která bude následně analyzována na přítomnost *B. suis* pomocí PCR za využití specifických primerů. Získané výsledky budou statisticky zhodnoceny, bude spočítána prevalence *B. suis* a porovnána mezi různými rezervoárovými zvířaty, lokalitami a roky.

Doporučený rozsah práce

40

Klíčová slova

Brucella suis, brucelóza, detekce, PCR, zvěř

Doporučené zdroje informací

Fabrizio De Massis, Katuscia Zilli, Guido Di Donato, Roberta Nuvoloni, Sandro Pelini, Lorena Sacchini, Nicola D'Alterio, Elisabetta Di Giannatale: Distribution of Brucella field strains isolated from livestock, wildlife populations, and humans in Italy from 2007 to 2015. PLoS One. 2019 Mar 22;14(3):e0213689. doi: 10.1371/journal.pone.0213689. eCollection 2019.

Lelde Grantina-Ievina, Jelena Avsejenko, Svetlana Cvetkova, Dita Krastina, Madara Streikisa, Zanete Steingolde, Indra Vevere, Ieva Rodze: Seroprevalence of Brucella suis in eastern Latvian wild boars (Sus scrofa), Acta Vet Scand. 2018 Mar 24;60(1):19. doi: 10.1186/s13028-018-0373-9.

Peter van Tulden, Jose L Gonzales, Michiel Kroese, Marc Engelsma, Frido de Zwart, Dorota Szot, Yvette Bisselink, Marga van Setten, Miriam Koene, Peter Willemsen, Hendrik-Jan Roest, Joke van der Giessen: Monitoring results of wild boar (Sus scrofa) in The Netherlands: analyses of serological results and the first identification of Brucella suis biovar 2. Infect Ecol Epidemiol. 2020 Oct 26;10(1):1794668. doi: 10.1080/20008686.2020.1794668.

Pilar María Muñoz, Virginie Mick, Lorena Sacchini, Anna Janowicz, María Jesús de Miguel, Moulay-Ali Cherfa, Celia Rodriguez Nevado, Guillaume Girault, Sara Andrés-Barranco, Maryne Jay, Elisabetta Di Giannatale, Katuscia Zilli, Massimo Ancora, Alessandro Dondo, Simona Zoppi, María Cruz Arnal, Manuela Tittarelli, Fabrizio De Massis, Bruno Garin-Bastuji, José María Blasco, Giuliano Garofolo: Phylogeography and epidemiology of Brucella suis biovar 2 in wildlife and domestic swine. Vet Microbiol. 2019 Jun;233:68-77. doi: 10.1016/j.vetmic.2019.04.025. Epub 2019 Apr 22.

Předběžný termín obhajoby

LS 2022/23 – FTZ

Vedoucí práce

RNDr. Jiří Černý, Ph.D.

Garantující pracoviště

Fakulta tropického zemědělství

Elektronicky schváleno dne 6. 4. 2023

prof. dr. ir. Patrick Van Damme

Vedoucí ústavu

Elektronicky schváleno dne 12. 4. 2023

prof. dr. ir. Patrick Van Damme

Děkan

V Praze dne 14. 04. 2023

Prohlášení

Čestně prohlašuji, že jsem tuto práci na téma Výskyt bakterie *Brucella suis* u lovné zvěře v České republice vypracoval samostatně, veškerý text je v práci původní a originální a všechny použité literární prameny jsem podle pravidel Citační normy FTZ řádně uvedl v referencích.

V Praze dne 14.4.2023

.....
Jakub Dvořák

Poděkování

V první řadě bych chtěl poděkovat svému vedoucímu práce panu RNDr. Jiřímu Černému, PhD, za odbornou pomoc, korekturu, důvtip a hlavně trpělivost během celého procesu tvorby této práce. Stejnou mírou si zaslouží můj vděk i konzultant práce dr. Jignesh Italiya, který mě provázel každým krokem laboratorní činnosti a byl připravený na každé mé zaváhání bez ohledu na rozsah škod.

Za sběr a transport vzorků ze zajíců polních, bych chtěl poděkovat Ing. Silvii Neradilové, PhD. a panu Adamu Machalovi a mysliveckým sdružením MS Doubrava Kladeruby-Němetice, MS Skrbeň, MS Mezihájí Kněžice, MS Hubertus Miroslav, MS Artemis Mikulov a MS Šlapanice u Brna. Ing. Luboši Paznochtovi, Ph.D. patří dík za pomoc s pro mě neznámou praktikou myslivosti, jež byla prvním krokem ke spolupráci s Fakultou lesnickou a dřevařskou. Ing. Miloši Ježkovi, PhD., Justine Guldenpfennig a Astrid Olejarz děkuji za poskytnutí vzorků z prasat divokých ulovených během naháněk v Kostelci nad Černými Lesy.

V neposlední řadě bych chtěl poděkovat své rodině, blízkým, přátelům a spolužákům, za jejich pomoc, podporu a empatii.

Abstrakt

Výskyt bakterie *Brucella suis* u lovné zvěře v České republice

Brucelóza je celosvětově rozšířené zoonotické onemocnění, jehož původcem jsou bakterie rodu *Brucella*. V současné době jsou tyto patogenní původci nejvíce rozšířeni mezi volně žijícími zvířaty. Přímý kontakt s hospodářskými zvířaty, anebo lov pro konzumaci je potenciálním rizikem pro veřejné zdraví a ekonomickou produkci.

Lidé se mohou nakazit konzumací nedostatečně upravených produktů masného nebo mléčářského typu. Léčba je velmi náročná a zdlouhavá. Pro prevenci je důležitá kontrola rezervoárů mezi lovnou zvěří a jejich včasné eradikování.

Tato práce popisuje dosud známé druhy rodu *Brucella*, jejich hostitele a dopad na hospodářství. Zvláštní důraz je kladen na *B. suis*, která je v Evropě značně rozšířena mezi divokými prasaty, jejichž maso je pro mnohé vyhledávanou delikatesou. Zároveň je jejich rostoucí populace v případě infekce rizikem pro produkční chovy. *B. suis* byla i proto vybrána pro výzkum popsany v této práci.

Pomocí standardního PCR a gelové elektroforézy byly testovány vzorky vybraných druhů lovné zvěře z šesti regionů České republiky. Vypočítaná prevalence nevykazovala oproti jiným státům Evropy žádné extrémní abnormality a lze tedy usuzovat, že výskyt bakterie je v přirozených hodnotách a není třeba razantního zásahu.

Klíčová slova: *Brucella suis*, brucelóza, detekce, PCR, zvěř

Author's abstract

Detection of *Brucella suis* in game samples collected in Czechia

Brucellosis is a worldwide zoonotic disease caused by *Brucella* spp. Currently, these pathogens are most prevalent in free-ranging animals. Direct contact with livestock or hunting for consumption is a potential risk to public health and economic production.

Humans can become infected by consuming inadequately treated meat or dairy products. Treatment is highly challenging and time consuming. Control of reservoirs among game animals and their early eradication is important for the prevention.

This thesis describes the species of the genus *Brucella* known to date, their hosts and their impact on the livestock industry. Particular emphasis is placed on *B. suis*, which is widespread in Europe among wild boars, whose meat is a popular delicacy and whose increasing population poses a risk to production farms if infected. *B. suis* was therefore chosen for the research described in this paper.

Samples of selected game species from six regions of the Czech Republic were tested using standard PCR and gel electrophoresis. Calculated prevalence did not show any extreme abnormalities compared to other European countries and it can be assumed that the prevalence of the bacterium is within the natural range and there is no need for dramatic interventions.

Key words: *Brucella suis*, brucellosis, detection, PCR, game

Obsah

1. Úvod	- 1 -
2. Charakteristika bakterií rodu <i>Brucella</i>	- 3 -
2.1 Taxonomické zařazení.....	- 3 -
2.1.1 Druhy rodu <i>Brucella</i>	- 6 -
3. <i>Brucella suis</i>.....	- 16 -
3.1 Genetická charakteristika	- 16 -
3.2 Výskyt	- 16 -
3.3 Přenos	- 17 -
3.4 Patogeneze.....	- 18 -
3.5 Infekce u zvířat.....	- 18 -
3.5.1 Inkubační doba.....	- 18 -
3.5.2 Klinické projevy.....	- 19 -
3.5.3 Léčba.....	- 19 -
3.5.4 Prevalence	- 19 -
3.6 <i>Brucella suis</i> jako biologická zbraň	- 20 -
3.7 Diagnostika.....	- 20 -
4. Cíle práce	- 21 -
5. Metodika a materiál.....	- 22 -
5.1 Lokality	- 22 -
5.2 Sběr a uskladnění vzorků	- 22 -
5.3 Extrakce DNA	- 23 -
5.4 PCR	- 24 -
5.4.1 Použité primery	- 24 -
5.4.2 Reakční mix	- 25 -
5.4.3 Průběh PCR reakce	- 26 -
5.5 Gelová elektroforéza	- 26 -
5.6 Vyhodnocení pozitivita vzorků.....	- 27 -
6. Výsledky.....	- 28 -
7. Diskuze.....	- 31 -
8. Závěr	- 34 -
9. Seznam použité literatury	- 35 -

Seznam tabulek:

Tabulka č. 1: Zjednodušené srovnání rodů <i>Brucella</i> a <i>Ochrobactrum</i>	- 5 -
Tabulka č. 2: Počet vzorků testovaných na <i>B. suis</i> podle lokalit	- 23 -
Tabulka č. 3: Primery použité pro detekci <i>Brucella suis</i>	- 25 -
Tabulka č. 4: Složení mixu pro PCR reakci	- 25 -
Tabulka č. 5: Přehled průběhu PCR reakce.....	- 26 -
Tabulka č 6: Počty pozitivních nálezů v rámci lokalit	- 28 -

Seznam obrázků (a grafů):

Obrázek č. 1: Fylogenetické vztahy mezi rody čeledi <i>Brucellaceae</i> na základě sekvencí genomu	- 5 -
Obrázek č. 2: Dendrogram rodu <i>Brucella</i>	- 6 -
Obrázek č. 3: Převládající typy buněk napadené bakterií <i>Brucella abortus</i> v hostiteli	- 7 -
Obrázek č. 4: Fylogenetická rekonstrukce vztahů mezi <i>Brucella</i> spp. a izolátem BO1	- 12 -
Obrázek č. 5: Fylogenetická rekonstrukce vztahů mezi <i>Brucella</i> spp. a <i>B. microti</i>	- 13 -
Obrázek č. 6: Mapa lokalit využitých pro sběr vzorků.....	- 22 -
Obrázek č. 7: Počet pozitivně testovaných vzorků zajíců polních v lokalitách	- 28 -
Obrázek č. 8: Počet pozitivně a negativně testovaných vzorků prasat divokých	- 29 -
Obrázek č. 9: Výsledky gelové elektroforézy	- 29 -
Obrázek č. 10: Výsledky gelové elektroforézy	- 29 -
Obrázek č. 11: Prevalence <i>B. suis</i> u různých hostitelů na různých lokalitách	- 30 -

Seznam zkratek použitých v práci:

bp	páry bází (base pair)
BSL	úroveň biologické bezpečnosti (Biosafety levels)
bv	biovar
ČZU	Česká zemědělská univerzita
DNA	deoxyribonukleová kyselina (deoxyribonucleic acid)
ER	endoplazmatické retikulum
EtBr	ethidium bromid
Chr	chromozom
LPS	lipopolysacharid
Mb	megabaze
PCR	polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)
rpm	otáčky za minutu (revolutions per minute)
SVS	Státní veterinární správa
WHO	Světová zdravotnická organizace (World Health Organization)

1. Úvod

Bakterie rodu *Brucella* jsou gramnegativní, nepohyblivé tyčinky či kokobacily, které v hostitelském organismu působí jako intracelulární parazité. Mohou infikovat mnoho druhů savců, ať už suchozemských, mořských nebo i samotného člověka, a způsobovat onemocnění zvané brucelóza, které se ve svých projevech druhově liší. Hlavními celosvětově nejrozšířenějšími patogenními druhy jsou *B. abortus*, hlavní agens brucelózy skotu; *B. melitensis*, zodpovědný za brucelózy ovcí a koz; a *B. suis*, hlavním původcem brucelózy prasat. Tyto tři druhy rodu *Brucella* negativně ovlivňují plodnost hostitele a mohou způsobovat potraty, což má za následek obrovské ekonomické ztráty chovatelů.

Vysoká prevalence těchto bakterií má za následek velký dopad na mléčnou produkci, plodnost a tržní hodnotu zvířat či jejich produktů. Dlouhodobě jsou řazeny mezi celosvětově nejvíce ekonomicky významné zoonózy se silným dopadem na socioekonomickou sféru, a to hlavně přes ztráty převážně v mlékárenském a jatečním průmyslu. Podle studií jsou však největší finanční zátěží náklady spojené s léčbou a následnou prevencí (Lokamar et al. 2020). V mnoha vyspělých zemích je brucelóza úspěšně kontrolována nebo eradikována u populací hospodářských zvířat, v těchto zemích se hlavním rezervoárem staly populace různých divokých zvířat. Největší zátěží zůstává brucelóza pro středně a nízkopříjmové země a odloučené lokality, kde se dopady liší v závislosti na preferovaném druhu hospodářských zvířat, systému hospodaření a kapacitě i kvalitě veterinární a lékařské péče. (McDermott et al. 2013).

Pozoruhodné mohou být i paleontologické nálezy hominidů z dob nejstaršího paleolitu. Podle paleopatologického výzkumu kosterních pozůstatků z krasové jeskyně Sterkfontein v Jihoafrické republice, prováděného na skeletech rodu *Australopithecus* a *Homo*, se brucelózou infikovaly i rané lidské populace před 1,5-2,5 miliony let. Vyjma běžných traumat, nádorových a degenerativních změn byla na jednom z těl popsána lytická léze lumbálního obratle. Podle vědců tedy existuje možnost, že tyto lytické léze mohou být spojeny se změnami skeletu pravděpodobně způsobenými brucelózou. Z hlediska antropologie je toto zjištění důležité pro podporu teorie o složitější oportunistické stravě *A. africanus*, pro nás však může být důkazem tisíciletého boje

s tímto zoonotickým patogenem spojeným s konzumací nedostatečně upravených živočišných produktů pocházejících z infikovaných zvířat (D'Anastasio et al. 2009).

Důležitým aspektem prevence ekonomických ztrát a nakažení člověka jsou eradikační programy a pravidelný monitoring. V zemích s přísnou veterinární kontrolou je brucelóza u hospodářských zvířat považována za eradikovanou či zcela vymýcenou. Je tomu tak například ve Spojeném království Velké Británie a Severního Irsku nebo zemích severní Evropy.

Za epidemiologická centra tohoto onemocnění jsou naopak v Evropě považovány země Středomoří, kde dochází k nákaze skrze mlékařenské produkty ze skotu, ovcí a koz (Taleski et al. 2002). Nicméně se s touto nákazou lze opakovaně setkat i v chovech v centrální části kontinentu a vyspělých zemích. Stalo se tomu tak například ve Francii, kde se opětovně vyskytují infekce u lidí způsobené druhy *B. melitensis* a *B. suis*. Od roku 2002 do roku 2011 bylo ve Francii potvrzeno 219 lidských případů nakažení brucelózou, kde původcem byl *B. melitensis*. V dubnu 2012 byla potvrzena brucelóza u dojnice ve stádě okresu francouzských Alp. Pozitivní dojnice potratila koncem ledna a z mléka odebraného zvířeti byl izolován kmen *Brucella melitensis* biovar 3. Zvíře patřilo do stáda 21 dojnic a žádné jiné zvíře ve stádě nevykazovalo příznaky naznačující brucelózu nebo nevykazovalo žádnou sérologickou reakci (Mailles et al. 2012). V letech 2004 až 2016 bylo ve Francii identifikováno sedm lidských případů, všechny potvrzené izolací *Brucella suis* biovar 2 v klinických vzorcích. Z toho šest mužských pacientů byli lovci divokých prasat a jedna pacientka připravovala a manipulovala s masem divokého kance (Mailles et al. 2017).

Tímto příkladem může být vyzdvihnuta důležitost pravidelného monitoringu u domácích i volně žijících zvířat jako potenciálního původce lidské nákazy a tím i cíl této práce zkoumající prevalenci *B. suis* v divoce žijících zvířatech ve vybraných oblastech České republiky.

2. Charakteristika bakterií rodu *Brucella*

Brucelóza je běžným zoonotickým onemocněním v mnoha zemích světa. Obzvláště častá je ve středomořských zemích, na Blízkém východě, Arabském poloostrově, ve Střední a Jižní Americe, Asii a Africe. Na světě je pouze 17 zemí, které jsou prosté brucelózy, ale i v nich se občasně vyskytují případy onemocnění mezi jedinci, kteří přicestovali ze zemí zasažených nákazou. Dříve se onemocnění nazývalo hlavně „Maltská horečka“, nicméně se užívalo několik dalších synonym odvozených z jejího zeměpisného výskytu či podobnosti s jinými febrilními chorobami. Až v roce 1918 navrhla americká mikrobioložka Alice Catherine Evansová pojmenovat onemocnění ustáleným názvem brucelóza na počest Davida Bruce, který tyto bakterie poprvé popsal v roce 1887 při horečnatých stavech u nakažených britských vojáků na ostrově Malta. Tehdy je zařadil do rodu *Micrococcus*. Evansová rovněž zkoumala podobnosti a příbuznost mezi *Micrococcus melitensis* a *Bacillus abortus*, poprvé popsaným dánským veterinářem Bernhardem Bangem v roce 1895 v chovu skotu (Madkour 2001). V roce 1920 po mnoha výzkumech navrhli bakteriolog Karl Meyer a jeho student Edward Shaw z Hooperovy nadace na Kalifornské univerzitě na základě podobnosti mezi oběma organismy, aby byly tyto bakterie přejmenovány do nového rodu *Brucella* a přejmenovány na *Brucella abortus* a *Brucella melitensis* (Moreno 2020).

2.1 Taxonomické zařazení

Druhy rodu *Brucella* jsou taxonomicky zařazeny do domény Bacteria, kmene Pseudomonadota, třídy Alphaproteobacteria, řádu Rhizobiales (Hyphomicrobiales), čeledi Brucellaceae a rodu *Brucella* (Bergey & Holt 1994).

Třída Alphaproteobacteria zahrnuje rody organismů, které jsou buď savčími nebo rostlinnými patogeny nebo symbionty. Mezi bakterie ovlivňující savce v třídě Alphaproteobacteria patří například rody *Bartonella*, *Rickettsia* a *Ehrlichia*, které se šíří přenosem na bázi vektorů (Ficht 2010).

Odlišujícím rysem rodu *Brucella* uvnitř řádu *Rhizobiales* je infekce výlučně savčích buněk, což je vlastnost sdílená pouze s rodem *Bartonella*. Zatímco rod *Bartonella* je obligátním intracelulárním parazitem neboli pravým vnitrobuněčným parazitem, který se nedokáže rozmnožovat mimo hostitelskou buňku, je *Brucella* poněkud

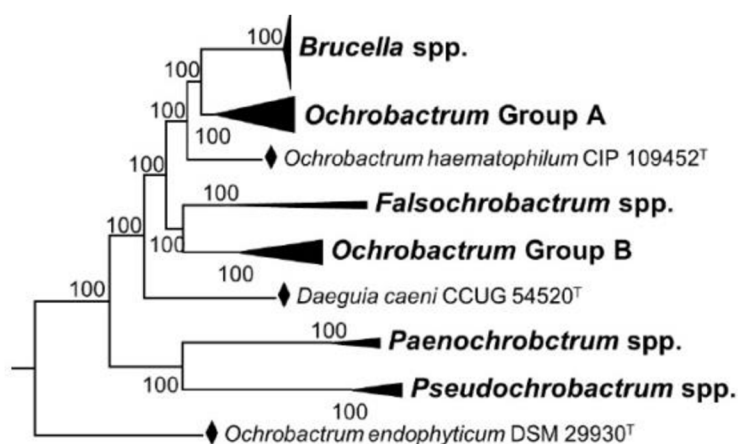
variabilnější fakultativní intracelulární patogen neboli příležitostný vnitrobuněčný parazit, a dokáže tak přežít i množit se vně i uvnitř hostitelské buňky. Na základě genomové sekvence a funkčních vlastností je dokonce pravděpodobné, že se rod *Brucella* vyvinul z půdních nebo rostlinných symbiontů podobně jako jsou rody *Rhizobium* a *Agrobacterium*. Genom bakterií rodu *Brucella* o průměrné velikosti 3,3 Mb je přibližně o 50–100 % větší než genom bakterií rodu *Bartonella* a zachoval si více metabolických funkcí sdílených s rostlinnými patogeny (Paulsen et al. 2002). Například bylo pozorováno mimobuněčné přežívání kolonie *B. suis* a *B. microti* v půdě po dobu mezi 7 až 10 týdny, což naznačuje schopnost metabolicky využívat molekuly rostlinného původu a panují tak spekulace, zda může rod *Brucella* udržet svůj metabolismus aktivní i vně savčí hostitelské buňky (Scholz et al. 2008).

The International Code of Nomenclature of Prokaryotes (ICNP) nyní zahrnuje pod čeleď Brucellaceae pět rodů. Jsou to rody *Brucella*, *Daeguia*, *Falsochrobactrum*, *Paenochrobactrum* a *Pseudochrobactrum*. Za zmínku stojí, že do čeledi Brucellaceae se dříve řadil i rod *Ochrobactrum*, který byl po zveřejnění fylogenetické analýzy pozměněn na synonymum rodu *Brucella* a následně sloučen pod tento rod, nicméně mezi vědci nadále panují diskuze nad správností této unifikace. Studie z roku 2022 dokonce vyzývá výzkumné pracovníky k zachování původní nomenklatury. Takovéto přiřazení má být nesprávné, protože přehlíží komplexnost patogenity obou rodů. Stručným shrnutím rozdílů mezi bakteriemi *Brucella* a *Ochrobactrum* se ukazuje, že v životním stylu, struktuře, fyziologii, genomických znacích a patogenitě nejsou jednoznačně shodné. Zjednodušené srovnání *Brucella* a *Ochrobactrum* je znázorněno v **Tabulce č. 1**. Unifikace mezi *Ochrobactrum* a *Brucella* omezuje i jejich zařazení do různých rizikových skupin, což je biologicky ohrožujícím a limitujícím faktorem. Navíc vzhledem k tomu, že epidemiologie, prevence, diagnostika a léčba je pro oba patogeny naprosto nesorodná, přináší sloučení volně žijících bakterií rodu *Ochrobactrum* s vysoce patogenními bakteriemi rodu *Brucella* zjevné komplikace pro veterináře, lékaře a orgány státní správy v ochraně veřejného zdraví (Moreno et al. 2022).

Tabulka č. 1: Zjednodušené srovnání rodů *Brucella* a *Ochrobactrum* (Moreno et al. 2022)

Odlišné vlastnosti	<i>Brucella</i>	<i>Ochrobactrum</i>
Velikost genomu	3,1-3,4 Mb	4,7-8,3 Mb
Pan-genom	Uzavřený	Otevřený
Plazmid	Není	Variabilní
Propustnost buněčného obalu	Propustné pro hydrofobní částice a odolné vůči destabilizaci	Nepropustné pro hydrofobní částice a citlivé na destabilizaci
Životní styl	Patogen	Saprophyt
Přirozené prostředí	Intracelulární	Půda a povrch kořenů rostlin
Přenos	Interakce s hostitelem a živočišnými produkty	Iatrogení
Infekce	Dlouhotrvající infekce podporující zánět	Samovolně se omezující akutní zánětlivá reakce
Nákaza zvířat	Velmi významná	Ojedinelá
Dopad na lidské zdraví	Velmi závažné	Zanedbatelné
Regulace WHO/OIE/FAO	Zásadní	Neexistující

Zbývajícimi rody čeledi *Brucellaceae* jsou genomově vzdálenější *Falsochrobactrum*, *Pseudochrobactrum*, *Paenochrobactrum* a *Daeguia*. Zařazení rodů *Falsochrobactrum* a *Pseudochrobactrum* je stále předmětem diskuze, neboť se jim prozatím nevěnoval dostatek výzkumu a studie se převážně opírají o srovnávání podjenotek 16S rRNA nebo genu *recA* (Leclercq et al. 2020).

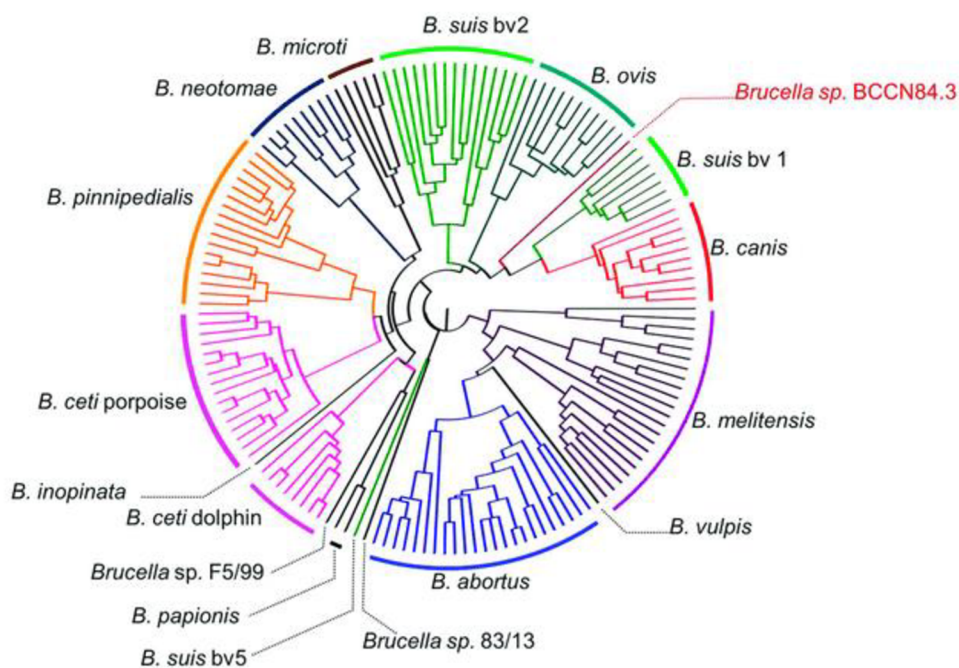


Obrázek č. 1: Fylogenetické vztahy mezi rody čeledi *Brucellaceae* na základě sekvencí genomu (zdroj: Moreno et al. 2022)

2.1.1 Druhy rodu *Brucella*

Jak bylo naznačeno v přechozí kapitole, rod *Brucella* se rozšířil po sloučení s jiným rodem na finální počet 25 druhů (včetně synonym na 30). Proto se tato kapitola bude věnovat stručné charakteristice šesti tzv. klasických druhů (tzn. druhů popsanych před 90. lety minulého století) a šesti druhům popsanych před zásahem do nomenklatury. Mezi klasické jsou řazeny *B. abortus*, *B. canis*, *B. melitensis*, *B. neotomae*, *B. ovis* a *B. suis*. Zbývajícími jsou *B. ceti*, *B. inopinata*, *B. microti*, *B. papionis*, *B. pinnipedialis* a *B. vulpis*. Na základě rozdílů v biochemických testech, morfologické struktuře kolonie, požadavcích na oxid uhličitý a reakci na barviva jsou u některých druhů popsány nižší taxonomické jednotky, které se nazývají biovary (Vergnaud et al. 2018).

Druhy jsou v této kapitole popisovány rozděleně na klasické a zbývající podle abecedního pořadí.



Obrázek č. 2: Dendrogram rodu *Brucella* (zdroj: Guzmán-Verri et al. 2019)

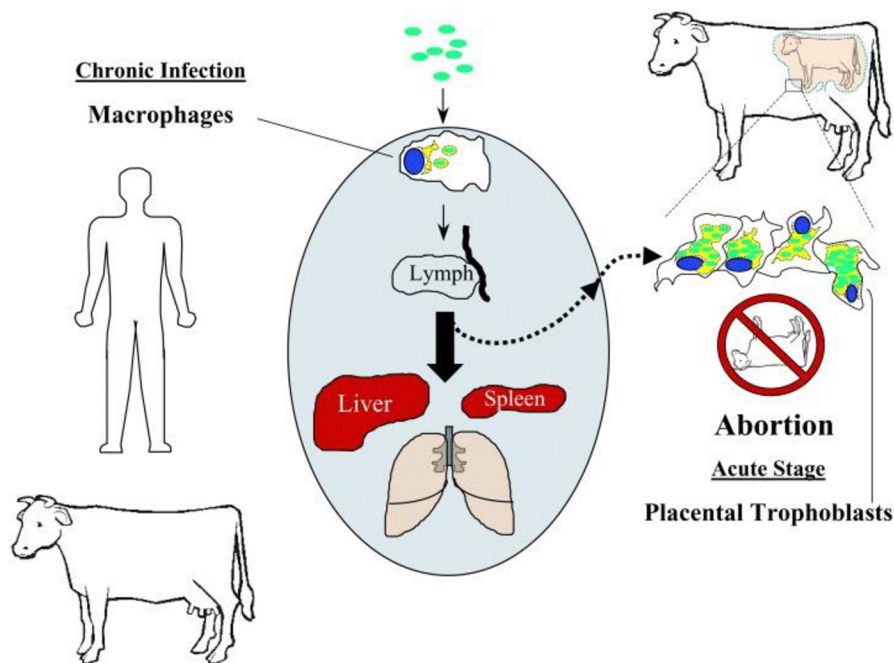
Brucella abortus

B. abortus byla poprvé popsána Bernhardem Bangem v roce 1895 a je nejrozšířenějším původcem bovinní brucelózy skotu. Vyskytuje se ve většině rozvojových zemí, ale také v USA a v zemích Středomoří. U hospodářských zvířat je onemocnění vyvolané touto bakterií známé jako "Bangsova choroba" a vyvolává spontánní potraty a neplodnost. Nicméně vykazuje menší počet lidských onemocnění než

u jiných druhů. Případná nákaza člověka je často subklinická a průběh nemoci není patrný výraznějšími příznaky. Pokud k propuknutí nemoci dojde, je nákaza zpravidla méně závažná než u *B. melitensis* nebo *B. suis*. Zároveň skot nemusí být jediným hostitelem *B. abortus*, neboť v některých oblastech jsou významnými hostiteli i bizoni, buvoli, velbloudi, psi nebo jaci (Corbel 2006).

V detailní taxonomii *B. abortus* dochází k pravidelným změnám v popisu biovarů. Původně bylo popsáno devět biovarů *B. abortus* označených pořadovými čísly 1 až 9. Biovar 8 byl jako uznávaný taxon odstraněn rozhodnutím ICNP již v roce 1978, protože byl několik let neizolován a zároveň pro něj neexistoval referenční vzorek. Biovar 7 byl suspendován až v roce 1988 pro nedostatek pozorování (Jamil et al. 2017). Nicméně kolonie izolované v roce 2014 v Keni, Turecku a Mongolsku vykazovaly aglutinaci se specifickými séry anti-A i anti-M a souhlasily s dřívějším profilem *B. abortus* biovar 7, což dopomohlo k znovuznání biovaru 7 (Garin-Bastuji et al. 2014).

Infekční dávka činí pouhých 10–100 bakterií, které jsou ve vhodném prostředí poměrně dlouho životaschopné. Například v mléce, krvi, špenátu a mletém mase je tato bakterie schopna přežít až 132 dnů (Kaden et al. 2018).



Obrázek č. 3: Převládající typy buněk napadené bakterií *Brucella abortus* v hostiteli (zdroj: Roop et al. 2004)

Brucella canis

B. canis byla poprvé popsána v roce 1966 jako nový biovar *B. suis*, a to po izolaci z tkání a vaginálních výtoků infikovaných fen. Plnohodnotným druhem se stala po zasedání výboru pro brucely, který v Mnichově v roce 1978 doporučil aktualizaci nomenklatury (Osterman & Moriyón 2006).

Rezervoárovými hostiteli *B. canis* jsou příslušníci čeledi psovité (*Canidae*). Navzdory vyššímu výskytu u čistokrevných psů jsou náchylní i hybridní nebo jakýkoliv pohlavně dospělí a reprodukčně aktivní zástupci této čeledi (Blankenship & Sanford 1975). Mimo cílené domácí chovy a útulky jsou převažujícími rezervoáry toulaví a divocí psi, kteří během testování v sedmdesátých letech minulého století vykazovali v různých regionech USA prevalenci mezi 1 a 6 %, v Peru a Mexiku až 25 % (Flores-Castro et al. 1977).

Infikovaní psi mohou být přenašeči tohoto organismu prostřednictvím páření, oronasálního kontaktu nebo šířením tkáně a tělních tekutin. Převládající je však pohlavní přenos, kdy je nejvyšší pravděpodobnost šíření závislá na velkém počtu organismů vylučovaných v reprodukčních sekretech. U samců se kvůli těsnému anatomickému spojení močového měchýře s prostatou a nadvarletem může stát zdrojem infekce i moč, kde se bakterie poprvé objevují přibližně v 4.–8. týdnu po infekci (Wanke 2004). U fen se po potratu vyskytuje zdlouhavý vaginální výtok infekčního děložního sekretu přetrvávající po dobu 4–6 týdnů po potratu. Velké množství organismů je přítomno i v potrácené placentě a mateřském mléce samice. Umělými zdroji přenosu mohou být krevní transfuze a kontaminované veterinární vybavení (Hollett 2006).

Příznaky mohou být asymptomatické, ale nejčastěji se brucelóza způsobená *B. canis* projevuje u samců atrofií varlat a sterilitou a u samic abortem. Antibiotika jsou v jednotných dávkách neúčinná a je nutná jejich kombinace, která je však nákladná a nevylučuje opětovnou nákazu. Vzhledem k těmto skutečnostem je doporučena eutanázie dotčených jedinců. Zoonotický přenos je pravděpodobný u osob, které manipulují s chovnými psy v kotcích a setkávají se s reprodukčními tekutinami infikovaných zvířat. (Hollett 2006).

Stejně jako u *B. ovis* byla *B. canis* vždy během kultivace na agaru pozorována s hrubým nebo mukózním povrchem, neboť podle studií postrádá somatický postranní lipopolysacharidový řetězec typický pro antigeny jiných druhů *Brucella* (Nielsen & Duncan 1990).

Brucella melitensis

B. melitensis postihuje především reprodukční trakt ovcí a koz a infekce je charakterizována potratem, zadržanou placentou a v menší míře poruchou plodnosti. Protože potrat je jediným příznakem, který indikuje infekci *B. melitensis*, používají se sérologické testy k potvrzení brucelózy u podezřelých zvířat. Některé země eradikovaly brucelózu u malých přežvýkavců právě díky sérologickým testům a porážce pozitivně reagujících zvířat. Nicméně, mnoho dalších zemí bojuje se znovu propukající nákazou, například většina středomořských zemí se díky velkému množství stád ovcí a koz opakovaně setkává s nákazou vyvolanou *B. melitensis*, u které uznáváme tři biovary, kdy nejčastěji detekovaným je biovar 3.

Patologicky je infekce *B. melitensis* u ovcí a koz velmi podobná infekci *B. abortus* u skotu. U březích zvířat bakterie napadají dělohu a množí se v placentě a plodu. To obvykle vede k potratu nebo k narození infikovaných jehňat či kůzlat a vylučování brucel do prostředí, avšak pouze malá část jehňat je infikována již v děloze, tudíž většina infekcí vyvolaných *B. melitensis* je pravděpodobně získána prostřednictvím mleziva nebo mlékem. Vylučování brucel v děložním a vaginálním výtoku, mléce a moči je největší v prvních dnech po potratu či porodu. Vylučování do poševní tekutiny a moči může trvat 4-6 měsíců. Ovce mohou vylučovat brucely do mléka 1-3 týdny, ale v některých případech může vylučování pokračovat až 6 měsíců. Kozy mohou vylučovat brucely do mléka po dobu jednoho roku nebo déle (Garin-Bastuji et al. 1998).

Brucella neotomae

V roce 1957 Stoenner a Lackman izolovali z křečka pouštního (*Neotoma lepida*) organismus, který se na základě jeho chování při diferenciálním barvení na médiu, nárocích na CO₂ a produkci H₂S, rozhodli považovat za nový druh *Brucella*, pro který navrhli název *Brucella neotomae* (Stoenner & Lackman 1957). Zprvu se předpokládalo, že jediným hostitelem pro tento druh může být pouze *Neotoma lepida*, načež se jen málo navazujících studií věnovalo laboratorním pokusům na morčatech a myších. Žádná ze studií však nepočítala s pravděpodobností přenosu na člověka a *B. neotomae* byla zařazena mezi brucely bez zoonotického potenciálu (Gibby & Gibby 1965).

B. neotomae se pro svou dříve předpokládanou „neškodnost“ stala předmětem výzkumu jako modelový organismus rodu *Brucella* a bylo předpokládáno, že posune kupředu vývoj vakcíny proti brucelóze použitelné nejen u zvířat, ale i u člověka.

Prozatím se používali oslabené živé kmeny *B. abortus* a *B. melitensis* jako vakcíny pro tlumení brucelózy v domestikovaných zvířatech, nicméně pro člověka jsou nevhodné, neboť mohou vyvolat onemocnění i u jedinců se zdravým imunitním systémem (Schurig et al. 2002). V roce 2011 byla zveřejněna studie, jejíž cílem bylo zjistit, zda lze *Brucella neotomae*, o níž není známo, že by způsobovala onemocnění i u svého specifického hostitele, využít pro vývoj vakcín proti brucelóze u zvířat i lidí. *B. neotomae* a její rekombinantní kmeny byly vystaveny gama záření a použity jako vakcíny pro uměle infikované laboratorní myši. Všechny tři vakcíny vyvolaly tvorbu antigenně specifické protilátky a vakcinované myši vykazovaly významnou odolnost proti napadení virulentní *B. abortus*, *B. melitensis* a *B. suis*. Tyto výsledky ukázaly, že *B. neotomae* by byla slibnou pro vývoj bezpečné a účinné vakcíny proti lidské brucelóze (Moustafa et al. 2011).

V roce 2008 byl vykultivován izolát ze vzorku mozkomíšního moku získaného od 64letého pacienta v San José v Kostarice s diagnostikovanou brucelózou projevující se neurologickými příznaky. V roce 2011 se podobný případ vyskytl u 51letého pacienta v jiné části v Kostariky. Detailnější analýza pomocí multiplex PCR a analýza lokusů ukázala, že oba izoláty odpovídají *B. neotomae* (Suárez-Esquivel et al. 2017).

Vzhledem k tomu, že *B. neotomae* nebyla do té doby považována za zoonotickou, mohly být některé předchozí případy brucelózy chybně diagnostikovány jako *B. abortus*, která v Kostarice převládá (Hernández-Mora et al. 2017).

Brucella ovis

Bakterie *Brucella ovis*, která koluje mezi ovce, je významnou příčinou zánětu nadvarlat a snížené plodnosti u beranů, což má za následek ekonomické ztráty. Ačkoli je tento organismus příležitostně spojován také s potraty a zvýšenou úmrtností v průběhu březosti, jeho působení je primárně zaměřeno na samce. Berani mohou být trvale infikováni a přenášet *B. ovis* na jiné samce. Experimentálně bylo prokázáno, že k přirozenému přenosu infekce z berana na berana dochází snadno v období páření a také při přehánění beranů izolovaně od bahnic. Bahnice jsou vůči infekci relativně odolné, a pokud se nakazí, jsou schopny se organismu zbavit za relativně krátkou dobu (Buddle 1956). Experimentální infekce však byly zaznamenány i u koz, ovce tlustorohé (*Ovis canadensis*) a jelenů evropských (*Cervus elaphus*) (Burgess et al. 1985, Ridler et al. 2011, McCollum et al. 2013). Na rozdíl od jiných druhů rodu *Brucella*, *B. ovis* zřejmě neinfikuje člověka.

Brucella suis

Viz kapitola 3. *Brucella suis*

Brucella ceti

Od poloviny 90. let 20. století byly z mořských savců izolovány bakterie charakteristicky připomínající kmeny *Brucella*. Jejich zařazení do rodu *Brucella* bylo podpořeno shodnými charakteristikami a příbuzností s popsányými druhy rodu. V roce 2007 bylo dvacet osm evropských izolátů rodu *Brucella* z mořských savců rozděleno od uznaných druhů podle způsobu využití substrátů, na základě molekulárních metod a rozdílů v metabolismu do dvou skupin, jejichž preferovanými hostiteli jsou kytovci a ploutvonožci. Pro tyto nově uznané izoláty byly navrženy názvy *Brucella ceti* a *Brucella pinnipedialis* (Foster et al. 2007).

B. ceti byla dosud identifikována u kytovců (Cetacea) v zástupcích obou podřádů, jak u kosticovců (Mysticeti), tak ozubených (Odontoceti). Sérologické průzkumy ukázaly, že brucelóza kytovců může být v oceánech rozšířena po celém světě. Podle preferovaného hostitele a biologických vlastností byly rozpoznány tři podskupiny *B. ceti*: delfíni, sviňuši a lidská (Guzmán-Verri et al. 2012). Zatím byl doložen pouze přenos na člověka z jednoho případu na Novém Zélandu a ze dvou případů v Peru (Sohn et al. 2003; McDonald et al. 2006). Nákazy pocházely pravděpodobně z konzumace syrových mořských plodů a přiřazení izolátu proběhlo až retrospektivně spolu s izolátem z potráceného plodu delfína skákavého chovaného v akváriu v San Diegu v Kalifornii (Guzmán-Verri et al. 2012).

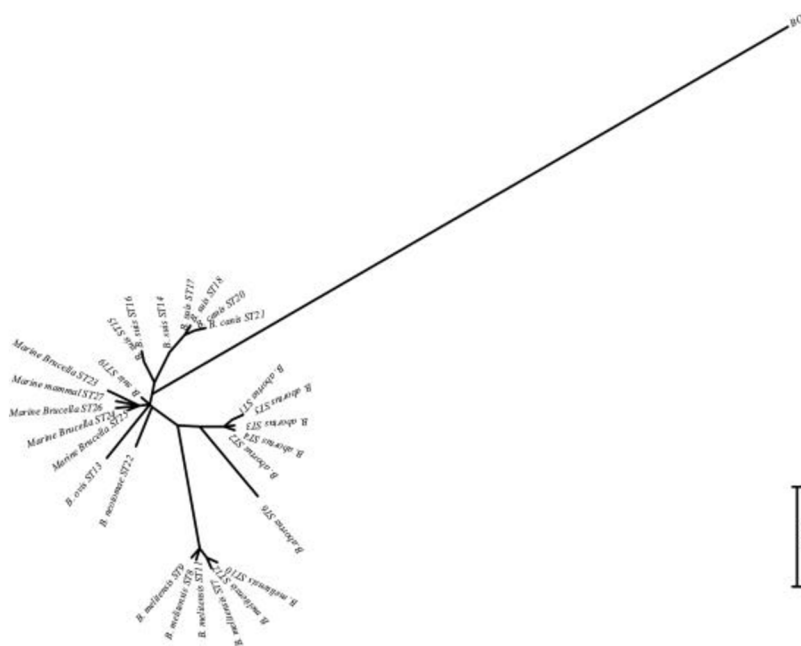
Infekce *B. ceti* u kytovců vyvolává komplexní onemocnění charakterizované poškozením různých tkání a orgánů, jako jsou slezina, játra, srdce, kostní dřeň, plíce, kosti, mozek, mléčná žláza a varlata. U březích zvířat vyvolává bakterie potrat v důsledku invaze do placenty a tkání plodu. Jinak se projevuje jako tzv. neurobrucelóza kytovců a je častou příčinou uvíznutí na mělčině, protože způsobuje dezorientaci, nekoordinované plavání, poruchy vztlaku a tím způsobenou smrt (González-Barrientos et al. 2010).

Přenos mezi jedinci se pravděpodobně uskutečňuje vertikální i horizontální cestou. Vertikální přenos je doložen díky identifikaci *B. ceti* v mléce, tkáních a sekretech březích samic a jejich plodů (Jauniaux et al. 2010). Zevní vyloučení placentální a plodové tkáně do prostředí může znamenat, že *B. ceti* se potenciálně může přenášet i horizontální cestou z jednoho jedince na druhého. Navíc umístění bakterií v konkrétních orgánech

naznačuje možnost přenosu pohlavním stykem (Hernández-Mora et al. 2008). V neposlední řadě by neměl být podceněn ani možný nepřímý přenos prostřednictvím plicních parazitů u nichž byla identifikována *Brucella* spp. bez upřesnění konkrétního kmenu v době před zařazením *B. ceti* do nomenklatury (Perrett et al. 2004).

Brucella inopinata

V roce 2005 byla hospitalizována 71letá pacientka s horečkou, nízkou hladinou krevního tlaku, leukocytózou a zánětem v okolí pravého prsního implantátu. Po odstranění implantátů byly analyzovány vzorky krve a tekutiny z rány. Gramnegativní kokobacil byl izolován na agaru ze vzorku tekutiny z rány. Izolát BO1 byl podroben souboru mikrobiologických, biochemických a molekulárních analýz, při kterých vykazoval znaky rodu *Brucella*, ale lišil se od všech dříve popsanych příslušníků tohoto rodu (De et al. 2008). Při použití druhově specifického multiplexního PCR testu vykazoval kmen BO1 jedinečný vzor a z fenotypové a molekulární analýzy bylo patrné, že kmen BO1 se jednoznačně odlišuje od všech ostatních druhů rodu *Brucella*, a proto byl označen jako doposud nepopsaný druh v rámci rodu *Brucella*. Vzhledem k jeho překvapivé izolaci byl navržen název *Brucella inopinata* neboli „neočekávaný“ (Scholz et al. 2010).

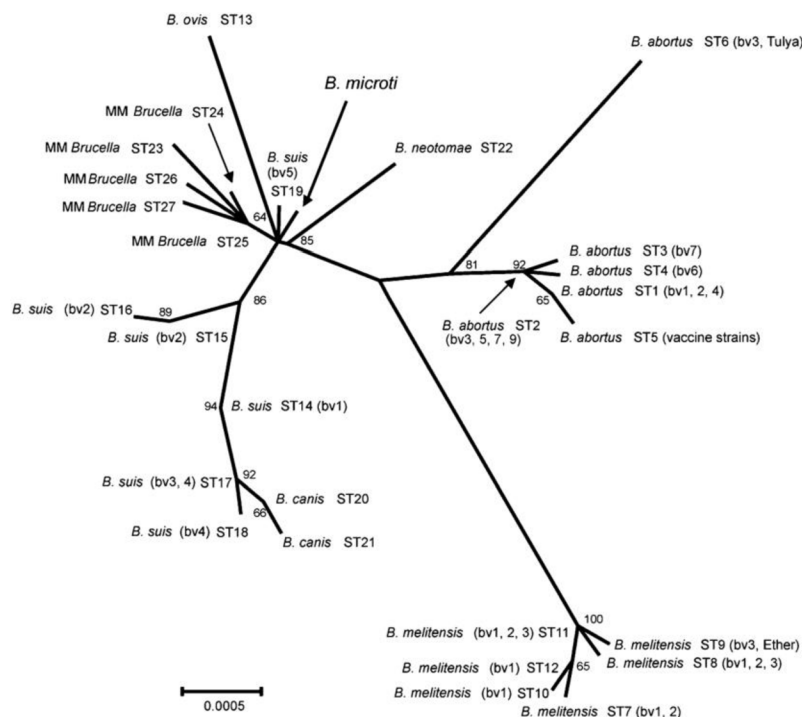


Obrázek č. 4: Fylogenetická rekonstrukce vztahů mezi *Brucella* spp. a izolátem BO1 (zdroj: De et al. 2008)

Doposud není znám zdroj nákazy ani přirozený hostitel *B. inopinata* a jen několik málo dalších studií popisuje nález podobného patogenu, nikoliv však stejného. Zavádějíci jsou i hostitelé těchto pravděpodobně brucelózních organismů, neboť se jedná o zástupce obojživelníků (Amphibia) (Eisenberg et al. 2012; Soler-Lloréns et al. 2016; Glabman et al. 2021). Případy infekcí způsobených brucelami u obojživelníků vykazují rozličné patologické stavy od asymptomatických stavů až po patologické stavy s vysokou mortalitou, což naznačuje, že *Brucella* může být komenzálním mikroorganismem nebo oportunním patogenem obojživelníků (Mühldorfer et al. 2017).

Brucella microti

B. microti je druh bakterie poprvé izolovaný z hraboše polního (*Microtus arvalis*). První dva izoláty (CCM 4915^T a CCM 4916) byly kultivovány ze vzorků během epizootie v okrese Břeclav na jižní Moravě v roce 2001 a byly podrobeny taxonomickému zkoumání. Izoláty bylo možné jasně odlišit od všech známých druhů brucel a jejich biovarů pomocí fenotypových i molekulárních vlastností, a proto pro ně byl navržen název *Brucella microti* (Scholz et al. 2008). Organismus se vyznačuje rychlým růstem na standardních substrátech a vysokou metabolickou aktivitou, která je pro brucely netypická (Hubálek et al. 2007).



Obrázek č. 5: Fylogenetická rekonstrukce vztahů mezi *Brucella* spp. a *B. microti* (zdroj: Scholz et al. 2008)

Na základě blízké fylogenetické příbuznosti *Brucella* spp. a *Ochrobactrum* spp. a vysoké metabolické aktivity *B. microti* byla zkoumána hypotéza, že rezervoár této bakterie se může nacházet v půdě. Vyšetřením vzorků půdy odebraných v oblasti první izolace v blízkosti nor bylo zjištěno, že *B. microti* dokáže účinně přežít v půdě obývané svým původním hostitelem a lze ji izolovat i šest měsíců po odběru při skladování při 4 °C. Toto zjištění naznačuje, že půda by mohla fungovat jako rezervoár infekce, nicméně zda je také primárním biotopem *B. microti* stále zůstává předmětem výzkumu (Scholz et al. 2008).

Brucella papionis

B. papionis byla poprvé detekována u 13leté samice paviána (*Papio* spp.), která byla odchycená ve volné přírodě v roce 1999 v Tanzanii a dovezena do chovné stanice v USA. Její čtvrtá březost v zajetí skončila po 117. dnech potratem bez vyloučení placenty. Byl jí odebrán stěr z děložního hrdla a vzorek krve. Kultivace byla pozitivní na *Brucella* spp. a *Staphylococcus epidermidis* a *Escherichia coli*. Při prohlídce zvířete byla odhalena zvětšená děloha a následné ultrazvukové vyšetření potvrdilo zadrženu placentu. U druhé samice z jiné lokality došlo k potratu již v 98. dni březosti, načež byla samice utracena a při pitvě byla zjištěna zvětšená děloha s hnisavým výtokem. Izoláty (F8/08-60^T a F8/08-61) z obou zvířat vykazovaly charakter dosud nepopsaného druhu rodu *Brucella* (Schlabritz-Loutsevitch et al. 2009).

Rozsáhlé fenotypové a genotypové analýzy prokázaly, že izoláty F8/08-60^T a F8/08-61 patří do rodu *Brucella*, ale jsou jasně odlišné oproti všem uznaným druhům tohoto rodu, a tak jim byl navržen název respektující jejich původ (Whatmore et al. 2014).

Brucella pinnipedialis

B. pinnipedialis byla jako samostatný druh navržena společně s *B. ceti*. Způsobuje infekce a související onemocnění především u ploutvonožců (Pinnipedia). První popsáný izolát NCTC 12890^T byl odebrán ze sleziny tuleň obecného (*Phoca vitulina*) (Foster et al. 2007).

Prozatím není zcela objasněn přenos, neboť na rozdíl od jiných druhů *Brucella*, testy neodhalily vertikální přenos patogenu u testovaných tuleňů kuželozubých (*Halichoerus grypus*) ani tuleňů obecných (*P. vitulina*) (Kroese et al. 2018). Usuzuje se, že přenos je zprostředkován výkaly, močí a ústními sekrety nebo i mořskými rybami

či bezobratlími. Tyto nedostatky poukazují na důležitost pochopení epizootologie této bakterie (Lambourn et al. 2013).

Nedostatečně popsána je i patogenita bakterie v populacích tuleňů. Histologické nálezy z pozitivních zvířat vykazují patologické změny ve vzorcích respirační tkáně, ale dosud nebylo možné vyloučit, že se nejedná o důsledek napadení plicními červy, které doprovází přítomnost *B. pinnipedialis*. Taktéž se nedá absolutně popsat vliv na reprodukci zvířat i přes klesající trend porodnosti některých druhů jako je tomu u čepcola hřebenatého (*Cystophora cristata*) i přes detekci bakterie v jejich organismu (Nymo et al. 2011).

Brucella vulpis

Liška obecná (*Vulpes vulpes*) je známým hostitelským druhem brucelózy. Dva atypické kmeny byly izolovány z lymfatických uzlin lišek ulovených ve východním Rakousku v roce 2008. Oba kmeny aglutinovaly s monospecifickým anti-brucelovým sérem A, avšak lišily se atypickými znaky od dosud popsaných druhů. Příslušnost k rodu *Brucella* byla potvrzena až sekvenováním genu 16S rRNA (Hofer et al. 2012). Pro stanovení jejich taxonomické příslušnosti a příbuznosti s ostatními zástupci rodu byly provedeny další fenotypové analýzy a celogenomové sekvenování obou kmenů. Na základě výsledků analýz bylo potvrzeno, že kmeny F60^T a F965 představují zcela nový druh rodu *Brucella* (Scholz et al. 2016).

3. *Brucella suis*

B. suis je gramnegativní kokobacil z čeledi Brucellaceae. V současné době je známo pět biovarů s různými preferencemi hostitelů. *B. suis* biovary 1, 2 a 3 se obvykle vyskytují u prasat. Biovar 4 se vyskytuje u sobů a karibu. Biovar 5 byl zjištěn pouze u hlodavců.

3.1 Genetická charakteristika

Bylo prokázáno, že kmeny biovarů *B. suis* se liší počtem a velikostí chromozomů. *B. suis* bv 1 má dva chromozomy o velikosti 2,1 Mb a 1,15 Mb (Tae et al. 2011), podobně jako ostatní *Brucella* spp. Dva chromozomy byly pozorovány také v genomu *B. suis* bv 2 a 4, ale o velikosti 1,85 Mb a 1,35 Mb, zatímco u *B. suis* bv 3 byl nalezen pouze jeden chromozom o velikosti 3,1 Mb, na jehož základě bylo navrženo, že různé kmeny brucely se vyvinuly z předka s jedním kruhovým chromozomem (Jumas-Bilak et al. 1998).

Analýza genomu ukazuje, že oba chromozomy mají pravděpodobně odlišný evoluční původ. Chr I se podobá klasickému bakteriálnímu kruhovému chromozomu s počátkem replikace v blízkosti shluku genů složeného z *dnaA*, *dnaN* a *recF*. Naproti tomu Chr II má shluk replikačních genů podobný plazmidům, včetně iniciačního proteinu replikace RepC a rozdělovacích proteinů RepA a RepB, které jsou obdobně konstruované jako replikační geny z Ti plazmidů *Agrobacterium* a plazmidů *Rhizobium* spp. (Paulsen et al. 2002).

3.2 Výskyt

V Africe jsou informace o brucelóze prasat způsobené *B. suis* omezené, pravděpodobně je to důsledek malé populace prasat na kontinentu a nedostatku epidemiologických studií. Brucelóza prasat byla hlášena v několika státech, jedná se o hlášení spíše ojedinělá, ale naznačující přítomnost *B. suis* v subsaharské Africe, ale blíže se nedá specifikovat biovar (McDermott & Arimi 2002). Za zmínku stojí i nález v egyptském chovu skotu, kde se podařilo detekovat *B. suis* bv 2 (Menshaw et al. 2014).

Jihoamerická prevalence je široce popsána, jak u domestikovaných prasat, tak divokých zvířat. Nejrozšířenějším je zde biovar 1, který se hojně vyskytoval

v brazilských chovech prasat (Meirelles-Bartoli et al. 2012), ale podařilo se ho detekovat i v divoce žijících zvířatech jako například u pásovce štetinatého (*Chaetophractus villosus*) v argentinské oblasti La Pampa (Kin et al. 2014) nebo pekari páskovaného (*Pecari tajacu*) ve Venezuele (Lord & Lord 1991).

V Asii se zřejmě *B. suis* vyskytuje v některých částech střední a jihovýchodní Asie, přičemž největší ekonomický dopad má v Čínské lidové republice, a to z důvodu vysoké produkce vepřového masa (Deqiu et al. 2002). Nejčastěji jsou detekovány biovary 1 a 3, které vedou ke sporadickým epidemiím, kde jsou hlavním zdrojem nákazy skot a prasata (Jiang et al. 2012).

Austrálie jako rizikový faktor brucelózy, způsobené *B. suis*, označila lov divokých prasat. Převážně za to může zvýšený počet hlášení infekce u psů, kteří se přímo účastnili lovu, anebo byli krmeni syrovým masem ulovených prasat (Mor et al. 2016).

V Severní Americe se populace divokých prasat přirozenou cestou nadměrně rozrůstají. V USA se odhaduje, že populace divokých prasat v nejméně 38 státech přesahuje počet 5 miliónů jedinců. Kvůli ekonomickému významu chovu prasat a skotu je důležité pro většinu států držet si status prosté země i pravidelným testováním, jehož výsledky jasně poukazují na rozšíření biovarů 1 a 3 (Pedersen et al. 2014).

Jediným kontinentem, kde převládá *B. suis* biovar 2 je Evropa. Největším rezervoárem jsou zde prase divoké evropské (*Sus scrofa scrofa*) a zajíc polní (*Lepus europaeus*). V důsledku toho mohou být tato zvířata zodpovědná za přenos *B. suis* bv 2 na extenzivně chovaná prasata (Abril et al. 2011). Jediným evropským státem, kde byl detekován *B. suis* bv 3, je Chorvatsko (Cvetnic et al. 2009).

3.3 Přenos

Infekce *B. suis* je způsobena především pohlavním přenosem během páření nebo inseminace a její vyšší prevalence v reprodukčních orgánech, než v jiných orgánech naznačuje, že při jejím přenosu hraje hlavní roli pohlavní sekret (Pilo et al. 2015). Mláďata se mohou patogenem infikovat *in utero* nebo od kojící samice, která vylučuje bakterie do mléka. Dále se přenáší požitím potravených plodů, plodových obalů, kontaminované potravy nebo přímým kontaktem s poškozenou tkání (Franco-Paredes et al. 2017).

Prozatím se nedá potvrdit ani vyloučit přenos *B. suis* skrz vektor. *B. melitensis* a *B. abortus* byly detekovány v členovcích již v roce 1954, kdy se je podařilo extrahovat z klíšťat *Dermacentor nuttalli* a *Hyalomma marginatum* na farmách v okresech Sovětského svazu, kde se vyskytla ohniska brucelózy skotu (Pritulin 1954). V nedávné době se podařilo obě bakterie detekovat i v *Dermacentor marginatus* při odběrech v asijských chovech skotu. Během studie byl vypořizován skrz vajíčka a larvy *D. marginatus* transovariální přenos (Wang et al. 2018). Lze tedy diskutovat, zda se takový přenos dá pozorovat v případě *B. suis*. Potenciálně by se dalo spekulovat, že pro tento přenos by v podmínkách střední Evropy byl vhodný piják lužní (*Dermacentor reticulatus*), který je vektorem bakterie *Francisella tularensis* (Wójcik-Fatla et al. 2015; Hubálek et al. 1998).

3.4 Patogeneze

B. suis se obvykle dostává do hostitele průnikem přes sliznice a je transportována buď volně nebo ve fagocytárních buňkách do lymfatických uzlin, kde dochází k počáteční replikaci a následnému šíření po celém těle. Bakterie se zpočátku lokalizují ve fagocytech v membránově vázaném kompartmentu (fagozomu), kde okyselené prostředí iniciuje sekreční systém typu IV (T4SS) kódovaný operonem virB, který narušuje fagozomální zránění (Rouot et al. 2003). Tento proces také neutralizuje pH kompartmentu, což vede k modifikovanému, nezrajícímu fagozomu („brucellosomu“), který se nespojuje s lysozomy, které by v normální případě provedly degradaci zralého fagozomu (Cutler et al. 2005). Překonáním nepřímé imunity se bakterie dostane do endoplazmatického retikula (ER), kde se vyhne hostitelské imunitní reakci a připojí se na vezikulární intracelulární transport mezi ER a Golgiho aparátem, čímž si vytvoří vhodnou pozici pro replikaci (Fugier et al. 2009).

3.5 Infekce u zvířat

3.5.1 Inkubační doba

Pokud se samice nakazí prostřednictvím přirozeného rozmnožování, objeví se různě závažné záněty placenty již po 21. dni březosti. Ty mohou způsobit odumření

embrya a jeho vyloučení v placentárních tkáních, což je pro chovatele jen zřídka odhalitelné. Prvním projevem časného potratu může být až návrat k říji ve zhruba 40. dnu po přirozené plemenitbě. Na základě pokusů lze rovněž očekávat, že infekce po 40. dni březosti vede k potratům v období od poloviny do konce gravidity. V přírodních podmínkách jsou aborty spojeny s infekcí mezi 50. a 100. dnem březosti. Méně časté jsou případy, kdy samice porodí mrtvé nebo slabé potomky mezi 100. a 110. dnem březosti. Uterální infekce nejčastěji přetrvává nejdéle 40 dní po abortu, ale v ojedinělých případech může být pozorována až 36 měsíců (Olsen & Tatum 2017).

3.5.2 Klinické projevy

Nejčastějšími klinickými příznaky jsou reprodukční ztráty, které mohou zahrnovat potraty, narození mrtvého plodu, narození slabých selat a snížení velikosti vrhu. Může se také objevit otok varlat, zánět nadvarlat, ochrnutí zadních končetin nebo zánět kloubů (Cilia et al. 2021).

3.5.3 Léčba

Experimentálně nejúčinnější se prokázala kombinovaná léčba veterinárním antibiotikem tildipirosinem a širokospektrálním tetracyklinovým antibiotikem oxytetracyklinem (Dieste-Pérez et al. 2015).

Možný rozvoj rezistence vůči antibiotikům, zvýšené náklady na léčbu a existence právních předpisů bránících jejich použití vedly k obecnému názoru, že brucelóza zvířat by se neměla léčit antibiotiky. Nicméně Světová zdravotnická organizace (WHO) doporučuje pro léčbu lidské brucelózy kombinovanou terapii tetracyklinovými antibiotiky se streptomycinem nebo tetracykliny s rifampicinem (Ariza et al. 2007).

3.5.4 Prevalence

Prevalence dosahuje od několika málo procent až do 45 %. Při zavlečení dochází k nárůstu klinických příznaků a úmrtnosti před odstavem. Pokud je však počáteční prevalence v rámci chovu nízká, doporučuje se pouze vyřazení jedinců z chovu. Odhadem by při testování každé 4 měsíce bylo ohnisko s 200 počátečními infikovanými zvířaty

eradikováno ve 4 kolovém testování bez ohledu na velikost farmy (Dieste-Pérez et al. 2016).

3.6 *Brucella suis* jako biologická zbraň

Infekce mezi pracovníky jatek a laboratoří naznačovaly, že brucely jsou mimořádně infekční i prostřednictvím aerosolu. Odhadem k vyvolání onemocnění u lidí stačí vdechnutí 10 až 100 bakterií. To vedlo k tomu, že někteří pokládali brucely za nosiče vhodné k použití v biologickém arzenálu (Christopher et al. 2005). Spojené státy americké si v době rozmachu biologických zbraní vybrali právě *B. suis* jako potenciálně nebezpečnou zbraň. V roce 1952 proběhly rozsáhlé testovací operace s náložemi obsahujícími *B. suis*, načež byly tyto náložky vyráběny v nově postaveném vojenském prostoru Pine Bluff Arsenal v Arkansasu (Pappas et al. 2006).

3.7 Diagnostika

Sérologické vyšetření je chápáno jako primárním standardem pro diagnostiku brucelózy prasat. *B. suis* exprimuje dva lipopolysacharidy (LPS) A a M, které jsou antigenně odlišné a *Brucella* spp. se jednotlivě liší v expresi LPS. Během testování se používají monoklonální protilátky proti A- nebo M-LPS. Pro srovnání, monoklonální protilátky proti antigenu M se neváží na kmeny *B. abortus* (dominantní A) a monoklonální protilátky proti antigenu A nerozpoznávají kmeny *B. melitensis* (dominantní M) (Douglas & Palmer 1988). Sérologické testy používané pro *B. suis* zahrnují nepřímý nebo kompetitivní test ELISA, Rose Bengal test (antigenní test na *Brucella* spp.), komplement fixační test a fluorescenční imunoanalýzu (FPA) (Ferris et al. 1995). Sérologie může pomoci identifikovat infikované stádo, ale u jednotlivých zvířat se nepovažuje za spolehlivou. Publikace uvádějí, že sérologické testy byly schopny identifikovat pouze 52 % přirozeně infikovaných divokých prasat jako séropozitivní (Pedersen et al. 2014).

B. suis lze také diagnostikovat pomocí PCR. V literatuře byla popsána řada testů PCR, nejprve testy rozlišovaly pouze mezi *Brucella* spp. (Ratushna et al. 2006) a následně zdokonalení testů PCR umožnilo typizaci biovarů v rámci *Brucella* spp. včetně *B. suis* (Ferraobeck et al. 2006).

4. Cíle práce

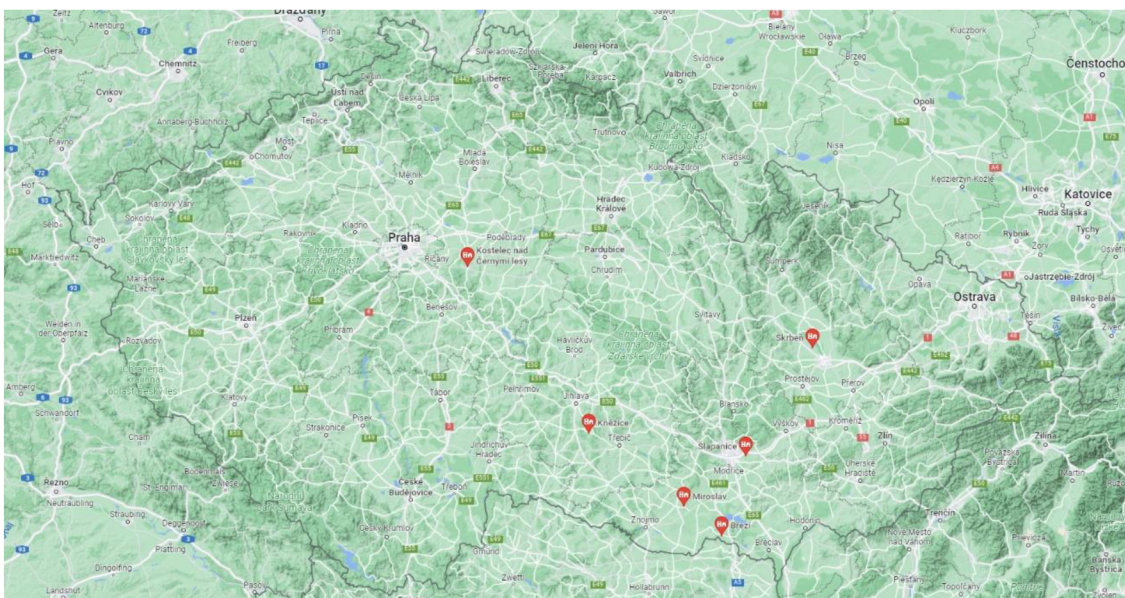
Mnohé bakterie rodu *Brucella* patří mezi nebezpečné lidské i zvířecí patogeny a některé z nich jsou dokonce počítány mezi potenciálně využitelné biologické zbraně. Jedním ze zástupců rodu *Brucella* je i bakterie *Brucella suis*. U domácích zvířat byla tato bakterie v Evropě eradikována. Lidé se ale mohou nakazit právě od volně žijících zvířat, kteří slouží jako rezervoár pro tuto bakterii. *B. suis* byla v minulosti opakovaně detekována u různých druhů lovné zvěře napříč Evropou. Informace o její prevalenci v České republice jsou ale omezené. Cílem této práce je proto rozšířit naše znalosti o prevalenci *B. suis* v rezervoárových zvířatech v České republice.

5. Metodika a materiál

5.1 Lokality

Sběr vzorků v lokalitách Skrbeň, Břeží, Šlapanice, Kněžice a Miroslav byl řízen skrze místní myslivecká sdružení, zatímco v lokalitě Kostelec nad Černými lesy byly vzorky sbírány na pozemcích Školního lesního podniku České zemědělské univerzity, a to ve spolupráci s Fakultou lesnickou a dřevařskou.

Obec Skrbeň se nachází v Olomouckém kraji, obec Kostelec nad Černými lesy ve Středočeském kraji, obec Břeží a města Šlapanice a Miroslav v Jihomoravském kraji a jako poslední obec Kněžice v Kraji Vysočina.



Obrázek č. 6: Mapa lokalit využitých pro sběr vzorků

5.2 Sběr a uskladnění vzorků

Odběr krve probíhal z těl již usmrcených zvířat v různých lokalitách během dvou loveckých sezón v letech 2021 a 2022. Pro transport vzorků do laboratoře byly použity chladičové boxy, z kterých se materiál přesunul do chladičového zařízení o teplotě -20°C .

Pro práci bylo použito 133 vzorků odebraných z ulovených zajíců polních (*Lepus europaeus*) a 48 vzorků z prasat divokých (*Sus scrofa*). Počet vzorků testovaných na *B. suis* podle lokalit a loveckých sezón je uveden v **Tabulce č. 2**.

Tabulka č. 2: Počet vzorků testovaných na *B. suis* podle lokalit

Zdroj vzorků	Lokalita	Počet vzorků	Lovecká sezóna
zajíc polní (<i>L. europaeus</i>)	Březi	18	2021/2022
	Kněžice	21	
	Miroslav	65	
	Skrbeň	5	
	Šlapanice	24	
prase divoké (<i>S. scrofa</i>)	Kostelec nad Černými lesy	48	2022/2023

5.3 Extrakce DNA

Zpracování vzorků probíhalo výhradně v Laboratoři pro detekci a charakterizaci patogenů na ČZU v Praze v prvním podzemním podlaží pavilonu T, která je certifikována jako laboratoř pro práci se vzorky s biologickým rizikem na úrovni BSL2. Samotná extrakce DNA byla provedena pomocí sady DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN).

Krevní séra byla nejprve vyjmuta z mrazícího zařízení a ve stojanu ponechána do dosažení pokojové teploty. Do centrifugačních zkumavek o objemu 1,5 ml bylo napipetováno 20 µl proteinázy K, ke které bylo následně přidáno 50 µl krevního séra. Celý objem zkumavky byl doplněn na 220 µl pomocí zředěného fosfátového pufru PBS. Do směsi bylo přidáno 200 µl roztoku Buffer AL a celý objem byl intenzivně promíchán. Následně byl obsah zkumavky inkubován při 56 °C po dobu 10 minut, čímž se docílila degradace bílkovin a narušení buněk pomocí proteinázy K a došlo k vyplavování nukleových kyselin. Po uplynutí požadované doby inkubace bylo do vzorku přidáno 200 µl 96% ethanolu pro ukončení biochemických reakcí a obsah byl opět homogenizován pomocí vortexu.

Vzorky byly přeneseny do nových zkumavek s křemičitým filtrem a sběrnou nádobkou o objemu 2 ml pomocí pipety a odstředěny v centrifuze při 8000 otáčkách za minutu (rpm) po dobu 1 minuty. Během odstředování se na křemičitém filtru uchytila DNA z lyzátu a nečistoty byly vneseny do sběrné nádoby, proto bylo nutné po odstředění

sběrnou nádobku s průtokem odejmout a nahradit nádobkou novou. Následně bylo do vzorku napipetováno 500 µl roztoku Buffer AW1, jehož účelem je vyčistit na filtru uchycené nukleové kyseliny od přebytečného buněčného materiálu. Směs byla opět odstředěna při 8000 rpm po dobu 1 minuty a výsledný průtok byl ze sběrné nádoby vylit. Poté byl postup zopakován s roztokem Buffer AW2 o stejném objemu a 14 000 otáčkách po dobu 3 minut.

Následně byla svrchní část s filtrem, kde se nacházela izolovaná DNA, přenesena do nové 1,5 ml zkumavky a pomocí pipety bylo nanášeno 200 µl roztoku Buffer AE přímo na membránu filtru. Směs byla ponechána inkubaci při pokojové teplotě po dobu 1 minuty. Následná finální centrifugace při 8000 rpm po dobu 1 minuty zajistila, že Buffer AE při přechodu skrz filtr navázal izolovanou DNA. Filtry byly po odstředění vyhozeny a zkumavky s výsledným eluátem DNA uchovány pro nadcházející testování v mrazícím zařízení při teplotě -20°C.

5.4 PCR

Pro výzkum provedený v této práci byla vybrána metoda standardního PCR. Zahrnuje použití jedné sady primerů v postupu sestaveného na základě vědecké publikace autorů Hänsel et al. (2015) a efektivního použití primeru. Provedený postup se od původního postupu uvedeného v referenci liší, neboť nebyla použita sonda a metoda qPCR. Byl tedy analyzován až výsledný produkt pomocí gelové elektroforézy.

Vybrané primery cílí na 106 bp dlouhý fragment lokusu BS1330_II0657 kódovaného na chromozomu 2. Pozitivní nález lze zaznamenat u všech *Brucella* spp., ale amplicon pro ostatní brucely by byl kratší než pro *B. suis* bv 1-4, pro které se primery stávají specifické při použití již zmiňované sondy. U *Brucella* spp. a *B. suis* bv 5 vede k velikosti fragmentu 89 bp, zatímco pro *B. suis* bv 1-4 dosahuje fragment velikosti 106 bp (Hänsel et al. 2015).

5.4.1 Použité primery

V **Tabulce č. 3** jsou popsány primery, které byly použity během výzkumu. Pro jednotlivé primery je uveden jejich název, sekvence, velikost ampliconu a teplota nasedání.

Tabulka č. 3: Primery použité pro detekci *Brucella suis*

Název primeru	Sekvence (5'-3')	Velikost amplikonu (bp)	Teplota nasedání (°C)
B.suisF	GCC AAA TAT CCA TGC GGG AAG	106	64,5
B.suisR	TGG GCA TTC TCT ACG GTG TG	106	64,5

5.4.2 Reakční mix

Pro vyhotovení PCR reakce je důležitou součástí reakční směs, která zajistí správný průběh. Pro tento výzkum byl zvolen PPP Master mix (BioTop), který představuje ideální řešení, protože obsahuje nejen Taq polymerázu, ale i veškeré reakční pufrы a Mg²⁺ ionty ve formě MgCl₂. Výrobce je dodáván 2x koncentrovaný, tudíž po přidání templátové DNA, primerů a PCR H₂O dojde k namíchání požadované výsledné koncentrace 1x. Složení výsledného mixu na jeden vzorek je uvedeno v **Tabulce č. 4**.

Příprava vzorků pro vstup do PCR probíhala v laminárním boxu, aby se předešlo nežádoucí kontaminaci analyzovaných vzorků případnou nežádoucí DNA, která by mohla zkreslit výsledek.

Tabulka č. 4: Složení mixu pro PCR reakci

Složka	Objem (μl)
PPP Master mix 2x	12,5
PCR H ₂ O	9,5
Forward primer B.suisF	1
Reverse primer B.suisR	1
Templátová DNA	1
Finální objem	25

5.4.3 Průběh PCR reakce

Pro vyhotovení PCR reakce byl použit přístroj T100 Thermal Cycler (Bio-Rad). Objem jednoho vzorku činil 25 μ l. Průběh reakce a teplotní profily jednotlivých cyklů jsou zaznamenány v **Tabulce č. 5**.

Po zkušebních testech před zahájením ostrého provozu pokusu bylo rozhodnuto nastavit počet opakování na 40 cyklů. Jednotlivé kroky na sebe postupně navazovaly a celá reakce trvala přibližně hodinu a půl.

Tabulka č. 5: Přehled průběhu PCR reakce

Cyklus	Teplota	Čas	Počet opakování
Počáteční denaturace	94 °C	1 minuta	-
Denaturace	95 °C	15 sekund	40x
Nasedání primerů	64,5 °C	15 sekund	
Amplifikace DNA	72 °C	45 sekund	
Finální elongace	72 °C	5 minut	-
Chlazení	10 °C	-	-

5.5 Gelová elektroforéza

Gelová elektroforéza je využívána k vizualizaci amplifikovaného produktu PCR reakce. Principiálně dochází k separaci makromolekul a jejich fragmentů vzhledem k jejich velikosti, tvaru či náboji. Makromolekuly jsou v elektromagnetickém poli „taženy“ skrze pórovitý gel. Molekuly o kratší délce se pohybují rychleji a migrují dále než delší molekuly, protože kratší molekuly snadněji migrují skrze póry gelu. Elektroforézu na agarózovém gelu lze také použít k separaci fragmentů DNA v rozsahu od 40 bazických párů až do několika megabází, ale lepší je pro analýzu malých fragmentů. Vzdálenost mezi pásy DNA různých délek je ovlivněna procentem agarózy v gelu, kdy vysokoprocentní gel může značně protáhnout dobu vyhotovení (Stellwagen 2009).

Pro vizualizaci výsledků experimentu uvedeného v této práci byla využita elektroforéza na agarózovém gelu. Gel byl připravován do horizontální formy o objemu 100 ml pomocí hřebenu s 14 hroty. Ve 100 ml TBE (Tris-borát-EDTA) pufru bylo rozpuštěno 1,5g agarózy, čímž vznikl 1,5% gel, do kterého se pomocí pipety vneslo 4 μ l ethidium bromidu (EtBr). EtBr se v gelu používá jako barvivo, jež se váže mezi bazické páry nukleových kyselin, a poté reaguje na ultrafialové záření (Waring 1965).

Po zatuhnutí gelu byla forma vložena do boxu a zalita TBE pufrem, který sloužil jako mediátor pro vedení elektrického proudu. Do jamek v gelu byly aplikovány skrze TBE produkty PCR. Předepsaný rozdíl napětí mezi elektrodami činil 5 V/cm a bylo tedy použito celkové napětí 95 V po dobu 60 minut. Po separaci molekul DNA byl gel vyňat a výsledky byly hodnoceny pod ultrafialovým světlem emitovaným od fluorescenčního EtBr.

5.6 Vyhodnocení pozitivitu vzorků

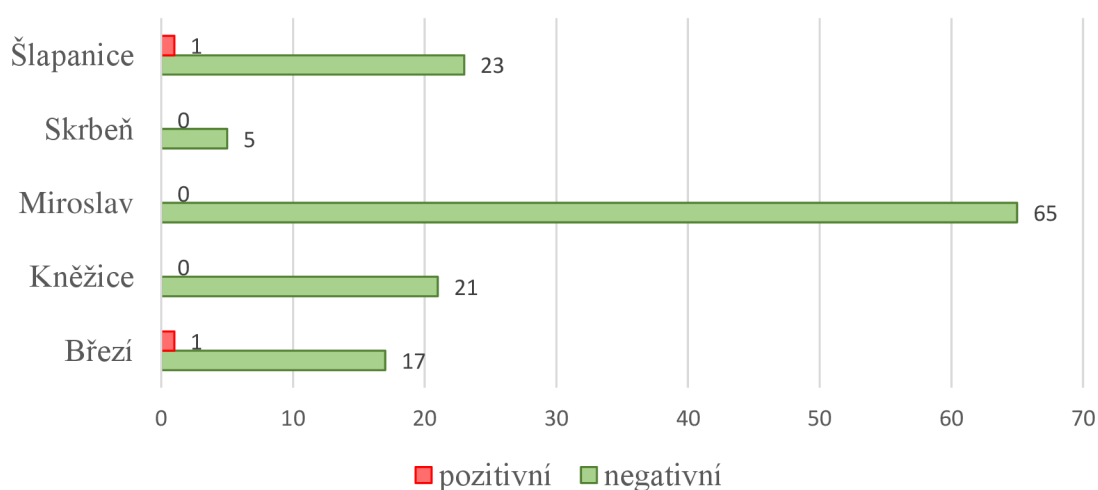
Pomocí elektroforézy na agarózovém gelu bylo možné detekovat amplikony cílené sekvence. Vzorky byly porovnávány s pozitivním vzorkem na *B. suis* poskytnutým akreditovanou laboratoří z Vojenského výzkumného ústavu. Pozitivní vzorek se objevil na gelu na úrovni 106 bp. Konkrétní identifikace jednotlivých biovarů *B. suis* není touto metodou dosažitelné. Není tedy vyloučeno, že vzorky budou podrobeny specifitějšímu testu či celogenomové sekvenaci.

6. Výsledky

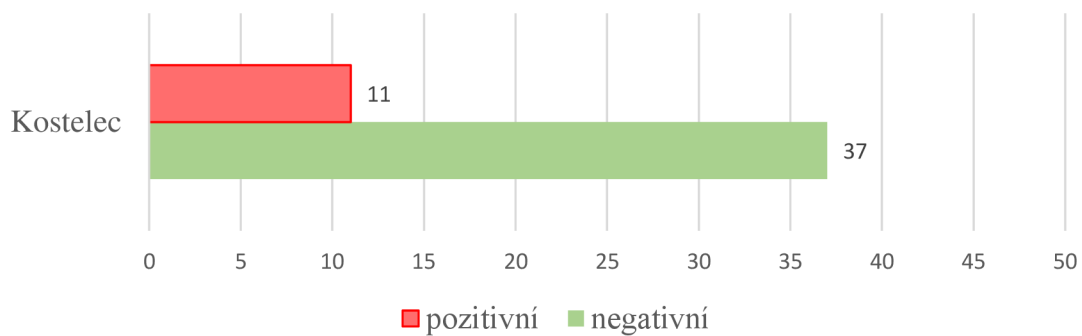
Pomocí gelové elektroforézy bylo prokázáno celkem 13 pozitivních nálezů, které jsou uvedené v **Tabulce č. 6**. Počty pozitivních výsledků jsou znázorněny na **Obrázku č. 7** a **č. 8**. Pozitivní nálezy jsou na gelu průkazné jako viditelný světlý pruh na pozici 106 bp. Příklady průkaznosti lze vidět na **Obrázku č. 9** a **Obrázku č. 10** společně s popisem identifikačního čísla vedeným v laboratoři.

Tabulka č 6: Počty pozitivních nálezů v rámci lokalit

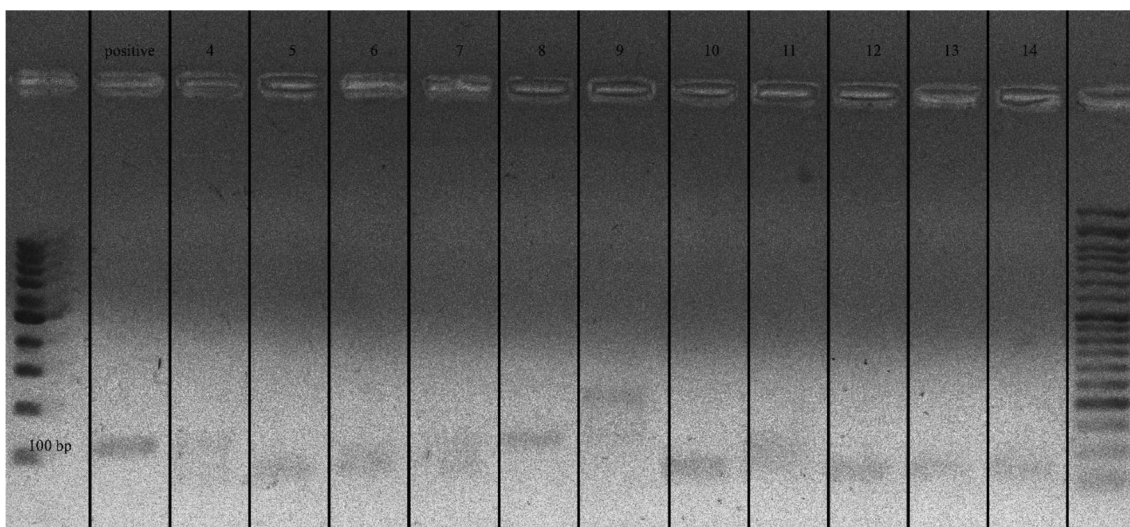
Zdroj vzorků	Lokalita	Počet vzorků	Počet pozitivních vzorků
zajíc polní (<i>L. europaeus</i>)	Břeží	18	1
	Kněžice	21	0
	Miroslav	65	0
	Skrbeň	5	0
	Šlapanice	24	1
prase divoké (<i>S. scrofa</i>)	Kostelec nad Černými lesy	48	11



Obrázek č. 7: Počet pozitivně testovaných vzorků zajíců polních v lokalitách



Obrázek č. 8: Počet pozitivně a negativně testovaných vzorků prasat divokých

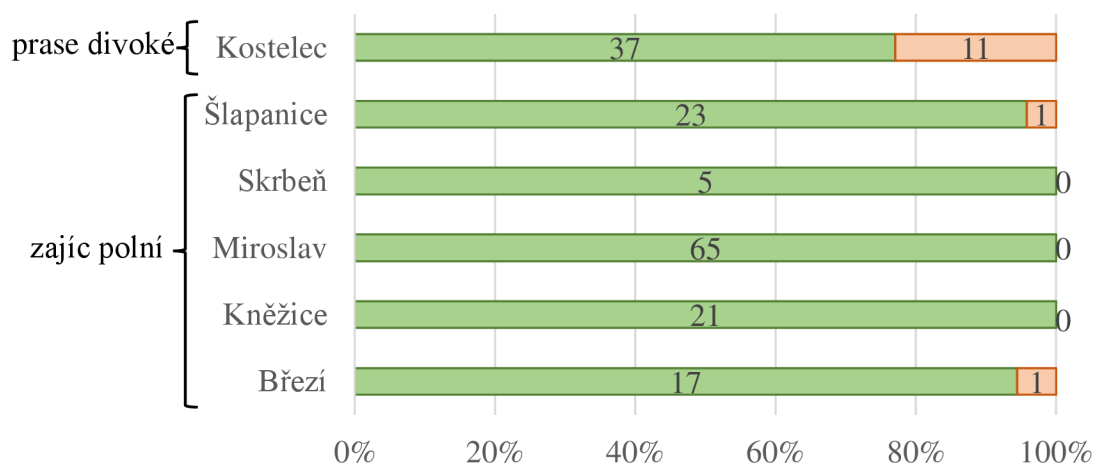


Obrázek č. 9: Výsledky gelové elektroforézy (6. 2. 2023) (fotografie autora)



Obrázek č. 10: Výsledky gelové elektroforézy (27.1. 2023) (fotografie autora)

Z výsledků, byla vypočítána prevalence *B. suis* pro tři lokality s pozitivním nálezem. Pro Březí činila 5,56 %, pro Šlapanice 4,17 % a pro Kostelec nad Černými lesy 22,92 %. Pro celkovou testovanou populaci zajíců polních (*L. europaeus*) byla vypočítána prevalence 1,50 %. Poměry pozitivních k negativním výsledkům v rámci lokalit jsou znázorněny na **Obrázku č. 11**.



Obrázek č. 11: Prevalence *B. suis* u různých hostitelů na různých lokalitách

7. Diskuze

Česká republika je prostá brucelózy všech hospodářských zvířat a mezi chovy nepředstavuje epidemiologické riziko. Přesto je užitečné mít řádné povědomí o pravděpodobnosti kontaktu s bakterií skrze divoká zvířata a předcházet infekci u lidí. Potenciální infekci jsou vystaveny především profese přicházející do kontaktu s divočáky a zajíci.

U domácích prasat se prasečí brucelóza vyšetřuje u plemenných kanců před přijetím do chovu ve střediscích pro odběr spermatu, u zmetalky a u všech poražených prasnic a kanců. Od roku 2014 do roku 2021 neevidují orgány veterinární správy žádnou nákazu mezi chovnými prasaty (SVS 2022). Avšak o vyšetření vzorku z divokého prasete si musí zažádat sám lovec při podezření na nákazu u svého úlovku. V posledním informačního bulletinu SVS není uvedeno testování vzorku na přítomnost *B. suis* v divokých prasatech. Výše ulovených divokých prasat byla v sezóně 2021/2022 druhá nejvyšší od roku 1950, nicméně ani mezi nimi nebyla podle dostupných informací detekována *B. suis* (Lotocký & Turek 2022; SVS 2022). Z výsledků této práce vyplývá, že *B. suis* je možná neopodstatněně přehlíženým patogenem u černé zvěře a její prevalence by měla být předmětem hlubšího zkoumání a apelem pro frekventovanější využívání doporučeného testování při nálezu některého z klinických příznaků.

V sousedním Bavorsku probíhala od ledna 2019 do prosince 2021 rozsáhlá studie, kde byly použity sérologické i molekulární metody. Tato studie brucelózy u divokých prasat odhalila v Bavorsku sérologický výskyt 17,9 %. Přímá detekce patogenu pomocí PCR byla úspěšná v osmi případech (1,2 %) a byla kladně hodnocena v porovnání s dříve zveřejněnými zprávami, kdy se v Německu pohybovala prevalence v rozmezí od 0,2 % do 22,0 %. (Macías Luaces et al. 2023). Výsledky této bakalářské práce hodnotou prevalence převyšují bavorské testování. Naše práce je ale omezená malým množstvím testovaných jedinců, kteří pocházejí pouze z jedné lokality. Neboť i v Bavorsku nejvyšší procentuální pozitivitu vykázal rok 2020, kdy byl testován nejnižší počet vzorků a celá studie vykazuje nepřímou úměrnost mezi pozitivitou a počtem testovaných jedinců. Je možné, že výzkum limituje menší počet vzorků a jejich soustředění v jediné lokalitě, která může být na *B. suis* četnější než jiné lokality, ale pro takové tvrzení by bylo příhodné provádět sérologické šetření společně s molekulárními metodami, jako tomu bylo v Bavorsku.

Pozoruhodné je pro výsledek porovnání s italskými výzkumy, kde jsou hodnoty vykazující široký meziroční rozptyl. Popisuje sérologické testování 2 267 vzorků a kultivaci z 1 841 jedinců. Sérologické testy a bakteriální kultivace byly provedeny z krevních sér jako tomu je v této práci. V rozmezí let 2001 až 2007 se séroprevalence pohybovala mezi přibližně 6 % a 32 % s celkovým průměrem 19,76 %. Přes kultivační metody byla bakterie izolována v rozmezí 6 % a 20 % s celkovým průměrem 10,75 % (Bergagna et al. 2009). Z čehož je zřejmé, že prevalence vyplývající z testování prasat divokých (*S. scrofa*) v Kostelci převyšuje výsledek italské kultivace. Pro lepší porozumění kostelecké infekce je nutné podrobit populaci dlouhodobému šetření, a nikoliv jednorázové studii, aby bylo jasné, zda výsledek 22,92 % je pro lokalitu horní hranicí či průměrem.

Zajíc polní (*L. europaeus*) mohou být zdrojem nákazy pro divoká prasata skrze exkrementy a plodové obaly, proto jsou v České republice vyšetřováni na základě podezření z nákazy. Za každý vzorek uhynulého zajíce je dána odměna ve výši 150 Kč. Ohniska nákazy jsou při případném pozitivním nálezů sledována po tři měsíce. I přes finanční odměnu bylo v roce 2021 v SVS evidováno testování jen 37 vzorků z nichž pouze jediný byl pozitivně testován na přítomnost brucely, a to v Královehradeckém kraji. Vzorky použité pro tuto práci pocházely z Jihomoravského kraje a Vysočiny, kde nebyl v roce 2021 zachycen jediný pozitivní nález. Jihomoravský kraj ve veterinární statistice zastupuje pouze jediný odevzdaný kadáver a Vysočinu dvanáct uhynulých jedinců, tudíž nelze porovnat, zda se na daném území vyskytuje nákaza sporadicky nebo dlouhodobě, k čemuž se přiklání starší studie (SVS 2022).

Zajíc polní jako potenciální zdroj původců zoonóz je v Evropě podrobován opakovaným výzkumům na širokou škálu patogenů. Tříletý výzkum na území jižní Moravy mezi lety 2004 a 2006 vykázal u celkem 1 051 testovaných zajíců séroprevalenci v hodnotě 1,6 % (Tremel et al. 2007). Z předešlé sérologické studie a výzkumu provedeném v této práci vyplývá, že brucelóza zajíce polního patří mezi nemoci přirozeně se vyskytující v tomto druhu v lokalitě jižní Moravy. Dokonce podle výsledků přetrvávala v letech 1971 až 2000 na poměrně stejném území ČR a byla zjištěna úzká souvislost mezi geografickým a ekologickým rozšířením a počtem přírodních ohnisek brucelózy v ČR, nicméně se zdá být nezávislá na populační hustotě zajíce polního (Pikula et al. 2005).

Výsledek je podobný prevalenci zkoumané během testování tularémie a brucelózy v Rakousku, kde v testované populaci 110 zajíců byla vypočítána prevalence 1,82 %. V případě rakouského testování se u obou pozitivních nálezů podařilo pomocí PCR detekovat *B. suis* bv 2 (Höflechner-Pörtl et al. 2000), který prozatím nelze v této práci s určitou jistotou potvrdit. Lze ale spekulovat, že se taktéž jedná o bv 2, neboť u zajíců nebyl popsán výskyt jiného biovaru.

8. Závěr

Práce v literárním přehledu shrnuje dosavadní poznatky o bakteriích z rodu *Brucella* a detailněji o *B. suis*, jež byla předmětem následného výzkumu v praktické části. Výzkum ukazuje míru infekce patogenu v populacích dvou nejznámějších volně žijících rezervoárů *B. suis*.

Pozitivní nález ve vzorcích dokládá výskyt bakterie v obou studovaných druzích. Prevalence mezi testovanými druhy se značně liší, nicméně potvrzuje výsledky získané jinými autory v jiných státech. Nelze však potvrdit dominanci některého z biovarů, neboť nebyla provedena příslušná analýza.

S ohledem na veřejné zdraví je však doporučeno vyvarovat se konzumaci nedostatečně upravených produktů z lovné zvěře celkově, neboť patogen má širokou škálu hostitelů, je vysoce nakažlivý a nelze vyloučit, že se nevyskytuje i v jiných lokalitách České republiky než v těch, které byly vybrány pro testování.

Předmětem dalšího studia by mohla být nejen typizace biovaru, která by mohla odkrýt riziko přenosu na člověka, ale také výskyt patogenu v ostatních druzích zvěře nebo půdě v lokalitách s pozitivním nálezem.

9. Seznam použité literatury

- Abril C, Thomann A, Brodard I, Wu N, Ryser-Degiorgis M-P, Frey J, Overesch G. 2011. A novel isolation method of *Brucella* species and molecular tracking of *Brucella suis* biovar 2 in domestic and wild animals. *Veterinary Microbiology* **150**:405-410.
- Ariza J et al. 2007. Perspectives for the Treatment of Brucellosis in the 21st Century: The Ioannina Recommendations. *PLoS Medicine* **4**:1872-1878.
- Bergagna S, Zoppi S, Ferroglio E, Gobetto M, Dondo A, Giannatale ED, Gennero MS, Grattarola C. 2009. Epidemiologic Survey for *Brucella suis* Biovar 2 in a Wild Boar (*Sus scrofa*) Population in Northwest Italy. *Journal of Wildlife Diseases* **45**:1178-1181.
- Bergey DH, Holt JG. 1994. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 9th edition. Williams & Wilkins, Baltimore.
- Blankenship RM, Sanford JP. 1975. *Brucella canis*. *The American Journal of Medicine* **59**:424-426.
- Buddle MB. 1956. Studies on *Brucella ovis* (n.sp.), a cause of genital disease of sheep in new Zealand and Australia. *Journal of Hygiene* **54**:351-364.
- Burgess GW, Spencer TL, Norris MJ. 1985. Experimental infection of goats with *Brucella ovis*. *Australian Veterinary Journal* **62**:262-264.
- Cilia G, Fratini F, Turchi B, Angelini M, Cerri D, Bertelloni F. 2021. Genital *Brucella suis* Biovar 2 Infection of Wild Boar (*Sus scrofa*) Hunted in Tuscany (Italy). *Microorganisms* **9**:582.
- Corbel MJ. 2006. *Brucellosis in Humans and Animals*. WHO, Geneva.
- Cutler SJ, Whatmore AM, Commander NJ. 2005. Brucellosis - new aspects of an old disease. *Journal of Applied Microbiology* **98**:1270-1281.
- Cvetnic Z, Spicic S, Tonicic J, Benic M, Albert D, Thiebaud M, Garin-Bastuji B. 2009. *Brucella suis* infection in domestic pigs and wild boar in Croatia. *Revue Scientifique et Technique de l'OIE* **28**:1057-1067.
- D'Anastasio R, Zipfel B, Moggi-Cecchi J, Stanyon R, Capasso L, Vitzthum VJ. 2009. Possible Brucellosis in an Early Hominin Skeleton from Sterkfontein, South Africa. *PLoS ONE* **4**:1-5.
- De BK et al. 2008. Novel *Brucella* Strain (BO1) Associated with a Prosthetic Breast Implant Infection. *Journal of Clinical Microbiology* **46**:43-49.
- Deqiu S, Donglou X, Jiming Y. 2002. Epidemiology and control of brucellosis in China. *Veterinary Microbiology* **90**:165-182.
- Dieste-Pérez L, Fraile L, de Miguel MJ, Barberán M, Blasco JM, Muñoz PM. 2015. Studies on a suitable antibiotic therapy for treating swine brucellosis. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* **38**:357-364.
- Dieste-Pérez L, Frankena K, Blasco JM, Muñoz PM, de Jong MCM. 2016. Efficacy of antibiotic treatment and test-based culling strategies for eradicating brucellosis in commercial swine herds. *Preventive Veterinary Medicine* **126**:105-110.

- Douglas JT, Palmer DA. 1988. Use of monoclonal antibodies to identify the distribution of A and M epitopes on smooth *Brucella* species. *Journal of Clinical Microbiology* **26**:1353-1356.
- Eisenberg T et al. 2012. Isolation of Potentially Novel *Brucella* spp. from Frogs. *Applied and Environmental Microbiology* **78**:3753-3755.
- Ferraobeck L, Cardoso R, Munoz P, Demiguel M, Albert D, Ferreira A, Marin C, Thiebaud M, Jacques I, Grayon M. 2006. Development of a multiplex PCR assay for polymorphism analysis of *Brucella suis* biovars causing brucellosis in swine. *Veterinary Microbiology* **115**:269-277.
- Ferris RA, Schoenbaum MA, Crawford RP. 1995. Comparison of serologic tests and bacteriologic culture for detection of brucellosis in swine from naturally infected herds. *Journal of the American Veterinary Medical Association* **207**:1332-1333.
- Ficht T. 2010. *Brucella* taxonomy and evolution. *Future Microbiology* **5**:859-866.
- Flores-Castro R, Suarez F, Ramirez-Pfeiffer C, Carmichael LE. 1977. Canine brucellosis: bacteriological and serological investigation of naturally infected dogs in Mexico City. *Journal of Clinical Microbiology* **6**:591-597.
- Foster G, Osterman BS, Godfroid J, Jacques I, Cloeckaert A. 2007. *Brucella ceti* sp. nov. and *Brucella pinnipedialis* sp. nov. for *Brucella* strains with cetaceans and seals as their preferred hosts. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **57**:2688-2693.
- Franco-Paredes C, Chastain D, Taylor P, Stocking S, Sellers B. 2017. Boar hunting and brucellosis caused by *Brucella suis*. *Travel Medicine and Infectious Disease* **16**:18-22.
- Fugier E, Salcedo SP, de Chastellier C, Pophillat M, Muller A, Arce-Gorvel V, Fourquet P, Gorvel J-P, Ausubel FM. 2009. The Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase and the Small GTPase Rab 2 Are Crucial for *Brucella* Replication. *PLoS Pathogens* **5**:1-13.
- Garin-Bastuji B, Blasco JM, Grayon M, Verger J-M. 1998. *Brucella melitensis* infection in sheep: Present and future. *Veterinary Research* **29**:255-274.
- Garin-Bastuji B, Mick V, Le Carrou G, Allix S, Perrett LL, Dawson CE, Groussaud P, Stubberfield EJ, Koylass M, Whatmore AM. 2014. Examination of Taxonomic Uncertainties Surrounding *Brucella abortus* bv. 7 by Phenotypic and Molecular Approaches. *Applied and Environmental Microbiology* **80**:1570-1579.
- Gibby IW, Gibby AM. 1965. Host-Parasite Relationships with *Brucella neotomae*. *Journal of Bacteriology* **89**:9-16.
- Glabman RA, Thompson KA, Mani R, Colburn R, Agnew DW. 2021. Atypical *Brucella inopinata* –Like Species in 2 Marine Toads. *Emerging Infectious Diseases* **27**:1748-1750.
- González-Barrientos R, Morales J-A, Hernández-Mora G, Barquero-Calvo E, Guzmán-Verri C, Chaves-Olarte E, Moreno E. 2010. Pathology of Striped Dolphins (*Stenella coeruleoalba*) Infected with *Brucella ceti*. *Journal of Comparative Pathology* **142**:347-352.

- Guzmán-Verri C, González-Barrientos R, Hernández-Mora G, Morales J-A, Baquero-Calvo E, Chaves-Olarte E, Moreno E. 2012. *Brucella ceti* and Brucellosis in Cetaceans. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* **2**:1-22.
- Guzmán-Verri C et al. 2019. Genetic and Phenotypic Characterization of the Etiological Agent of Canine Orchiepididymitis Smooth *Brucella* sp. BCCN84.3. *Frontiers in Veterinary Science* **6**:1-13.
- Hänsel C, Mertens K, Elschner MC, Melzer F. 2015. Novel real-time PCR detection assay for *Brucella suis*. *Veterinary Record Open* **2**:1-7.
- Hernández-Mora G, González-Barrientos R, Morales J-A, Chaves-Olarte E, Guzmán-Verri C, Baquero-Calvo E, De-Miguel M-J, Marín C-M, Blasco J-M, Moreno E. 2008. Neurobrucellosis in Stranded Dolphins, Costa Rica. *Emerging Infectious Diseases* **14**:1430-1433.
- Hernández-Mora G et al. 2017. Epidemiology of bovine brucellosis in Costa Rica: Lessons learned from failures in the control of the disease. *PLOS ONE* **12**:1-17.
- Hofer E, Revilla-Fernández S, Al Dahouk S, Riehm JM, Nöckler K, Zygmunt MS, Cloeckert A, Tomaso H, Scholz HC. 2012. A potential novel *Brucella* species isolated from mandibular lymph nodes of red foxes in Austria. *Veterinary Microbiology* **155**:93-99.
- Höflechner-Pörtl A, Hofer E, Awad-Masalmeh M, Müller M, Steineck T. 2000. Prevalence of tularaemia and brucellosis in European brown hare (*Lepus europaeus*) and red fox (*Vulpes vulpes*) in Austria. *Tierärztliche Umschau* **55**:264-268.
- Hollett RB. 2006. Canine brucellosis: Outbreaks and compliance. *Theriogenology* **66**:575-587.
- Hubálek Z, Scholz HC, Sedláček I, Melzer F, Sanogo YO, Nesvadbová J. 2007. Brucellosis of the Common Vole (*Microtus arvalis*). *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* **7**:679-688.
- Hubálek Z, Sixl W, Halouzka J. 1998. Francisella tularensis in Dermacentor reticulatus ticks from the Czech Republic and Austria. *Wiener klinische Wochenschrift* **110**:909-910.
- Christopher GW, Agan BK, Cieslak TJ, Olson PE. 2005. History of U.S. Military Contributions to the Study of Bacterial Zoonoses. *Military Medicine* **170**:39-48.
- Jamil T, Melzer F, Njeru J, El-Adawy H, Neubauer H, Wareth G. 2017. *Brucella abortus*: Current Research and Future Trends. *Current Clinical Microbiology Reports* **4**:1-10.
- Jauniaux TP, Brenez C, Fretin D, Godfroid J, Haelters J, Jacques T, Kerckhof F, Mast J, Sarlet M, Coignoul FL. 2010. *Brucella ceti* Infection in Harbor Porpoise (*Phocoena phocoena*). *Emerging Infectious Diseases* **16**:1966–1968.
- Jiang H, Chen H, Chen J-diao, Tian G-zhong, Zhao H-yan, Piao D-ri, Cui B-yun. 2012. Genetic comparison of *Brucella suis* biovar 3 in clinical cases in China. *Veterinary Microbiology* **160**:546-548.

- Jumas-Bilak E, Michaux-Charachon S, Bourg G, O'Callaghan D, Ramuz M. 1998. Differences in chromosome number and genome rearrangements in the genus *Brucella*. *Molecular Microbiology* **27**:99-106.
- Kaden R, Ferrari S, Jinnerot T, Lindberg M, Wahab T, Lavander M. 2018. *Brucella abortus*: determination of survival times and evaluation of methods for detection in several matrices. *BMC Infectious Diseases* **18**:1-6.
- Kin MS, Fort M, de Echaide ST, Casanave EB. 2014. *Brucella suis* in armadillos (*Chaetophractus villosus*) from La Pampa, Argentina. *Veterinary Microbiology* **170**:442-445.
- Kouba V. 2000. Historie eradikace bovinní brucelózy v České republice. *Časopis lékařů českých* **139**:227-230.
- Kroese MV et al. 2018. *Brucella pinnipedialis* in grey seals (*Halichoerus grypus*) and harbor seals (*Phoca vitulina*) in the Netherlands. *Journal of Wildlife Diseases* **54**:439-449.
- Lambourn DM, Garner M, Ewalt D, Raverty S, Sidor I, Jeffries SJ, Rhyan J, Gaydos JK. 2013. *Brucella pinnipedialis* infections in pacific harbor seals (*Phoca vitulina richardsi*) from Wahington State, USA. *Journal of Wildlife Diseases* **49**:802-815.
- Leclercq SO, Cloeckert A, Zygmunt MS. 2020. Taxonomic Organization of the Family Brucellaceae Based on a Phylogenomic Approach. *Frontiers in Microbiology* **10**:1-12.
- Lokamar PN, Kutwah MA, Atieli H, Gumo S, Ouma C. 2020. Socio-economic impacts of brucellosis on livestock production and reproduction performance in Koibatek and Marigat regions, Baringo County, Kenya. *BMC Veterinary Research* **16**:1-16.
- Lord VR, Lord RD. 1991. *Brucella suis* Infections in Collared Peccaries in Venezuela. *Journal of Wildlife Diseases* **27**:477-481.
- Lotocký M, Turek K. 2022. Myslivecká statistika 2021/2022. *Myslivost* 100:12. Myslivost s.r.o.
- Brucellosis: Overview. 2001. 1-2in Madkour's Brucellosis. Springer, Berlin/Heidelberg.
- Macías Luaces L, Boll K, Klose C, Domogalla-Urbansky J, Müller M, Eisenberger D, Riehm JM. 2023. Seroprevalence of *Brucella* Infection in Wild Boars (*Sus scrofa*) of Bavaria, Germany, 2019 to 2021 and Associated Genome Analysis of Five *B. suis* Biovar 2 Isolates. *Microorganisms* **11**:1-11.
- Mailles A et al. 2017. *Brucella suis* biovar 2 infection in humans in France: emerging infection or better recognition?. *Epidemiology and Infection* **145**:2711-2716.
- Mailles A, Rautureau S, Le Horgne JM, Poignet-Leroux B, d'Arnoux C, Dennetière G, Faure M, Lavigne JP, Bru JP, Garin-Bastuji B. 2012. Re-emergence of brucellosis in cattle in France and risk for human health. *Eurosurveillance* **17**:1-3.
- McCollum M, Rhyan J, Coburn S, Ewalt D, Lahr C, Nol P, Keefe T, Kimberling C, Salman M. 2013. Clinical, culture, serology, and histopathology outcomes of bighorn sheep experimentally infected with *Brucella ovis*. *Journal of Wildlife Diseases* **49**:900-910.
- McDermott JJ, Grace D, Zinsstag J. 2013. Economics of brucellosis impact and control in low-income countries. *Revue Scientifique et Technique de l'OIE* **32**:249-261.

- McDermott JJ, Arimi SM. 2002. Brucellosis in sub-Saharan Africa: epidemiology, control and impact. *Veterinary Microbiology* **90**:111-134.
- McDonald WL et al. 2006. Characterization of a *Brucella* sp. Strain as a Marine-Mammal Type despite Isolation from a Patient with Spinal Osteomyelitis in New Zealand. *Journal of Clinical Microbiology* **44**:4363-4370.
- Meirelles-Bartoli RB, Mathias LA, Samartino LE. 2012. Brucellosis due to *Brucella suis* in a swine herd associated with a human clinical case in the State of São Paulo, Brazil. *Tropical Animal Health and Production* **44**:1575-1579.
- Menshawy AMS et al. 2014. Assessment of Genetic Diversity of Zoonotic *Brucella* spp. Recovered from Livestock in Egypt Using Multiple Locus VNTR Analysis. *BioMed Research International* **2014**:1-7.
- Moreno E. 2020. The one hundred year journey of the genus *Brucella* (Meyer and Shaw 1920). *FEMS Microbiology Reviews* **45**:1–22.
- Moreno E, Blasco JM, Letesson JJ, Gorvel JP, Moriyón I. 2022. Pathogenicity and Its Implications in Taxonomy: The *Brucella* and *Ochrobactrum* Case. *Pathogens* **11**:1-18.
- Mor SM, Wiethoelter AK, Lee A, Moloney B, James DR, Malik R. 2016. Emergence of *Brucella suis* in dogs in New South Wales, Australia: clinical findings and implications for zoonotic transmission. *BMC Veterinary Research* **12**:1-12.
- Moustafa D, Garg VK, Jain N, Sriranganathan N, Vemulapalli R. 2011. Immunization of mice with gamma-irradiated *Brucella neotomae* and its recombinant strains induces protection against virulent *B. abortus*, *B. melitensis*, and *B. suis* challenge. *Vaccine* **29**:784-794.
- Mühldorfer K, Wibbelt G, Szentiks CA, Fischer D, Scholz HC, Zschöck M, Eisenberg T. 2017. The role of ‘atypical’ *Brucella* in amphibians: are we facing novel emerging pathogens?. *Journal of Applied Microbiology* **122**:40-53.
- Nielsen K, Duncan JR. 1990. *Animal Brucellosis*. CRC Press, Boston.
- Nymo IH, Tryland M, Godfroid J. 2011. A review of *Brucella* infection in marine mammals, with special emphasis on *Brucella pinnipedialis* in the hooded seal (*Cystophora cristata*). *Veterinary Research* **42**:93.
- Olsen S, Tatum F. 2017. Swine brucellosis: current perspectives. *Veterinary Medicine: Research and Reports* **8**:1-12.
- Osterman B, Moriyón I. 2006. International Committee on Systematics of Prokaryotes; Subcommittee on the taxonomy of *Brucella*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **56**:1173-1175.
- Pappas G, Panagopoulou P, Christou L, Akritidis N. 2006. Biological weapons. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* **63**:2229-2236.
- Paulsen IT et al. 2002. The *Brucella suis* genome reveals fundamental similarities between animal and plant pathogens and symbionts. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **99**:13148-13153.
- Pedersen K, Quance CR, Robbe-Austerman S, Piaggio AJ, Bevins SN, Goldstein SM, Gaston WD, DeLiberto TJ. 2014. Identification of *Brucella suis* from feral swine in selected states in the USA. *Journal of Wildlife Diseases* **50**:171-179.

- Perrett LL, Dawson CE, Davison N, Quinney S. 2004. Brucella infection of lungworms from a harbour porpoise. *The Veterinary Record* **154**:800.
- Pikula J, Beklova M, Holesovska Z, Skocovska B, Treml F. 2005. Ecology of brucellosis of the European hare in the Czech Republic. *Veterinární medicína* **50**:105-110.
- Pilo C, TEDDE MT, ORRÙ G, ADDIS G, LICCARDI M. 2015. *Brucella suis* infection in domestic pigs in Sardinia (Italy). *Epidemiology and Infection* **143**:2170-2177.
- Pritulin PI. 1954. On the Transmission of Brucellosis by the Pasture Ticks *Dermacentor nuttallia* and *Hyalomma marginatum*. *Veterinariya* **31**:31-33.
- Ratushna VG, Sturgill DM, Ramamoorthy S, Reichow SA, He Y, Lathigra R, Sriranganathan N, Halling SM, Boyle SM, Gibas CJ. 2006. Molecular targets for rapid identification of *Brucella* spp. *BMC Microbiology* **6**:1-20.
- Ridler AL, West DM, Stafford KJ, Wilson PR, Fenwick SG. 2011. Transmission of *Brucella ovis* from rams to red deer stags. *New Zealand Veterinary Journal* **48**:57-59.
- Roop RM, Bellaire BH, Valderas MW, Cardelli JA. 2004. Adaptation of the brucellae to their intracellular niche. *Molecular Microbiology* **52**:621-630.
- Rouot B, Alvarez-Martinez M-T, Marius C, Menanteau P, Guilloteau L, Boigegrain R-A, Zumbihl R, O'Callaghan D, Domke N, Baron C. 2003. Production of the Type IV Secretion System Differs among *Brucella* Species as Revealed with VirB5- and VirB8-Specific Antisera. *Infection and Immunity* **71**:1075-1082.
- Schlabritz-Loutsevitch NE et al. 2009. A novel *Brucella* isolate in association with two cases of stillbirth in non-human primates - first report. *Journal of Medical Primatology* **38**:70-73.
- Scholz HC et al. 2008. *Brucella microti* sp. nov., isolated from the common vole *Microtus arvalis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **58**:375-382.
- Scholz HC et al. 2008. Isolation of *Brucella microti* from Soil. *Emerging Infectious Diseases* **14**:1316-1317.
- Scholz HC et al. 2010. *Brucella inopinata* sp. nov., isolated from a breast implant infection. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **60**:801-808.
- Scholz HC et al. 2016. *Brucella vulpis* sp. nov., isolated from mandibular lymph nodes of red foxes (*Vulpes vulpes*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **66**:2090-2098.
- Schurig GG, Sriranganathan N, Corbel MJ. 2002. Brucellosis vaccines: past, present and future. *Veterinary Microbiology* **90**:479-496.
- Sohn AH, Probert WS, Glaser CA, Gupta N, Bollen AW, Wong JD, Grace EM, McDonald WC. 2003. Human Neurobrucellosis with Intracerebral Granuloma Caused by a Marine Mammal *Brucella* spp. *Emerging Infectious Diseases* **9**:485-488.
- Soler-Lloréns PF, Quance CR, Lawhon SD, Stuber TP, Edwards JF, Ficht TA, Robbe-Austerman S, O'Callaghan D, Keriell A. 2016. A *Brucella* spp. Isolate from a Pac-

- Man Frog (*Ceratophrys ornata*) Reveals Characteristics Departing from Classical Brucellae. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* **6**:116.
- Stellwagen NC. 2009. Electrophoresis of DNA in agarose gels, polyacrylamide gels and in free solution. *Electrophoresis* **30**:S188-S195.
- Stoenner HG, Lackman DB. 1957. A new species of *Brucella* isolated from the desert wood rat, *Neotoma lepida* Thomas. *American Journal of Veterinary Research* **18**:947-951.
- Suárez-Esquivel M et al. 2017. *Brucella neotomae* Infection in Humans, Costa Rica. *Emerging Infectious Diseases* **23**:997-1000.
- Tae H, Shallom S, Settlege R, Preston D, Adams LG, Garner HR. 2011. Revised Genome Sequence of *Brucella suis* 1330. *Journal of Bacteriology* **193**:6410-6410.
- Taleski V et al. 2002. An overview of the epidemiology and epizootology of brucellosis in selected countries of Central and Southeast Europe. *Veterinary Microbiology* **90**:147-155.
- Treml F, Pikula J, Bandouchova H, Horakova J. 2007. European brown hare as a potential source of zoonotic agents. *Veterinární medicína* **52**:451-456.
- Vergnaud G, Hauck Y, Christiany D, Daoud B, Pourcel C, Jacques I, Cloeckaert A, Zygmunt MS. 2018. Genotypic Expansion Within the Population Structure of Classical *Brucella* Species Revealed by MLVA16 Typing of 1404 *Brucella* Isolates From Different Animal and Geographic Origins, 1974–2006. *Frontiers in Microbiology* **9**:1-11.
- Wang Q, Zhao S, Wureli H, Xie S, Chen C, Wei Q, Cui B, Tu C, Wang Y. 2018. *Brucella melitensis* and *B. abortus* in eggs, larvae and engorged females of *Dermacentor marginatus*. *Ticks and Tick-borne Diseases* **9**:1045-1048.
- Wanke MM. 2004. Canine brucellosis. *Animal Reproduction Science* **82-83**:195-207.
- Waring MJ. 1965. Complex formation between ethidium bromide and nucleic acids. *Journal of Molecular Biology* **13**:269-282.
- Whatmore AM et al. 2014. *Brucella papionis* sp. nov., isolated from baboons (*Papio* spp.). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **64**:70-73.
- Wójcik-Fatla A, Zając V, Sawczyn A, Cisak E, Sroka J, Dutkiewicz J. 2015. Occurrence of *Francisella* spp. in *Dermacentor reticulatus* and *Ixodes ricinus* ticks collected in eastern Poland. *Ticks and Tick-borne Diseases* **6**:253-257.
- Zpráva o činnosti v oblasti ochrany zdraví zvířat v roce 2021. 2022. Státní veterinární správa, Praha.