

Utvrđivanje prisutnosti enterotoksina bakterije clostridium perfringens u fecesu zdravih pasa i pasa s proljevom

Lukman, Stella

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Veterinary Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Veterinarski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:178:615733>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-20**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Veterinary Medicine -
Repository of PHD, master's thesis](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

VETERINARSKI FAKULTET

Stella Lukman

UTVRĐIVANJE PRISUTNOSTI ENTEROTOKSINA BAKTERIJE CLOSTRIDIUM
PERFRINGENS U FECESU ZDRAVIH PASA I PASA S PROLJEVOM

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 2019.

Ovaj rad izrađen je na Zavodu za mikrobiologiju i zarazne bolesti s klinikom Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Predstojnik: prof. dr. sc. Zoran Milas

Mentorica: doc. dr. sc. Suzana Hađina

Članovi Povjerenstva za obranu diplomskog rada:

1. Prof. dr. sc. Ljubo Barbić
2. Doc. dr. sc. Vladimir Stevanović
3. Doc. dr. sc. Suzana Hađina
4. Doc. dr. sc. Josipa Habuš (zamjena)

Najsrdajnije zahvaljujem doc. dr. sc. Suzani Hađini na ukazanoj prilici, stručnom vodstvu i nesebičnoj pomoći prilikom izrade ovog rada.

Zahvaljujem svim djelatnicima Zavoda za mikrobiologiju i zarazne bolesti s klinikom na kolegijalnosti i pomoći pri provođenju istraživanja.

Posebnu zahvalu upućujem svojim prijateljima i kolegama na podršci, svim savjetima i strpljenju tijekom 6 godina studija.

Na posljetku, najiskrenije zahvaljujem svojoj obitelji koja je uvijek bila uz mene kada je najviše trebalo.

POPIS KRATICA

AHDS - sindrom akutnog hemoragičnog proljeva (eng. *acute haemorrhagic diarrhea syndrome*)

CPE - enterotoksin bakterije *Clostridium perfringens* (eng. *Clostridium perfringens enterotoxin*)

CPV-2 - pseći parvovirus tip 2 (eng. *canine parvovirus-2*)

DNK - deoksiribonukleinska kiselina

ELISA - imunoenzimni test (eng. *enzyme linked immunosorbent assay*)

pb - parovi baza

PCR - lančana reakcija polimerazom (eng. *polymerase chain reaction*)

RPLAA - reverzna pasivna lateks aglutinacija (eng. *reverse passive latex agglutination assay*)

TAE - tri acetat etilendiamintetraoctena kiselina

qPCR - lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (eng. *real-time polymerase chain reaction*)

POPIS TABLICA, SLIKA I GRAFIKONA

Tablice:

Tablica 1. Vrednovanje jačine simptoma zabilježenih tijekom kliničkog pregleda.

Tablica 2. Početnice za umnažanje odsječka genoma *C. perfringens* enterotoksina korištene u izvođenju PCR metode.

Slike:

Slika 1. Razmaz fecesa zdravog šteneta bojanog po Wrightu (povećanje $\times 1000$).

Slika 2. Mehanizam djelovanja enterotoksina bakterije *C. perfringens*.

Slika 3. Prikaz rezultata dobivenih PCR metodom.

Grafikoni:

Grafikon 1. Raspodjela dobnih skupina u zdravih pasa i pasa s proljevom.

Grafikon 2. Prikaz pasa s proljevom koji su u vrijeme kliničkog pregleda dobivali antimikrobnu terapiju.

Grafikon 3. Prikaz simptoma zabilježenih prilikom kliničkog pregleda pasa s proljevom.

Grafikon 4. Postotak pasa pozitivnih na enterotoksin bakterije *C. perfringens* analiziranih ELISA testom i PCR metodom.

SADRŽAJ

1.	UVOD	1
2.	PREGLED REZULTATA DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA.....	2
	2.1. <i>Etiologija</i>	2
	2.2. <i>Epizootiologija</i>	4
	2.3. <i>Patogeneza</i>	4
	2.4. <i>Klinička slika</i>	5
	2.5. <i>Dijagnostika</i>	6
	2.6. <i>Liječenje</i>	7
	2.7. <i>Javno zdravstvo</i>	7
3.	MATERIJALI I METODE	8
	3.1. <i>Sakupljanje uzoraka fecesa</i>	8
	3.2. <i>Određivanje prisutnosti enterotoksina (CPE) bakterije C. perfringens ELISA testom</i>	9
	3.3. <i>Izolacija DNK</i>	9
	3.4. <i>Određivanje prisutnosti gena za enterotoksin (cpe) bakterije C. perfringens PCR metodom</i>	10
	3.5. <i>Elektroforeza u gelu</i>	11
	3.6. <i>Statistička obrada podataka</i>	12
4.	REZULTATI	13
	4.1. <i>Podaci o životinjama</i>	13
	4.2. <i>Prisutnost enteroksina bakterije C. perfringens (CPE) utvrđene ELISA testom i gena za enterotoksin (cpe) utvrđenog PCR metodom</i>	15
	4.3. <i>Usporedba rezultata dobivenih ELISA testom i PCR metodom</i>	16
5.	RASPRAVA	18
6.	ZAKLJUČCI	23
7.	LITERATURA	24
8.	SAŽETAK	29
9.	SUMMARY	30
10.	ŽIVOTOPIS	31

1. UVOD

Clostridium perfringens je gram pozitivna, anaerobna bakterija koja se smatra oportunističkom patogenom bakterijom probavnog trakta u oko 80 % zdravih pasa. Njena uloga u nastanku probavnih poremećaja pasa još uvijek nije u potpunosti razjašnjena. Poznato je da je navedena bakterija podijeljena na pet biotipova, označenih slovima od A do E, zasnovanih na posjedovanju jednog ili više od četiri glavna gena za proizvodnju toksina: alfa (α), beta (β), iota (ι) i epsilon (ϵ). Iako svih pet mogu izlučivati enterotoksin (CPE, eng. *Clostridium perfringens enterotoxin*) najčešće ga izlučuje tip A, a važan je u patogenezi nastanka proljeva u pasa, koji može varirati od blagih i samoograničavajućih proljeva do akutnih hemoragičnih proljeva s letalnim ishodom (MARKS i KATHER, 2012.). Do sinteze CPE dolazi prilikom sporulacije vegetativnih stanica bakterije *C. perfringens*, nakon čega se on akumulira u njihovoj citoplazmi i prilikom njihove lize dolazi do njegovog oslobađanja u lumen tankog i/ili debelog crijeva. Suvremeni literaturni podaci i istraživanja pokazuju da bi enterotoksin bakterije *C. perfringens* (CPE) mogao biti odgovoran za nastanak proljeva u pasa no navedena činjenica nije u potpunosti razjašnjena budući da je CPE detektiran i u fecesu zdravih pasa.

Postoje različite metode dijagnostike prisutnosti navedenog toksina poput utvrđivanja broja endospora bakterije *C. perfringens*, izolacije uzročnika, imunoenzimnih testova, reverzne pasivne aglutinacije te različite molekularne metode. Važno je napomenuti da niti jedna od navedenih metoda ne predstavlja zlatni standard dijagnostike, ali je za identifikaciju enterotoksina najčešće korištena kombinacija imunoenzimnog testa zajedno s molekularnom metodom lančane reakcije polimerazom (PCR, eng. *polymerase chain reaction*). U suvremenoj dijagnostici koristi se i lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (qPCR, eng. *real-time polymerase chain reaction*).

Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi prisutnost CPE korištenjem imunoenzimnog testa (ELISA, eng. *enzyme linked immunosorbent assay*) te lančanom reakcijom polimerazom (PCR) u uzorcima fecesa zdravih pasa i pasa s proljevom različitih pasmina, spola i dobi te analizirati njegovu potencijalnu povezanost s pojavom proljeva.

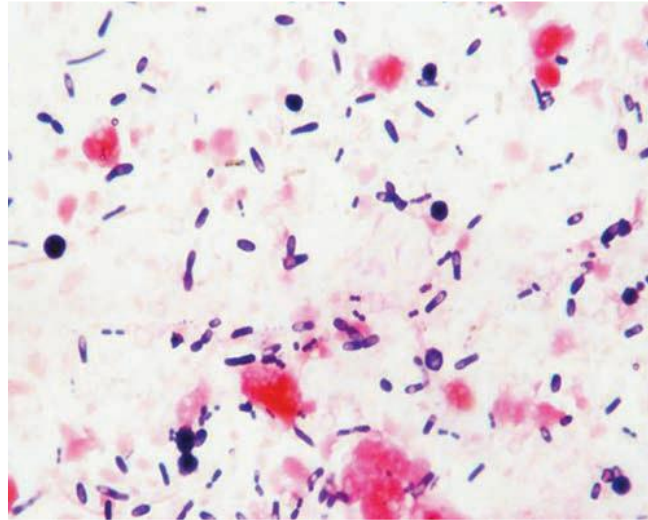
2. PREGLED REZULTATA DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA

2.1. Etiologija

Clostridium perfringens je bakterija iz roda *Clostridium* koja zajedno sa ostalim vrstama spada u skupinu anaerobnih i sporogenih bakterija, štapićastog oblika boje gram pozitivno no ovisno o starosti kulture mogu se obojati i gram negativno pa spadaju u skupinu gram varijabilnih bakterija. Bakterije ovog roda smatraju se anaerobnima, no sam *C. perfringens* ne zahtjeva strogo anaerobne uvjete te često raste u prisutnosti drugih bakterija (MARKS i sur., 2002.). Spore su najčešće veće od bakterijske stanice, jajolikog oblika i smještene centralno (Slika 1), a uzročnik ih stvara u nepovoljnim uvjetima. Za stvaranje spora *in vitro* potreban je medij lužnatog pH. Spore su izrazito otporne pa u prirodi opstaju u nepovoljnim uvjetima, najčešće u otpadnim vodama, zemlji, fecesu i hrani (LI i sur., 2016.). *C. perfringens* se razlikuje od ostalih stotinjak vrsta iz roda na temelju morfoloških i biokemijskih karakteristika te prema svojstvima rasta na hranjivim podlogama (WEESE i sur., 2003.). Tako je prilikom rasta *C. perfringens* na hranjivoj podlozi zamijećeno da posjeduje polisaharidnu kapsulu koju tvori samo ukoliko podloga sadrži serum. Također, prilikom uzgoja na krvnom agaru, kolonije te bakterije često stvaraju dvostruku zonu hemolize, odnosno oko kolonija se nalazi usko područje β -hemolize okruženo širim područjem nepotpune hemolize. *C. perfringens* sadrži enzim lecitinazu pa prilikom rasta kolonija na čvrstoj hranjivoj podlozi s dodatkom humanog seruma ili žutanjka dolazi do razgradnje lecitina koja se uočava kao zamućenje na podlozi, a naziva se Naglerova reakcija. Na taj način se alfa toksin bakterije *C. perfringens* koji ima aktivnost lecitinaze razlikuje od drugih vrsta *Clostridium* spp. koji također proizvode taj enzim (*C. baratti*, *C. absonum*, *C. bifermantans*, *C. sordelii* i *C. novyi*) (NAGLIĆ, 2005.).

Tipovi bakterije *C. perfringens* razvrstavaju se u pet različitih biotipova označenih slovima od A do E, ovisno o tome koliko pojedini tip sadrži glavnih toksina. Glavni toksini su alfa ($-\alpha$), beta ($-\beta$), iota ($-\iota$) i epsilon ($-\epsilon$). Svi tipovi bakterije *C. perfringens* proizvode alfa toksin. Tip B uz alfa proizvodi i beta i epsilon toksin, dok tip C također proizvodi beta toksin, a tip D epsilon toksin. Iota toksin izlučuje tip E. Većina toksina ima letalno djelovanje. Najčešći, alfa toksin sadrži enzim lecitinazu odnosno fosfolipazu C kojom fosforilira lipide te na taj način ošteti staničnu membranu i posljedično dovodi do smrti stanica, a uzrokuje plinsku gangrenu i proljeve. Beta toksin dovodi do nekroze stanica crijevnih resica i deskvamacije epitela te je zajedno sa epsilon toksinom uzročnik enterotoksemije u domaćih životinja, a povremeno i

ljudi. Epsilon toksin djeluje na živčani sustav te dovodi do povišenja hidrostatskog tlaka u krvnim žilama mozga i njihove povećane propusnosti te do pojave difuznih edema mozga. Jota toksinima tropizam prema epitelnim stanicama crijeva pa uzrokuje enteritise (CVETNIĆ, 2008.).



Slika 1. Razmaz fecesa zdravog šteneta bojanog po Wrightu. Vidljive su brojne endospore bakterije *C. perfringens* (povećanje $\times 1000$) (GREEN, 2012.)

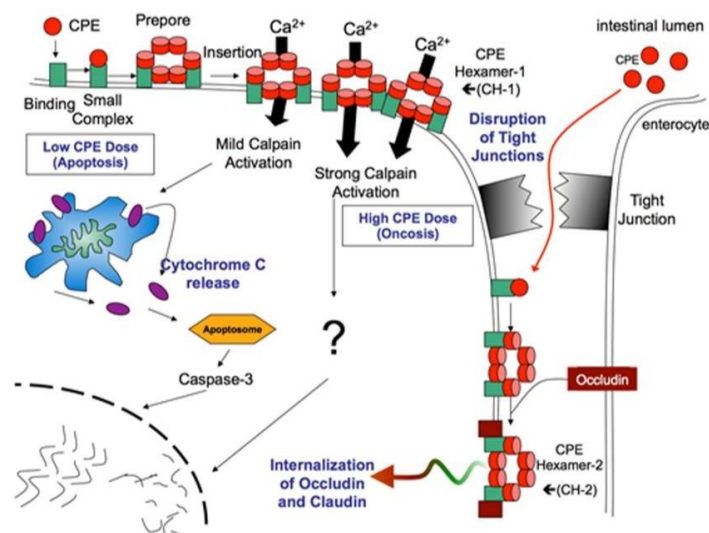
Svaki od biotipova može proizvoditi i neke od sporednih, dosada deset različitih otkrivenih, toksina. Jedan od njih je i enterotoksin bakterije *Clostridium perfringens* (CPE, eng. *Clostridium perfringens* enterotoxin), čije je stvaranje povezano sa stupnjem sporulacije bakterije, a do njegovog izlučivanja dolazi tijekom raspadanja vegetativnih stanica. Nedavno istraživanje je pokazalo da su pretežno svi CPE izolirani iz fecesa pasa pripadali biotipu A bakterije *C. perfringens* (DOSSIN, 2011.). Enterotoksogeni soj bakterije *C. perfringens* često je usko povezan s trovanjem hranom i pojavom sporadičnih proljeva u ljudi, a u pasa s akutnim i kroničnim proljevima te sindromom akutnog hemoragičnog proljeva (AHDS, eng. *acute haemorrhagic diarrhea syndrome*) (HALL, 2005.). Važno je napomenuti da povezanost CPE i pojave proljeva još uvijek nije u potpunosti razjašnjena budući da je CPE utvrđeni u 14% zdravih pasa odnosno pasa koji nisu imali proljev niti ikakve gastrointestinalne poremećaje. Neka istraživanja navode hipotezu u kojoj se proljev uzrokovan s CPE povezuje s infekcijom pasa psećim parvovirusom tip 2 (CPV-2, eng. *canine parvovirus-2*). U ovom trenutku taj sinergizam nije potvrđen jer se u navedenim istraživanjima nije uspjela potvrditi virulencija patogena odnosno da li je bakterija *C. perfringens* u tim slučajevima bila prisutan kao fiziološka mikroflora ili kao enteropatogen (SILVA i sur., 2017.).

2.2. Epizootiologija

Pojavnost bolesti izazvana s bakterijom *C. perfringens* ovisi o njezinom biotipu pa varira od izrazito rijetkih do vrlo čestih, no možemo reći da je proširena po cijelom svijetu. Fatalni slučajevi infekcije enterotoksina *C. perfringens* zabilježeni su kod neonatalne štenadi, budući da su oni najosjetljivija populacija što je povezano s aspektima bakterijske kolonizacije i probavnim funkcijama crijeva u prvim tjednima života. Smrtnost nastupa ne zbog velikih oštećenja na sluznici crijeva već kao posljedica toksemije. *C. perfringens* je ubikvitarna bakterija u prirodi te je dio fiziološke mikroflore crijeva životinja i ljudi pa je i rasprostranjenost njezinih biotipova raznolika. Tip A, iz kojeg je enterotoksin najčešće izoliran, nalazi se u zemlji i crijevu zdravih pasa. Pas u svoj organizam unese *C. perfringens* peroralno putem hrane kontaminirane fecesom, vode zagađene kanalizacijom ili inficiranim predmetima. CPE se tada oslobađa u lumenu crijeva nakon lize vegetativnih stanica bakterije i započinje svoje štetno djelovanje otpuštanjem fosfolipaze i lecitinaze C (NAGLIĆ i sur., 2005.).

2.3. Patogeneza

Do danas još uvijek ne postoji dovoljno veliki broj istraživanja čiji rezultati bi nam pomogli pri razumijevanju patogeneze *C. perfringens* enterotoksina kod proljeva pasa te se zasad većina njih temelji na istraživanjima u humanoj medicini (SONGER, 1996.). Smatra se da nakon ingestije hrane kontaminirane velikim brojem enterotoksogene bakterije *C. perfringens*, ona prolazi nepromijenjena kroz želudac. U tankom crijevu se CPE otpušta nakon lize vegetativnih stanica (GOLDSTEIN i sur., 2012.) i veže se za kladinske receptore stanične membrane epitelnih stanica crijeva. Nakon toga na staničnoj membrani kompleksi CPE i kladinskih receptora tvore pore koje uzrokuju promjene u njezinoj propusnosti pa dolazi do povećanog protoka kalcija u stanicu koji tada pokreće proces apoptoze ili nekroze ovisno o količini unesenog enterotoksina. Samom procesu apoptoze pridonosi i istovremeno otpuštanje enzima citokrom C reduktaze (Slika 2). Propadanje epitelnih stanica dovodi do oštećenja i deskvamacije stijenke crijeva, najčešće jejunuma i ileuma (SONGER, 1996.), uslijed čega dolazi do gubitka tekućine i elektrolita te posljedično do pojave kliničke slike bolesti, prvenstveno proljeva za otprilike 5 do 30 minuta (GREEN, 2012.).



Slika 2. Mehanizam djelovanja enterotoksina bakterije *Clostridium perfringens*. (FREEDMAN i sur., 2016.)

Kod zdravih pasa se pojava proljeva javlja kao posljedica disbioze u probavnom traktu, a uzrok takvom poremećaju mikroflore često je nagla promjena u prehrani pasa, administracija antimikrobnih pripravaka, te koinfekcija s drugim patogenim mikroorganizmima.

2.4. Klinička slika

Prilikom pojave proljeva uzrokovanih enterotoksinom bakterije *C. perfringens* nema patognomoničnih kliničkih simptoma, a njihova jačina i pojavnost variraju od blagog do potencijalno smrtonosnog akutnog hemoragičnog proljeva s jakim upalom sluznice crijeva (ALLENSPACH, 2015.). Takvi psi najčešće imaju epizode akutnog proljeva kao posljedicu njegova lučenja u lumen tankog i/ili debelog crijeva. Promjene karakteristične za poremećaje u tankom crijevu su blago povećana učestalost defekacije, letargija i anoreksija, a nerijetki su i ostali znakovi gastroenteritisa kao što su abdominalna bol, mučnina i povraćanje. Kod poremećaja u radu debelog crijeva javlja se povećana frekvencija rada crijeva s tenezmom, mnogo fekalne sluzi i neprobavljenom krvlju u proljevu. Povišena tjelesna temperatura i ostali znakovi općeg infektivnog sindroma su rijetki (KRUTH i sur., 1989.). Kronični slučajevi očituju se kaheksijom, anemijom i iscrpljenošću (TWEDT, 1992.). Općenito, djelovanje *C. perfringens* enterotoksina je kliničkom slikom ograničeno na probavni sustav, no nakon što toksin uđe u krv dolazi do pojave simptoma toksemije koji se razvijaju postupno, a počinju sa simptomima kao što su polidipsija, povraćanje, napet i bolan abdomen, gubitak apetita i depresija (NAGLIĆ, 2005.). Ukoliko dođe do prodiranja uzročnika u krvotok novorođenčadi, smrt može nastupiti vrlo brzo.

2.5. Dijagnostika

Do danas ne postoji zlatni standard za potvrđivanje prisutnosti bakterije *C. perfringens* u fecesu životinja s proljevom. Dijagnoza se postavlja na temelju kliničke slike, nalaza veće količine *C. perfringens* endospora u razmazu fecesa ili utvrđivanjem *cpe* gena u uzorku proljeva nekom od molekularnih (dokaz DNK uzročnika) odnosno CPE enterotoksina imunitetskim metodama (specifičnost odnosa antigen protutijelo) (GREEN, 2012.). Budući da je bakterija *C. perfringens* komenzal sluznice crijeva te da se nalazi i u crijevu zdravih životinja kao i u onih s proljevom, izdvajanje i uzgoj mikroorganizma u njemu optimalnim uvjetima, može poslužiti eventualno kada se koristi za dobivanje bakterijske kulture koja se koristi za primjenu molekularnih metoda kao što je lančana reakcija polimerazom (PCR, eng. *polymerase chain reaction*) (MARKS, 1999.). Zbog velike povezanosti između sporulacije i stvaranja enterotoksina, metoda bojanja po Gramu ili Wrightu i kasnije brojanje endospora u razmazu fecesa služi kao metoda otkrivanja enterotoksina kao uzroka proljeva (GREEN, 2012.). Važno je napomenuti da navedena metoda nije do kraja istražena te je njezina učinkovitost kod utvrđivanja prisutnosti enterotoksina upitna budući da endospore mogu biti proizvedene i od drugih klostridija (WESSE i sur., 2011.) kao i bezopasnih komenzalnih crijevnih bakterija poput *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Fusobacteria*, *Bacteroidetes*, *Salmonella* spp., *E.coli* (SCHMITZ i sur., 2016.). Trenutno su jedine komercijalno dostupne metode utvrđivanja enterotoksina bakterije *C. perfringens*, imunoenzimni test (ELISA, eng. *enzyme linked immunosorbent assay*) i reverzna pasivna lateks aglutinacija (RPLAA, eng. *reverse passive latex agglutination assay*). RPLAA se općenito smatra lošijom metodom jer ima visoku osjetljivost za CPE, ali nisku specifičnost pa nerijetko dolazi do lažno pozitivnih rezultata. Oba testa su limitirana u njihovoj osjetljivosti i specifičnosti (WESSE i sur., 2001.) te stoga često dolazi do pojave lažno pozitivnih ili lažno negativnih rezultata (CAVE i sur., 2002.). Danas se u većini istraživanja koristi komercijalno dostupan ELISA kit (Techlab Inc., Blacksburg, VA), no njegova učinkovitost još uvijek nije dovoljno istražena u pasa i mačaka. Bitno je napomenuti da se uspješnost utvrđivanja CPE u uzorcima fecesa smanjuje stajanjem uzoraka pa je uputno koristiti stabilizacijski pufer netom prije transporta uzoraka u laboratorij (GREEN, 2012.). Identifikacija enterotoksina korištenjem ELISA metode iz uzoraka fecesa zajedno s PCR molekularnom metodom smatra se optimalnom metodom za dijagnostiku proljeva koju uzrokuje bakterija *C. perfringens* (CAVE, 2002.). Osim PCR, u otkrivanju enterotoksina bakterije *C. perfringens* u suvremenoj dijagnostici koristi se i molekularna

metoda lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (qPCR, eng. *real-time polymerase chain reaction*) (ALBINIA i sur., 2018.).

2.6. Liječenje

C. perfringens dobro reagira na liječenje, te se psi s kratkotrajnim simptomima obično potpuno oporave uz liječenje. Kronični proljevi zahtijevaju dugotrajnije liječenje uz promjenu prehrane i česte posjete veterinaru (MARKS i sur., 1999.). Kod pojave akutnog hemoragičnog proljeva obavezna je primjena antimikrobne terapije, a ponekad se ona primjenjuje i u slučajevima blagog ili kroničnog oblika proljeva. Optimalna antimikrobna terapija uključuje upotrebu ampicilina, metronidazola i tilozina koji su se pokazali kao najučinkovitiji, iako je potrebno napomenuti da danas već postoje sojevi rezistentni na navedene antibiotike (SASAKI i sur., 1999.). Primjena tetraciklina nije indicirana zbog velike *in vitro* antimikrobne rezistencije. Mnoga istraživanja ukazuju na značajnost primjene dijetalne prehrane s puno vlakana zajedno s probioticima u liječenju proljeva. U težim slučajevima od simptomatske terapije koristi se tekućinska terapija, antiemetici (npr. maropitant) te antacidi (npr. ranitidin,esomeprazol) (UNTERER i sur., 2011.). Kod jake abdominalne boli indicirana je primjena analgetika. U slučajevima obilnih hemoragičnih proljeva i pojave anemije, ponekad su potrebne transfuzije pune krvi ili plazme (MARTEAU, 2001.).

2.7. Javno zdravlje

Iako mnoge klostridije uzrokuju proljeve u ljudi i domaćih životinja, smatra se da one nemaju zoonotski potencijal. Pojava proljeva kod ljudi uzrokovana bakterijom *C. perfringens* u većini slučajeva posljedica je konzumacije mesa koje nije dovoljno termički obrađeno ili je nedovoljno smrznuto, odnosno kada je meso pohranjeno na neadekvatnoj temperaturi i pri ponovnoj konzumaciji zagrijavano na preniskoj temperaturi (STRINGER i sur., 1982.). *C. perfringens* koji izlučuje enterotoksin najčešće se prenosi putem kontaminirane, higijenski neispravne hrane. Postoji mogućnost prijenosa bakterije *C. perfringens* iz fecesa pasa i mačaka u hranu ljudi no jedino u izrazito nehigijenskim uvjetima te su zbog navedenoga evidentirani izrazito rijetki slučajevi (MARKS i sur., 1999.).

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Sakupljanje uzoraka fecesa

U ovom istraživanju sakupljena su 82 uzorka fecesa pasa zaprimljenih na Kliniku za zarazne bolesti Zavoda za mikrobiologiju i zarazne bolesti s klinikom Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu u razdoblju od 1. srpnja 2018. do 1. siječnja 2019. godine. Od ukupnog broja, 40 uzoraka fecesa pripadalo je zdravim životinjama koje su predstavljale kontrolnu skupinu životinja i 42 uzoraka koji su pripadali životinjama s akutnim proljevom nepoznate etiologije (BUSCH i sur., 2015.). Kriteriji za uzimanje uzoraka kod životinja s proljevom bili su pojava proljeva koji je trajao dulje od tri dana. Prilikom organiziranja uzoraka obrađeni su anamnestički podaci koji su uključivali nacionalnost životinje (pasminu, spol i dob), podaci o općem kliničkom pregledu (stanje svijesti, apetit, prisutnost povraćanja, konzistencija fecesa, učestalost defekacije, stupanj dehidracije). Osim toga vodile su se zabilješke da li je proljev bio hemoragičan, je li bio prisutan tenezam i podaci o antimikrobnoj terapiji. Sama procjena kliničkih simptoma obrađena je prema jednostavnom načinu bodovanja (0=uredno, 1=blaga promjena, 2=umjerena promjena, 3=teška promjena određenog praćenog parametra) (UNTERER i sur., 2011; BUSCH i sur., 2014.). (Tablica 1).

Tablica 1. Vrednovanje jačine simptoma zabilježenih tijekom kliničkog pregleda. (UNTERER i sur., 2011., BUSCH i sur., 2014.)

Stanje svijesti:	0: normalno	1: blago depresivno	2: umjereno depresivno	3: jako depresivno
Apetit:	0: uredan	1: blago smanjen	2: umjereno smanjen	3: ne jede
Povraćanje:	0: nema	1: 1 ×/dan	2: 2-3×/dan	3: >3×/dan
Konzistencija fecesa:	0: formirana	1: mekana	2: pastozna	3: vodenasti proljev
Učestalost defekacije:	0: 1-2×/dan	1: 2-3×/dan	2: 4-5×/dan	3: >5×/dan
Stupanj dehidracije:	0: nema	1: manja od 5%	2: 5-10 %	3: veća od 10%

Zdravstveno stanje pasa odabranih za kontrolnu skupinu također se procjenjivalo na osnovu prethodno spomenutih kriterija te je bilo važno da imaju formiranu stolicu, da unazad šest mjeseci nisu imali proljev, te da su normalno jeli, pili i bili živahni (UNTERER i sur., 2014.). Osim toga, vodilo se računa da niti jedna životinja iz navedene skupine nije primala

antimikrobnu niti bilo kakvu drugu terapiju unutar 30 dana prije uzimanja uzoraka fecesa (GOLDSTEIN i sur., 2012.). Neposredno nakon uzimanja, uzorci fecesa bili su pohranjeni na -80°C u laboratoriju Zavoda za mikrobiologiju i zarazne bolesti s klinikom Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

3.2. *Određivanje prisutnosti enterotoksina (CPE) bakterije C. perfringens ELISA testom*

Prisutnost enterotoksina bakterije *C. perfringens* utvrđena je komercijalnim ELISA kitom, *C. perfringens* Enterotoxin Test (TECHLAB, Blacksburg, VA). Sam postupak imunoenzimnog testa proveden je prema uputama proizvođača. Uzorci formiranog fecesa veličine 3 mm odnosno $50\mu\text{L}$ tekućeg fecesa razmućeni su u $200\mu\text{L}$ diluenta u Eppendorf epruveti i promiješani 10 sekundi na vrtložnoj mješalici. U mikrotitracijsku pločicu u kojoj su se nalazila poliklonska protutijela za enterotoksin dodana je po jedna kap ($50\mu\text{l}$) konjugata u svaku jažicu. Nakon toga u jažice je dodano $100\mu\text{l}$ (dvije kapi) diluiranih uzoraka ispitivanih fecesa odnosno jedna kap ($50\mu\text{l}$) pozitivne i negativne kontrole prema unaprijed pripremljenoj shemi. Pločica je pokrivena folijom i inkubirana na 37°C u razdoblju od 2 sata. Nakon inkubacije sadržaj jažice istresen je van na za to predviđeno mjesto pritom koristeći nagle pokrete kako bi se osiguralo da je sav sadržaj ispražnjen. Svaka jažica isprana je otopinom za ispiranje te je naglim pokretom ponovno istresen sadržaj jažica van što se ponovilo prema uputama proizvođača četiri puta. Nakon ispiranja dodane su 2 kapi ($100\mu\text{l}$) substrata u svaku jažicu i je mikrotitracijska ploča inkubirana 15 minuta u mraku. Nakon završene inkubacije dodana je po 1 kap ($50\mu\text{l}$) stop otopine i promjena boje očitata se nakon 2 minute. Dodatkom stop otopine boja se mijenjala iz plave u žutu te se takva razlika u boji mogla kvantificirati mjerenjem optičke gustoće pri 450 nm na koristeći spektrofotometar (SunriseTM, Tecan Austria). Uzorci čije su vrijednosti apsorbancije bile < 0.120 smatrani su negativnim odnosno ≥ 0.120 smatrani su pozitivnim.

3.3. *Izolacija DNK*

Za izdvajanje ukupne DNK iz uzoraka fecesa korišten je komercijalni komplet Quick-DNA Fecal/Soil Microbe Miniprep (ZYMO Research, SAD). U prvom koraku je dodano 150 mg uzorka fecesa u ZR BashingBeadTM epruvete koje sadrže kuglice veličine 0.1 i 0.5 mm za mehaničku lizu bakterijskih stanica, uz dodatak $750\mu\text{l}$ pripadajućeg pufera. U svrhu homogenizacije ispitivanog uzorka, epruvete su pričvršćene na vrtložnu miješalicu i promiješane 30 minuta na 2400 rpm. Nadalje, centrifugirane su na $10\,000 \times g$ tijekom jedne minute te je $400\mu\text{l}$ supernatanta otpipetirano u epruvetu s Zymo-SpinTM III-F filterom sa

sabirnom epruветom i ponovno centrifugirano na 8,000 x g tijekom jedne minute. U slijedećem koraku dodano je 1200µl pufera za liziranje u sabirnu epruветu s filtratom iz prethodnog koraka. Iz sabirne epruветe otpipetirano je 800µl filtrata u Zymo-SpinTM IIC kolonicu sa čistom sabirnom epruветom koja je centrifugirana na 10,000 x g jednu minutu. Nakon centrifugiranja, sadržaj iz sabirne epruветe je odbačen i ponovljen je prethodni postupak. Nakon toga dodano je 200µl DNK pufera za primarno ispiranje u Zymo-SpinTM IIC kolonicu i centrifugirano na 10 000 x g tijekom jedne minute. U sljedećem koraku je dodano 500µl gDNK pufera za ispiranje u Zymo-SpinTM IIC kolonicu i centrifugirano jednu minutu na 10,000 x g. Zymo-SpinTM IIC kolonica prebačena je u Eppendorf epruветu, dodano je 100µl pufera za ispiranje DNK i centrifugirano na 10 000 x g tijekom 30 sekundi. Za vrijeme centrifugiranja Zymo-SpinTM IIC kolonice, pripremljena je epruвета s Zymo-SpinTM III-HRC filterom sa sabirnom epruветom u koju je dodano 600µl otopine za pripremu te je centrifugirana na 8,000 x g tri minute. Centrifugirana DNK iz sabirne epruветe Zymo-SpinTM IIC kolonice prebačena je u epruветu s Zymo-SpinTM III-HRC filterom koja je stavljena u Eppendorf epruветu i centrifugirana na 16,000 x g tijekom tri minute. Tako dobivena genomska DNK bila je pohranjena na -20 °C i spremna za daljnju obradu lančanom reakcijom polimerazom.

3.4. *Određivanje prisutnosti gena za enterotoksin (cpe) bakterije C. perfringens PCR metodom*

Lančanom reakcijom polimeraze umnažan je dio gena za enterotoksin bakterije *C. perfringens* (*cpe* gen) duljine 233 bp (MEER i SONGER, 1997.).

Za pripremu PCR smjese korišten je komercijalni kit Emerald Amp Max PCR Master Mix (2x) Takara, te su dodane početnice CPEF 5' GGAGATGGTTGGATATTAG CPER i 5' GGACCAGCAGTTGTAGATA 3' (Tablica 2) i voda bez nukleaza. Reakcija se odvijala u uređaju T100 Thermal Cycler (Bio Rad, Singapore).

Tablica 2. Nukleotidni sljedovi početnica za umnažanje odsječka *cpe* gena korištenih u izvođenju PCR metode

Oznaka početnice	Nukleotidni slijed	Pozicija početnice	Veličina produkta
CPE F	5' GGAGATGGTTGGATATTAGG 3'	439-458	233 bp
CPE R	5' GGACCAGCAGTTGTAGATA 3'	672-650	

Reakcijska smjesa za jedan uzorak sastojala se od 6 μ l Emerald Amp Max PCR Master Mix, po 0,25 μ l uzvodne CPE F i nizvodne CPE R početnice, radne koncentracije 10 μ M, te 4,75 μ l vode bez nukleaza. Tako pripremljena reakcijska smjesa podijeljena je u Eppendorf epruvetice u volumenu od 11,25 μ l, te je u svaku dodano 1,25 μ l prethodno izdvojenog DNK uzorka. U jedan od uzoraka obvezno je dodan DNK u kojem je prethodno potvrđena prisutnost DNK bakterije *Clostridium perfringens* i predstavljao je pozitivnu kontrolu PCR reakcije. Isto tako u jedan od uzoraka je umjesto DNK dodana voda bez nukleaza i taj je uzorak predstavljao negativnu kontrolu PCR reakcije. Ukupna količina reakcijske smjese za svaki uzorak iznosila je 12,5 μ l. Pripremljeni uzorci stavljeni su u PCR uređaj programiran za sljedeći optimizirani temperaturni program:

95 °C 3 min	} 35 x
94 °C 1 min	
57,8 °C 1 min	
72 °C 1 min	
72 °C 10 min	

Po završetku reakcije PCR proizvodi su pohranjeni na temperaturi + 4°C do elektroforeze.

3.5. Elektroforeza u gelu

Elektroforezom u gelu provjerava se prisutnost i duljina PCR proizvoda dobivenih PCR reakcijom. Gel za elektroforezu pripremljen je otapanjem 0,5 g agaroze u 50 ml 1x TAE pufera. Dobivena otopina agaroze zagrijana je do vrenja u mikrovalnoj pećnici. Nakon kratkotrajnog hlađenja u otopinu je dodano 3 μ l boje za DNK (DiamondTM Nucleic Acid Dye, Promega). Otopina agaroze je zatim stavljena u kalup za gel u koji je prethodno

postavljen češljic za jažice. Nakon hlađenja i polimerizacije, izvađen je češljic, a gel je postavljen u kadu za elektroforezu u kojoj se nalazio 1x TAE pufer. U jažice gela stavljeno je po 4 μ l PCR proizvoda. U prvu i posljednju jažicu dodan je biljeg veličine DNK odsječaka (DNA Ladder 100 pb, GeneRuler, Invitrogen, Waltham, Massachusetts, SAD). Elektroforeza je provedena u uređaju za elektroforezu pri naponu 120 V i jakosti struje 80 mA u trajanju od 60 minuta. Nakon završetka elektroforeze gel je stavljen pod UV svjetlo u komoru za snimanje gelova, te je fotografiran i arhiviran pomoću kamere s filtrima za UV svjetlo koja je povezana s kompjutorskim softverom za obradu slike gela (Gel Doc 200, BioRad, Richmond, SAD). Uspoređujući dobivene signale uzoraka s DNK biljegom utvrdili smo veličinu umnoženih PCR proizvoda.

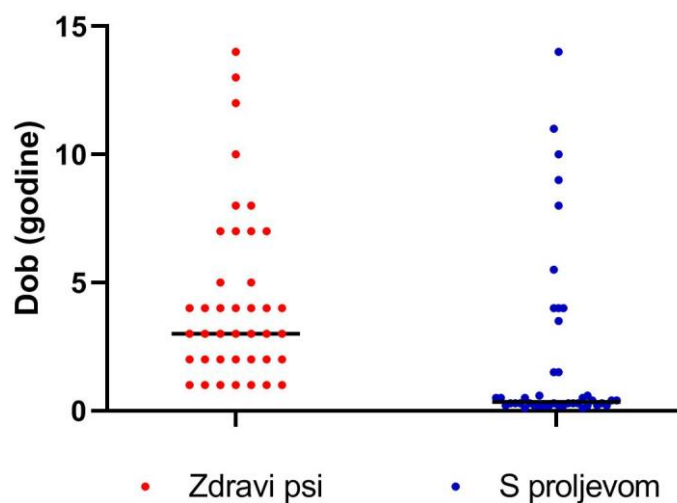
3.6. Statistička obrada podataka

U statističkoj obradi podataka korišteni su programi Microsoft Office Excel 2007, STATISTICA verzija 12.0 i Graph Pad Prism program (probna verzija 8.0.2 (263), 2019 GraphPad Software). Deskriptivna statistika raspodjele dobnih skupina zdravih pasa i pasa s proljevom obavljena je primjenom takozvanih pet točaka (minimum, prvi (donji) kvartil ili Q1, drugi kvartil ili medijan (Q2), treći (gornji) kvartil ili Q3, te maksimum) te je prikazana točkastim grafikonom (eng. *scatter plot*). Usporedba između zdravih pasa i pasa s proljevom prema spolu obavljena je hi-kvadrat testom. Normalnost raspodjele podataka dobivenih ELISA i PCR testovima potvrđena je grafičkom metodom, histogramima. Usporedba rezultata PCR metode između zdravih pasa i onih s proljevom obavljena je uporabom t-testa. Istim testom uspoređivani su ELISA pozitivni rezultati obje skupine, kao i testiranje PCR i ELISA pozitivnih uzoraka zdravih pasa ili PCR i ELISA pozitivnih pasa s proljevom. Povezanost između PCR pozitivnih, odnosno ELISA pozitivnih uzoraka iz skupine zdravih i skupine pasa s proljevom obavljena je upotrebom ANOVA testa za usporedbu rezultata tri ili više istraživanih skupina. Rezultati su smatrani statistički značajnim ukoliko je p vrijednost bila manja ili jednaka 0,05 ($p \leq 0,05$). Za grafički prikaz rezultata dobivenih ELISA i PCR testovima korišten je Excel 2017 program, a podaci su prikazani stupčanim grafikonima.

4. REZULTATI

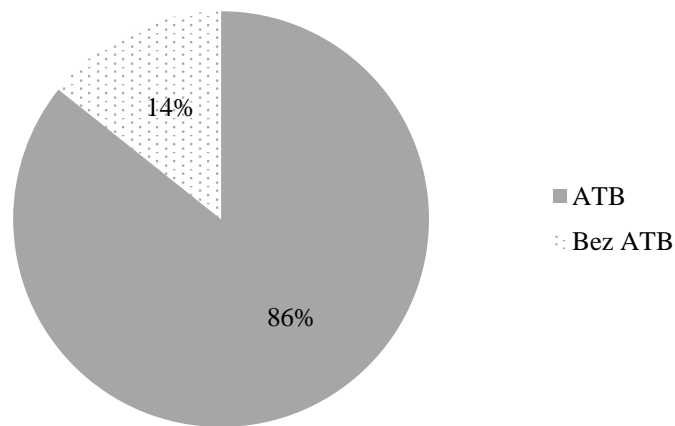
4.1. Podaci o životinjama

U ovom istraživanju obrađeno je sveukupno 82 uzoraka fecesa pasa različitih pasmina pasa. Medijan dobi kod pasa s proljevom bio je 4 mjeseca (raspon 1 mj. - 14 god.), a u skupini zdravih pasa 3 godine (raspon 1-14 god.) (Grafikon 1). U skupini pasa s proljevom bilo je zastupljeno 16 različitih pasmina pasa od kojih su tri najčešće bili mješanci u 57% (24/42) slučajeva, zatim njemački špic 4% (2/42) i njemački ovčar 4% (2/42). U skupini zdravih pasa bilo je 12 različitih pasmina, s najvećom zastupljenošću mješanaca od 65% (26/40), zatim francuskog buldoga, škotskog ovčara i havanskog bišona, svakog s 5% (2/40). U skupini pasa s proljevom od ukupno 42 životinje, njih 23 su bile ženke i 19 mužjaka, dok je kontrolna skupina zdravih pasa koja je obuhvaćala 40 životinja, uključivala 18 ženki i 22 mužjaka. Usporedbom spolova između ove dvije skupine nije ustanovljena statistički značajna razlika ($p=0,3769$).



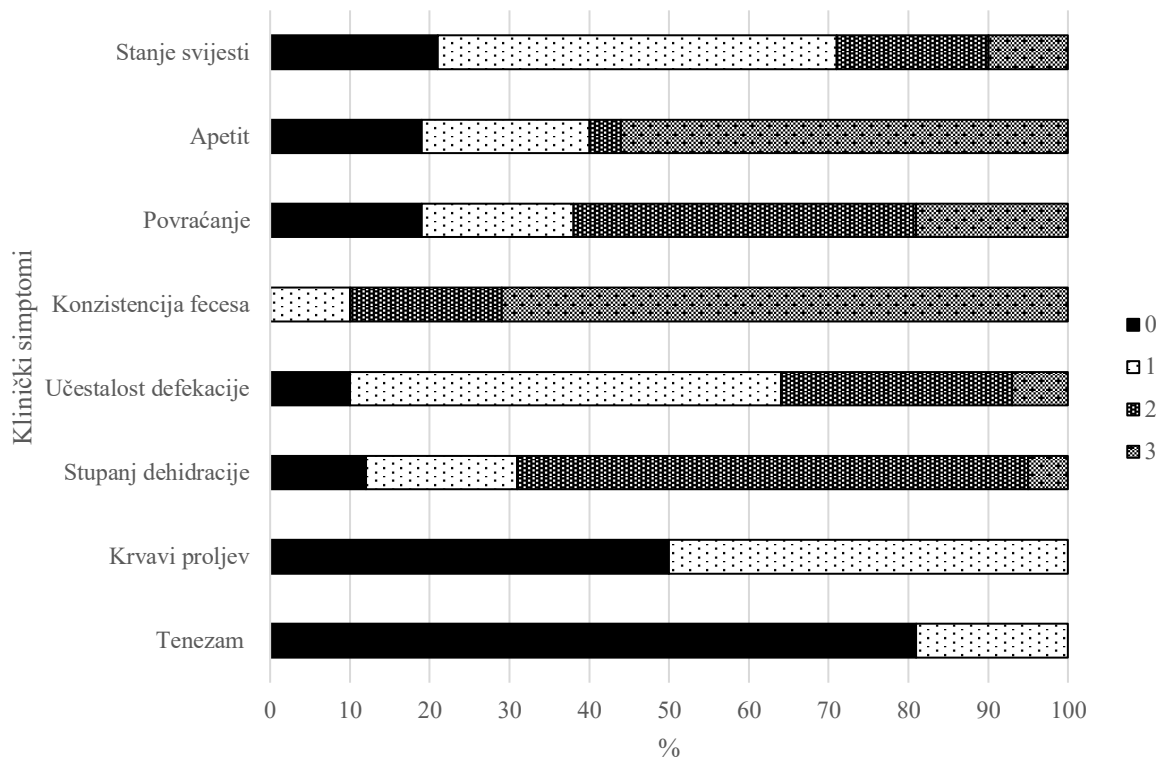
Grafikon 1. Raspodjela dobnih skupina u zdravih pasa i pasa s proljevom. Linije predstavljaju medijane u obje skupine.

Nijedna životinja u skupini zdravih pasa nije dobivala antibiotsku terapiju, dok je u skupini pasa s proljevom njih 86% (36/42) bilo terapiirano antibioticima (Grafikon 2).



Grafikon 2. Prikaz pasa s proljevom koji su u vrijeme kliničkog pregleda dobivali antimikrobnu terapiju. (n=42)

Kliničkim pregledom kod 50% (21/42) pasa s proljevom ustanovljeno je blago depresivno stanje svijesti, kod 19% (8/42) umjereno depresivno stanje svijesti, a kod 10% (4/42) jaka depresija. Svega 21% (9/42) pasa nije pokazivalo nikakve znakove promjene svijesti. Appetit je kod 19% (8/42) pasa bio uredan, kod 21% (9/42) blago smanjen, kod 4% (2/42) umjereno smanjen, dok 56% pasa (23/42) nije pokazivalo volju za jelom. Povraćanje je zabilježeno jedan puta dnevno u 19% (8/42) pasa, 43% (18/42) pasa povraćalo je dva puta dnevno i 19% (8/42) pasa tri puta dnevno. Povraćanje nije bilo prisutno kod 19% (8/42) pasa. U trenutku uzorkovanja fecesa on je bio mekane konzistencije u 10% (4/42) pasa, pastozan u 19% (8/42) i vodenast u 71% (30/40) pasa. Kod 10% (4/42) pasa s proljevom učestalost defekacije bila je jedan do dva puta dnevno, kod 54% (23/42) dva do tri puta dnevno, kod 29% (12/42) četiri do pet puta dnevno, a kod 7% (3/42) više od pet puta dnevno. U 12% (5/42) pasa nije utvrđena dehidracija, dok je kod 19% (8/42) stupanj dehidracije bio manji od 5 %. Nadalje, kod 64% (27/42) pasa stupanj dehidracije bio je između 5 i 10%, a kod 5% (2/42) pasa utvrđen je stupanj dehidracije veći od 10%. Tenezam je bio prisutan kod 19% (8/42), a krvavi proljev u 50% slučajeva (21/42) (Grafikon 3).

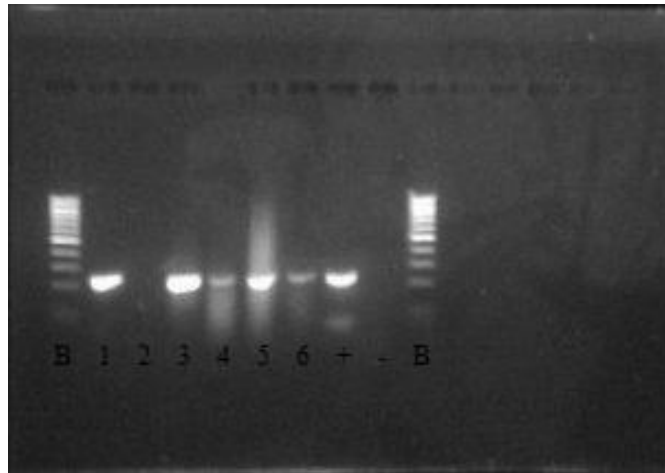


Grafikon 3. Prikaz kliničkih simptoma zabilježenih prilikom pregleda pasa s proljevom. (n=42)

4.2. Prisutnost enteroksina bakterije *C. perfringens* (CPE) utvrđene ELISA testom i gena za enterotoksin (*cpe*) utvrđenog PCR metodom

Pretraživanjem uzoraka fecesa ELISA testom utvrđena je prisutnost CPE u 40% (17/42) pasa s proljevom, dok je 60% (25/42) bilo negativno. Istom metodom ispitani su uzorci fecesa zdravih pasa gdje je ustanovljeno da je pozitivno na CPE bilo 12,5% uzoraka (5/40), dok je 87,5% (35/40) uzoraka bilo negativno (Grafikon 4). Prisutnost CPE nije bila statistički značajno veća kod pasa s proljevom ($p=0,3179$) u odnosu na zdrave pse.

Nakon ELISA testa uzorci su analizirani PCR metodom korištenjem početnica CPEF i CPER (MEER i SONGER, 1997.) (Slika 3).



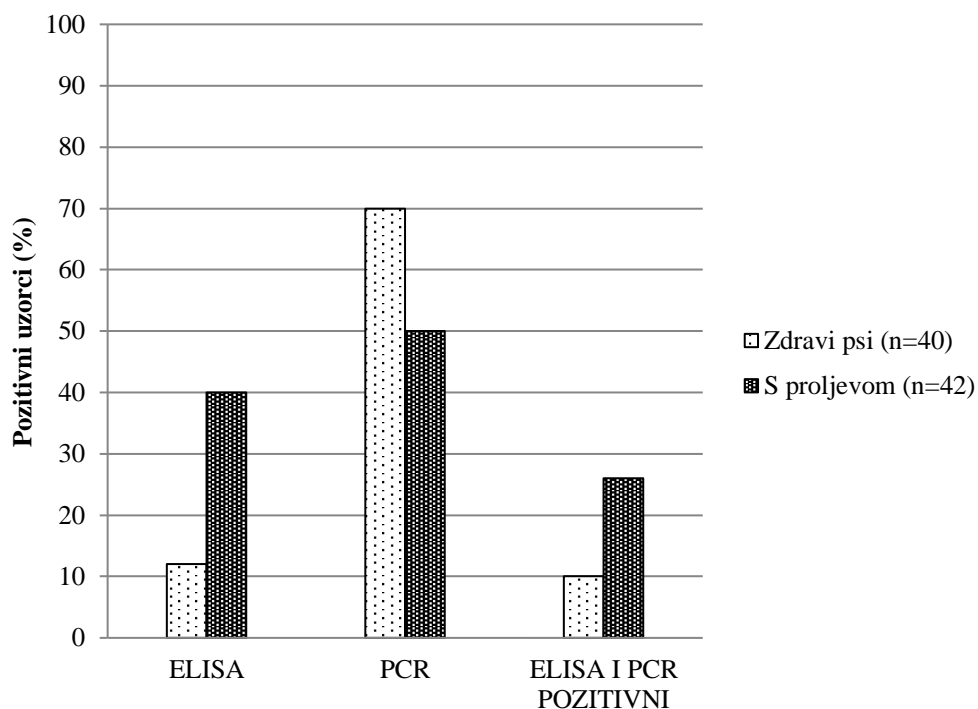
Slika 3. Prikaz rezultata dobivenih PCR metodom. Umnoženi odsječci svojim položajem odgovaraju segmentu DNK veličine 100 bp ("B"- biljeg, 1-6 - ispitivani uzorci, "+" - pozitivna kontrola, "-" - negativna kontrola)

PCR metodom ustanovljeno je da je 50% (21/42) uzoraka fecesa pasa s proljevom bilo pozitivno na *cpe*, dok je 50% uzoraka (21/42) bilo negativno. U skupini zdravih pasa od njih ukupno 40, 70 % (28/40) je bilo pozitivno dok je njih 30% (12/40) bilo negativno na *cpe* gen za enterotoksin bakterije *C. perfringens* (Grafikon 4). Prisutnost *cpe* gena nije bila statistički značajno viša kod pasa s proljevom u odnosu na zdrave pse ($p=0,0903$).

4.3. Usporedba rezultata dobivenih ELISA testom i PCR metodom

Prilikom usporedbe obje korištene metode dijagnostike dobiven je pozitivan rezultat na CPE i *cpe* gen u 26% (11/42) pasa s proljevom i u 10% (4/40) zdravih, te je statističkom obradom uočena značajna razlika između rezultata dobivenih PCR metodom naspram onih dobivenih ELISA testom ($p=0,0072$). (Grafikon 4).

Kod pasa s proljevom CPE pozitivnih, *cpe* negativnih uzoraka bilo je 29% (5/17), a *cpe* pozitivnih 71% (12/17). Nadalje, 48% (10/21) uzoraka pozitivnih na *cpe* gen bilo je negativno na CPE, a 52% (11/21) pozitivno na CPE. Odnosno, kod zdravih pasa CPE pozitivnih uzoraka negativnih na *cpe* gen bilo je 20% (1/5), a pozitivnih 80% (4/5). Uzorci zdravih pasa pozitivnih na *cpe* gen su u 86% (24/28) slučajeva bili negativni na CPE, a 14% (4/28) CPE pozitivni.



Grafikon 4. Postotak pasa pozitivnih na enterotoksin bakterije *C. perfringens* analiziranih ELISA testom i PCR metodom.

Kod uzoraka pasa s proljevom pozitivnih na obje metode bilo je više ženki (55%, 6/11) kao i kod zdravih pasa (75%, 3/4). Učestalost kliničkih simptoma uspoređivana je kod *cpe* PCR pozitivnih i CPE ELISA pozitivnih pasa kojih je bilo ukupno 11, te je utvrđeno da je kod njih stanje svijesti bilo u jednakoj mjeri (36%, 4/11) normalno i blago depresivno. Appetit je bio blago smanjen (45%, 5/11), a povraćali su dva do tri puta dnevno (45%, 5/11). Konzistencija fecesa je najčešće bio vodenast proljev (64%, 7/11), te je njih 45% (5/11) imalo učestalost defekacije četiri do pet puta dnevno. Stupanj dehidracije najčešće je bio između 5% i 10% i to kod 45% (5/11) pasa. Tenezam u većem postotku, 91% (10/11) nije bio prisutan, a krvavi proljev je bio prisutan u 64% pasa (7/11).

Tijekom obrade podataka pasa s proljevom pozitivnih na obje dijagnostičke metode uočeno je da 19% njih nije (2/11) podvrgnuto antimikrobnoj terapiji. Nadalje, ELISA pozitivnih uzoraka od pasa s proljevom bez antimikrobne terapije bilo je 6% (1/17), dok je ELISA negativnih uzoraka od pasa s proljevom koji su primili antibiotike bilo 80% (20/25). Također, PCR negativnih uzoraka pasa koji su primali antibiotike bilo je 81% (17/21), a PCR pozitivnih uzoraka pasa bez antimikrobne terapije 19% (4/21).

5. RASPRAVA

C. perfringens pripada mikrobiološkoj flori crijeva probavnog trakta te potvrda navedene bakterije u fecesu pasa s proljevom ne predstavlja potvrdu dijagnoze samog uzročnika proljeva (SILVA i sur., 2017.). Poznato je da bakterija *C. perfringens* može osim proljeva uzrokovati i smrtonosnu enterotoksemiju (MEER i sur., 1997.), tako da je pravovremeno postavljena dijagnoza katkad presudna. Glavni čimbenik virulencije bakterije *C. perfringens* je njegov enterotoksin, koji se izlučuje nakon sporulacije ove bakterije u crijevu domaćina, a njegovoj proizvodnji doprinosi trovanje hranom i različite bolesti gastrointestinalnog trakta. Njegovo pojačano izlučivanje uzrokuje propadanje i povećanu propusnost endotelih stanica crijeva dovodeći do poremećaja transporta elektrolita i transmembranske difuzije tekućina u crijevu (KATAHIRA i sur., 1997.). MIMS i sur. (2011.) spominju kako je bakterija *C. perfringens* izdvojena u 67% pasa s akutnim hemoragičnim proljevom što ukazuje na visoku učestalost ove bakterije kao uzročnika proljeva.

Mnogobrojni su razlozi zbog kojih veterinari imaju raznih poteškoća prilikom postavljanja dijagnoze proljeva uzrokovanog ovom bakterijom i njenim enterotoksinom. Različite metode poput imunoenzimnog testa i lančana reakcija polimerazom često su u praksi nedostupni veterinarima u ambulanta. Također, mnoge ustanove nisu opremljene laboratorijima i nemaju uhodanu dijagnostiku, a svako prolongiranje vremenskog perioda od uzimanja uzoraka do provođenja dijagnostičkih postupaka može uvelike utjecati na rezultate testova te rezultirati lažno negativnim rezultatima (GREEN, 2012.). U različitim istraživanjima, uzgoj bakterije *C. perfringens* na hranjivim podlogama koristio se kao brza, pristupačna i jeftina metoda za njeno dokazivanje u fecesu. Gusti porast sivih, okruglih, sjajnih i srednje velikih kolonija bakterije *C. perfringens* na krvnom agaru uz prisutnost zone dvostruke hemolize, te identifikacija gram pozitivnih štapića u mikroskopskom vidnom polju bio je potvrda uzročnika. Budući da za genotipsku identifikaciju i utvrđivanje CPE samo mikrobiološka dijagnostika nije dovoljna svakako se preporuča korištenje ELISA i PCR metode (GOLDSTEIN i sur., 2012.).

U ovom istraživanju enterotoksin bakterije *C. perfringens* utvrđen je u 12,5% zdravih pasa i 40% pasa s proljevom uporabom ELISA testa. Rezultati dobiveni ovim istraživanjem slični su rezultatima istraživanja od SILVA i sur. (2015.) koji su utvrdili prisutnost enterotoksina u 17,1% klinički zdravih pasa i 40,9% pasa s proljevom. Nadalje, KRUTH i sur. (1989.) i

WESSE i sur. (2001.) također su ustanovili značajno niži postotak enterotoksina u fecesu zdravih pasa i to u svega 5% slučajeva.

U prethodnim istraživanjima, prevalencija *cpe* gena utvrđenog PCR metodom iznosila je između 5% (WEESE i sur., 2001.) i 16% (CAVE i sur., 2002.) u zdravih pasa i u rasponu od 14,4% do 48% kod pasa s proljevom (GOLDSTEIN i sur. 2012., SILVA i sur. 2015.). Za razliku od njih u našem istraživanju *cpe* gen utvrđen je u 50% pasa s proljevom. Kod zdravih pasa je njegova prevalencija iznosila visokih 70% što je značajno više u odnosu na rezultate istraživanja od MARKS i sur. (2002.) koji su utvrdili prisutnost *cpe* gena u fecesu 10% zdravih pasa i MINAMOTO i sur. (2014.) kod kojih je ona iznosila 1%.

Sumirano, CPE pozitivnih uzoraka zdravih pasa negativnih na *cpe* gen bilo je 20%, a pozitivnih na *cpe* gen negativnih na CPE 86%. Kod iste takve usporedbe u radu MARKS i sur. (2002.) rezultati su bili 71,4% i 66,7%. Zatim, kod pasa s proljevom CPE pozitivnih *cpe* negativnih uzoraka bilo je 29%, dok je 48% uzoraka pozitivnih na *cpe* gen bilo negativno na CPE dok su te vrijednosti u prethodno spomenutom istraživanju iznosile 18,2% odnosno 30,8% (MARKS i sur., 2002.).

Osim toga, ista skupina istraživača (MARKS i sur., 2002.) navodi statistički značajnu razliku koju su utvrdili prilikom usporedbe rezultate dobivenih analizom uzoraka fecesa koji su potjecali od pasa s proljevom koristeći ELISA test i PCR metodu. Za razliku od njih, u ovom istraživanju nije utvrđena statistički značajna razlika. ASHA i sur. (2002.) navode kako je u 200 istraživanih uzoraka fecesa koji su potjecali od pasa s proljevom u svega 8% utvrđen enterotoksin korištenjem ELISA metode. Daljnjom analizom uzoraka pozitivnih na CPE korištenjem PCR metode *cpe* gen utvrđen je u 88% uzoraka. Za razliku od navedenog istraživanja u našem istraživanju analizom fecesa pasa s proljevom pozitivnih na CPE njih 71% bilo je pozitivno na *cpe* gen. Nadalje, u istraživanju od ASHA i sur. (2002.) od 92% negativnih uzoraka na CPE daljnjom analizom PCR metodom njih 4% bilo je pozitivno, što je znatno manje nego u našem istraživanju u kojem je broj ELISA negativnih uzoraka pozitivnih na PCR bio 48%.

Prilikom usporedbe rezultata nekoliko istraživanja vrlo je važno obratiti pažnju na ispitivane uzorke odnosno potječu li oni od životinja istog spola i dobi. U ovom istraživanju nisu dokazane statistički značajne razlike između pozitivnih uzoraka pasa s proljevom i zdravih pasa dobivenih ELISA i PCR metodom vezano za spol ($p=0,9234$) što je u skladu s rezultatima nedavnih istraživanja (BUSCH i sur., 2014.; SEDIGH i sur., 2017.).

S obzirom na različitu zastupljenost pasmina u ovom istraživanju nije bilo moguće utvrditi eventualnu pasminsku predispoziciju u životinja koje su bile pozitivne bilo na prisutnost CPE enterotoksina odnosno gena *cpe* za enterotoksin.

Budući da je za optimalnu dijagnostiku preporučena kombinacija ELISA testa sa PCR metodom (SILVA i sur., 2017.), prikazivani su rezultati ustanovljeni kliničkim pregledom kod pasa s proljevom čiji su se uzorci fecesa pokazali pozitivnima na obje korištene metode. Psi iz te skupine su prilikom kliničkog pregleda imali slične kliničke simptome koji su uključivali blagu depresiju popraćenu blago smanjenim apetitom, povraćanjem u prosjeku dva do tri puta dnevno te vodenast i krvavi proljev što ide u prilog kliničkoj slici enteritisa uzrokovanog enterotoksinom bakterije *C. perfringens*.

Prilikom tumačenja rezultata potrebno je uzeti u obzir mogućnost pojave lažno pozitivnih i lažno negativnih rezultata. Poznato je da se lažno pozitivni rezultati mogu dobiti ELISA testom ukoliko dođe do nespecifičnog vezanja proteina iz fecesa na poliklonska protutijela koja se koriste u ELISA kitu. Budući da se osjetljivost ovog testa tek treba utvrditi kod pasa, moguće je da je enterotoksin prisutan u pre niskim koncentracijama koje se ne mogu utvrditi ELISA komercijalnim kitovima koji trenutno postoje na tržištu (MARKS i sur., 2002.).

Moguće objašnjenje za pse s proljevom kod kojih nije utvrđen enterotoksin ELISA testom je njegova neutralizacija proteazama iz crijeva ili fecesa te se zbog toga nije mogao vezati za poliklonska tijela u imunoenzimnom testu (MARKS i sur., 2002.). Iako je manje vjerojatno, drugi čimbenik koji je mogao pridonijeti relativno velikom broju pasa s proljevom koji su bili CPE negativni je takozvana tiha mutacija gena koji kodira enterotoksin bakterije *C. perfringens*, kod određenih sojeva ove bakterije ne dolazi do ekspresije i proizvodnje CPE, kao što je opisao BILLINGTON i sur. (1998.). Zbog toga što je proizvodnja CPE povezana sa sporulacijom, malo je vjerojatno da su psi s proljevom, kod kojih su dobiveni CPE negativni rezultati, uzrokovani nedostatkom ekspresije gena (MARKS i sur., 2002.). Nadalje, iako je enterotoksin relativno termolabilan, ovu mogućnost smo odmah isključili na početku istraživanja pohranjivanjem uzoraka fecesa neposredno nakon uzimanja - 20°C.

Unatoč brojnim istraživanjima još uvijek ostaje otvoreno pitanje o ulozi enterotoksina bakterije *C. perfringens* u etiologiji i pojavnosti proljeva u pasa (BARTLETT i sur., 1972.; SASAKI i sur., 1999.; WEESE i sur., 2001; MARKS i sur., 2002.). Ukoliko je CPE stvarno uzročnik proljeva u pasa, visoka učestalost pozitivnih uzoraka u zdravih pasa utvrđenih u ovom istraživanju potrebno je dodatno istražiti budući da je malo vjerojatno da su svi uzorci

zdravih pasa i pasa s proljevom dali lažno pozitivne rezultate. Imajući u vidu da obje korištene metode, ELISA i PCR, ne kvantificiraju količinu CPE odnosno *cpe* gen u svakom pojedinom uzorku, moguće je da su CPE pozitivni uzorci u skupinama pasa bez proljeva imali enterotoksin prisutan u znatno nižoj koncentraciji od one potrebne za kliničku manifestaciju bolesti odnosno proljeva (MARKS i sur., 2002.).

Veliki broj pozitivnih uzoraka na CPE u obje skupine ukazuje da CPE može imati glavnu ulogu u pojavnosti proljeva ili da je posljedica promjena u sastavu crijevne mikroflore koja tada omogućuje proliferaciju enterotoksogenog soja bakterije *C. perfringens*. Dosadašnji rezultati istraživanja (STRONG i sur., 1971.; BIRKHEAD i sur., 1988.; ESTRADA i sur., 1989.; BRETT i sur., 1992.) pokazali su da se kod ljudi i životinja konstantno javlja određeni stupanj sporulacije te bakterije. Nadalje, poznato je da kod nekih pasa enterotoksin bakterije *C. perfringens* može biti dio fiziološke mikroflore crijeva (WEESE i sur., 2001.). Naime, kod njih sporulacija se može pojaviti kod manjeg broja bakterija, tako da količina enterotoksina koju proizvode komenzalni enterotoksogeni sojevi može biti preniska da potakne razvoj kliničke slike bolesti, ili enterotoksin može biti uništen proteazama koje proizvodi fiziološka bakterijska flora crijeva. Proljev tada može biti posljedica drugih uzroka poput terapije antibioticima, naglih promjena hrane ili promjena pH vrijednosti crijeva koje mogu dovesti do povećane sporulacije bakterije *C. perfringens* i posljedičnog oslobađanja velikih količina enterotoksina. Dosadašnje spoznaje utjecaja antimikrobne terapije na pojavnost CPE zasnivane su na istraživanjima provedenim na ljudima (BORRIELLO i sur., 1985.). U ovom istraživanju nije utvrđen utjecaj antimikrobne terapije na prisutnost enterotoksina u fecesu pasa s proljevom budući da je samo 19% životinja koje nisu bile podvrgnute antimikrobnoj terapiji u vrijeme uzimanja uzoraka bilo pozitivno prilikom korištenja obje dijagnostičke metode. U prilog navedenom obrazloženju ide i dobiveni rezultat ovog istraživanja gdje je 81% životinja bilo negativno na PCR i 80% na ELISA testu, a primale su antimikrobnu terapiju.

SILVA i sur. (2017.) navode da bi optimalan dijagnostički pristup enteritisima uzrokovanih enterotoksinom bakterije *C. perfringens* trebao uključiti uporabu ELISA metode za utvrđivanje prisutnosti CPE enterotoksina bakterije *C. perfringens* zajedno s rezultatima PCR molekularne metode koja uključuje utvrđivanje prisutnosti *cpe* gena. Ova se preporuka temelji na niskoj osjetljivosti i specifičnosti ELISA testa (MARKS i sur., 2002). U prilog prethodno navedenom idu i rezultati ovog istraživanja u kojem je uočeno statistički značajno više pozitivnih uzoraka dobivenih PCR metodom naspram onih dobivenih ELISA testom.

Navedeni rezultat ukazuje na neophodno korištenje PCR ili qPCR metode u potvrđivanju *cpe* gena kao uzročnika proljeva jer sama ELISA neće uspjeti identificirati većinu CPE pozitivnih uzoraka (SILVA i sur., 2017.).

Iako rezultati našeg istraživanja ukazuju na određeni stupanj povezanosti akutnog proljeva i CPE pozitivnih uzoraka tih pasa, potrebna su daljnja istraživanja čiji rezultati bi pomogli u rasvjetljavanju uloge enterotoksina bakterije *C. perfringens* u etiologiji nastanka proljeva u pasa. Osim toga potrebno je utvrditi prisutnost i drugih mogućih uzroka proljeva bilo zarazne (*Clostridium difficile*, *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., CPV-2) ili nezarazne etiologije.

6. ZAKLJUČCI

U ovom istraživanju enterotoksin bakterije *C. perfringens* utvrđen je u 12,5% zdravih pasa i 40% pasa s proljevom uporabom ELISA testa, dok je PCR metodom utvrđena prisutnost *cpe* gena u 70% zdravih pasa i 50% pasa s proljevom. U obje metode nisu utvrđene statistički značajne razlike u prisutnosti enterotoksina odnosno *cpe* gena u pasa s proljevom u odnosu na zdrave pse.

Uporabom ELISA testa i PCR metode enterotoksin bakterije *C. perfringens* utvrđen je u 10% zdravih pasa i 26% pasa s proljevom. Statističkom obradom uočena je značajna razlika između rezultata dobivenih PCR metodom naspram onih dobivenih ELISA testom ($p=0,0072$).

Psi s proljevom kod koji je utvrđen CPE ELISA testom i *cpe* gen PCR metodom imali su slične kliničke simptome koji su uključivali blagu depresiju popraćenu s blago smanjenim apetitom. Osim toga prosječno su povraćali dva do tri puta dnevno, a proljev je bio ili vodenast ili krvav što ide u prilog kliničkoj slici enteritisa uzrokovanog enterotoksinom bakterije *C. perfringens*.

Optimalan dijagnostički pristup enteritisima uzrokovanih enterotoksinom bakterije *C. perfringens* trebao bi uključiti uporabu ELISA metode za utvrđivanje prisutnost CPE enterotoksina bakterije *C. perfringens* zajedno s rezultatima PCR molekularne metode koja uključuje utvrđivanje prisutnosti *cpe* gena.

7. LITERATURA

ALBINIA, S., I. BRODARDA, A. JAUSSIA, N. WOLLSCHLAEGERB, J. FREYA, R. MISEREZA, C. ABRILA (2008): Real-time multiplex PCR assays for reliable detection of *Clostridium perfringens* toxin genes in animal isolates. *Vet. Microbiol.* 127, 179-185.

ALLENSPACH, K. (2015): Bacteria involved in acute haemorrhagic diarrhoea syndrome in dogs, *Vet. Rec.* doi: 10.1136/vr.h986., 176-251.

ASHA, N. J., M. H. WILCOX (2002): Laboratory diagnosis of *Clostridium perfringens* antibiotic-associated diarrhoea. *J. Med. Microbiol.* 51, 891-894.

BARTLETT, M. L., H. W. WALKER, R. ZIPRIN (1972): Use of dogs as an assay for *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Appl. Microbiol.* 23, 193–197.

BILLINGTON, S. J., E. U. WIECKOWSKI, M. R. SARKER, D. BUESCHEL, J. G. SONGER, B. A. MCCLANE (1998): *Clostridium perfringens* type E animal enteritis isolates with highly conserved, silent enterotoxin gene sequences. *Infect. Immun.* 66, 4531–4536.

BIRKHEAD, G., R. L. VOGT, E. M. HEUN, J. T. SNYDER, B. A. MCCLANE (1988): Characterization of an outbreak of *Clostridium perfringens* food poisoning by quantitative fecal culture and fecal enterotoxin measurement. *J. Clin. Microbiol.* 26, 471–474.

BORRIELLO, S. P., F. E. BARCLAY, A. R. WELCH, M. F. STRINGER, H. E. LARSON, B. A. BARTHOLOMEW (1985): Epidemiology of diarrhea caused by enterotoxigenic *Clostridium perfringens*. *J. Med. Microbiol.* 20, 363–372.

BRETT, M. M., J. C. RODHOUSE, T. J. DONOVAN, G. M. TEBBUTT, D. N. HUTCHINSON (1992): Detection of *Clostridium perfringens* and its enterotoxin in cases of sporadic diarrhoea. *J. Clin. Pathol.* 45, 609–611.

BUSCH, K., J. S. SUCHODOLSKI, K. A. KÜHNER, Y. MINAMOTO, J. M. STEINER, R. S. MUELLER, K. HARTMANN, S. UNTERER (2015): *Clostridium perfringens* enterotoxin and *Clostridium difficile* toxin A/B do not play a role in acute haemorrhagic diarrhoea syndrome in dogs. *Vet. Rec.* 10,doi: 10.1136/vr.102738.

CAVE, N. J., S. L. MARKS, P. H. KASS, A. C. MELLI, M. A. BROPHY (2002): Evaluation of routine diagnostic fecal panel for dogs with diarrhea. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 221, 52-59.

CVETNIĆ, S. (2008): Enterotoksemije. U: Bakterijske i gljivične bolesti životinja (S. Cvetnić, ur.), Medicinska naklada, Zagreb, str. 95-96.

DOSSIN, O. (2011): Laboratory Tests for Diagnosis of Gastrointestinal and Pancreatic Diseases. Top. Companion Anim. Med. 2, 86-97.

ESTRADA, C. A. E., D. J. TAYLOR (1989): Porcine *Clostridium perfringens* type A spores, enterotoxin and antibody to enterotoxin. Vet. Rec. 124, 606–610.

FREEDMAN, J. C., A. SHRESTHAAND, B. A. MCCLANE (2016): *Clostridium perfringens* Enterotoxin: Action, Genetics, and Translational Applications, Toxins. 8, doi: 10.3390/toxins8030073

GOLDSTEIN, M. R., S. A. KRUTH, A. M. E. BERSENAS, M. K. HOLOWAYCHUK, J. S. WEESE (2012): Detection and characterization of *Clostridium perfringens* in the feces of healthy and diarrheic dog. Can. J. Vet. Res. 76, 161-165

KATAHIRA, J., N. INOUE, Y. HORIGUCHI, M. MATSUDA, N. SUGIMOTO (1997): Molecular cloning and functional characterization of the receptor for *Clostridium perfringens* enterotoxin. J. Cell. Biol. 136, 1239-1247.

KRUTH, S. A., J. F. PRESCOTT, K. WELCH, M. H. BRODSKY (1989): Nosocomial diarrhea associated with enterotoxigenic *Clostridium perfringens* infection in dogs. J. Am. Vet. Med. Assoc. 195, 331-334.

LI, J., D. PAREDES-SABJA, M. R. SARKER, B. A. MCCLANE (2016): *Clostridium perfringens* Sporulation and Sporulation-Associated Toxin Production. Microbiol. Spectr. 4, doi: 10.1128/microbiolspec.TBS-0022-2015

MARKS, L. S. (2012): Enteric Bacterial Infections, *Clostridium perfringens* and *Clostridium difficile* – associated diarrhea. U: Infectious diseases of the dog and cat (Ur: Craig E. Greene), 4th Ed., Saunders Elsevier., str. 393-395.

MARKS, L. S. (2005): Infectious and parasitic diseases. U: BSAVA Manual of Canine and Feline Gastroenterology (Ur: Hall E. J., J. W. Simpson, D. A. Williams), 2nd Ed., BSAVA, str. 115-116.

- MARKS, S. L., A. MELLI, P. H. KASS, S. S. JANG, A. BARKHOODARIAN, D. C. HIRSH (1999): Evaluation of methods to diagnose *Clostridium perfringens* - associated diarrhea in dogs. J. Am. Vet. Med. Assoc. 214, 357-360.
- MARKS, S. L., E. J. KATHER, P. H. KASS, A. C. MELLI (2002): Genotypic and phenotypic characterization of *Clostridium perfringens* and *Clostridium difficile* in diarrheic and healthy dog. J. Vet. Intern. Med. 16, 533-540.
- MARKS, S. L., E. J. KATHER (2003): Antimicrobial susceptibilities of canine *Clostridium difficile* and *Clostridium perfringens* isolates to commonly utilized antimicrobial drugs. Vet. Microbiol. 94, 39-45.
- MARKS, S. L., S. C. RANKIN, B. A. BYRNE, J. S. WEESE (2011): Enteropathogenic Bacteria in Dogs and Cats: Diagnosis, Epidemiology, Treatment, and Control, ACVIM Consensus Statement. J. Vet. Intern. Med. 25, 1195-1208.
- MARTEAU, P. R., M. DE VRESE, C. J. CELLIER, J. SCHREZENMEIR (2001): Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics. Am. J. C. Nutr. 73, 430-436.
- MEER, R. R., J. G. SONGER (1997): Multiplex polymerase chain reaction assay for genotyping *Clostridium perfringens*. Am. J. Vet. Res. 58, 702-705.
- MIMS, C., A. NASH, J. STEPHEN (2001): Mims' Pathogenesis of Infectious Diseases, 5th Ed., Academic Press, London.
- MINAMOTO, Y., N. DHANANI, M. E. MARKEL, J. M. STEINER, J. SUCHODOLSKI (2014): Prevalence of *Clostridium perfringens*, *Clostridium perfringens* enterotoxin and dysbiosis in fecal samples of dogs with diarrhea. Vet. Microbiol. 174, 463-473.
- NAGLIĆ, T., D. HAJSIG, J. MADIĆ, LJ. PINTER (2005.): *Clostridium perfringens* U: Veterinarska mikrobiologija – specijalna bakteriologija i mikologija (Ur: Naglić, T., D. Hajsig, J. Madić, LJ. Pinter), Veterinarski fakultet sveučilišta u Zagrebu, str. 130-134.
- SASAKI, J., M. GORYO, A. MASATOSHI (1999): Hemorrhagic enteritis associated with *Clostridium perfringens* type A in a dog. J. Vet. Med. Sci. 61, 175-177.
- SCHMITZ, S., J. SUCHODOLSKI (2016): Understanding the canine intestinal microbiota and its modification by pro-, pre- and synbiotics – what is the evidence?. Vet. Med. Sci. 2, 71-94.

- SEDIGH, H. S., J. RAZMYAR, M. GHAVIDEL (2017): Isolation and genotyping of *Clostridium perfringens* from healthy and diarrheic dogs. IJVST. 8, 48-54.
- SILVA, R., F. LOBATO (2015) : *Clostridium perfringens*: A review of enteric diseases in dogs, cats and wild animals. Anaerobe 33, 14-17.
- SILVA, R. O. S., F. A. DORELLA, H. C. P. FIGUEIREDO, É. A. COSTA, V. PELICIA, B. L. D. RIBEIRO, M. G. RIBEIRO, A. C. PAES, J. MEGID, F. C. F. LOBATO (2017): *Clostridium perfringens* and *C. difficile* in parvovirus positive dogs. Anaerobe 48, 66-69.
- SONGER, J. G. (1996): Clostridial enteric diseases of domestic animals. Clin. Microbiol. Rev. 9, 216-234.
- STRINGER, M. F., G. N. WATSON, R. J. GILBERT (1982): *Clostridium perfringens* Type A: Serological typing and methods for the detection of enterotoxin. U: Isolation and identification methods for food poisoning organisms (Ur: Corry J. E. L., Roberts D., Skinner F.A.), Society for Applied Bacteriology, Academic Press, 17, str. 111-135.
- STRONG, D. H., C. L. DUNCAN, G. PERNA (1971): *Clostridium perfringens* type A food poisoning. Infect. Immun. 3, 171–178.
- TWEDT, D. C. (1992): *Clostridium perfringens* associated enterotoxigenesis in dogs. Cur. Vet. Ther., Small Anim. Pract., W.B. Saunders, 11, 602-604.
- UNTERER, S., K. BUSCH, M. LEIPIG, W. HERMANN, G. WOLF, R. K. STRAUBINGER, R. S. MUELLER, K. HARTMANN (2014): Endoscopically visualized lesions, histologic findings, and bacterial invasion in the gastrointestinal mucosa of dogs with acute hemorrhagic diarrhea syndrome. J. Vet. Intern. Med. 28, 52–58.
- UNTERER, S., K. STROHMEYER, B. D. KRUSE, C. SAUTER-LOUIS, K. HARTMANN (2011): Treatment of aseptic dogs with hemorrhagic gastroenteritis with amoxicillin/clavulanic acid: a prospective blinded study. J. Vet. Intern. Med. 25, 973–979. doi: 10.1111/j.1939-1676.2011.00765.x
- WESSE, J. S. (2011): Bacterial enteritis in dogs and cats: Diagnosis, Therapy and Zoonotic potential. Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract. 41, 287-309.
- WESSE, J., S. GREENWOOD, H. STAEMPFLI (2001): Recurrent diarrhea associated with enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in 2 dogs. Can. Vet J. 42, 292-294.

WESSE, J. S., H. STAEMPFLI, J.F.PRESCOTT, S. A. KRUTH, S. J. GREENWOOD, H. E. WESSE (2001): The roles of *Clostridium difficile* and enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in diarrhea in dogs. J. Vet. Intern. Med. 15, 374-378.

8. SAŽETAK

Utvrđivanje prisutnosti enterotoksina bakterije *Clostridium perfringens* u fecesu zdravih pasa i pasa s proljevom

Enterotoksin bakterije *Clostridium perfringens* često je povezan s akutnim i kroničnim proljevima te sindromom akutnog hemoragičnog proljeva u pasa, no nastanak proljeva uzrokovanog njegovim enterotoksinom do danas nije razjašnjen. Ne postoji zlatni standard za potvrđivanje prisutnosti bakterije *C. perfringens* u fecesu životinja s proljevom, a dijagnoza se postavlja na temelju kliničke slike, nalaza veće količine *C. perfringens* endospora u razmazu fecesa ili utvrđivanjem enterotoksina korištenjem imunoenzimnog testa (ELISA, eng. *enzyme linked immunosorbent assay*) zajedno s molekularnom metodom lančane reakcije polimerazom (PCR, eng. *polymerase chain reaction*) iz uzoraka fecesa. Cilj ovog istraživanja bio je ustanoviti prisutnost enterotoksina bakterije *C. perfringens* u fecesu zdravih pasa i pasa s proljevom korištenjem ELISA testa i PCR metodom. Uzorci fecesa sakupljeni su od sveukupno 82 pasa, 40 zdravih i 42 s proljevom nepoznate etiologije. ELISA testom utvrđena je prisutnost *C. perfringens* enterotoksina (CPE, eng. *Clostridium perfringens enterotoxin*) u 40% (17/42) pasa s proljevom i 12,5% (5/40), zdravih pasa. Prisutnost CPE nije bila statistički značajno veća kod pasa s proljevom ($p=0,3179$) u odnosu na zdrave pse. Prevalencija *cpe* gena utvrđenog PCR metodom bila je 50% (21/42) kod pasa s proljevom i 70% (28/40) kod zdravih pasa. Prisutnost *cpe* gena nije bila statistički značajno viša kod pasa s proljevom u odnosu na zdrave pse ($p=0,0903$). Uzorci fecesa pasa s proljevom bili su pozitivni na CPE i na *cpe* gen u 26% slučajeva (11/42), te u 10% (4/40) zdravih pasa. Statističkom obradom uočena je značajna razlika između rezultata dobivenih PCR metodom naspram onih dobivenih ELISA testom ($p=0,0072$). U provedenom istraživanju enterotoksin bakterije *C. perfringens* utvrđen je osim u pasa s proljevom i u zdravih pasa. Rezultati ovog istraživanja pokazali su da je za pouzdanu dijagnostiku enterotoksina bakterije *Clostridium perfringens* potrebno koristiti kombinaciju PCR i ELISA metode.

KLJUČNE RIJEČI: *Clostridium perfringens*, enterotoksin, proljev, lančana reakcija polimerazom, imunoenzimni test

9. SUMMARY

Presence of *Clostridium perfringens* enterotoxin in the feces of healthy dogs and dogs with diarrhea

Clostridium perfringens enterotoxin is often associated with acute and chronic diarrhea as well as with acute hemorrhagic diarrhea syndrome in dogs, but the onset of diarrhea caused by enterotoxin remains unknown. No gold standard exists for confirmation of *C. perfringens* enterotoxin in a feces of diarrheal dogs and for now diagnosis has been contingent on the simultaneous occurrence of clinical signs, the detection of large numbers of *C. perfringens* endospores in fecal smears and the immunodetection of CPE in fecal specimens by using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) together with the molecular polymerase chain reaction (PCR). The aim of this study was to establish the presence of *C. perfringens* enterotoxin in feces of healthy dogs and dogs with diarrhea using ELISA and PCR. Fecal samples were collected from 82 dogs, 40 of them were healthy and 42 were dogs with diarrhea of unknown etiology. Presence of *C. perfringens* enterotoxin (CPE) in 40% (17/42) dogs with diarrhea and 12.5% (5/40) healthy dogs was determined by ELISA test. The presence of CPE was not statistically significantly higher in dogs with diarrhea ($p = 0.3179$) than in healthy dogs. The prevalence of the *cpe* gene determined by the PCR method was 50% (21/42) in dogs with diarrhea and 70% (28/40) in healthy dogs. The presence of *cpe* gene was not statistically significantly higher in dogs with diarrhea compared to healthy dogs ($p = 0.0903$). Dogs with diarrhea were positive for CPE and *cpe* gene in 26% of cases (11/42) and in 10% (4/40) of healthy dogs. Statistical analysis showed a significant difference between the results obtained by the PCR method versus those obtained by the ELISA test ($p = 0.0072$). In conclusion, *C. perfringens* enterotoxin was present in both diarrheal and healthy dogs. Also, the results of this study have shown that a combination of PCR and ELISA methods is required for the reliable diagnosis of *Clostridium perfringens* enterotoxin in fecal samples.

KEY WORDS: *Clostridium perfringens*, enterotoxin, enzyme-linked immunosorbent assay, polymerase chain reaction

10. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 23. rujna 1993. u Pappenburgu u Njemačkoj. Osnovnu i srednju školu završila sam u Varaždinu. Nakon završene Prve gimnazije u Varaždinu upisala sam studij veterinarske medicine na Veterinarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, akademske godine 2012./13. Članica sam udruge "Equus" od 2014. i tajnica udruge studenata veterinarske medicine "USVM" od 2018. godine. Na klinici za Unutarnje bolesti Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu volontirala sam 2015. godine kada sam bila i demonstratorica iz kolegija Klinička propedeutika i kolegija Unutarnje bolesti. Od akademske godine 2017./2018. članica sam studentskog zbora kao i članica povjerenstva za odlikovanja Veterinarskog fakulteta. Obaveznu stručnu praksu odrađivala sam na klinici za kućne ljubimce Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Ghentu. Akademske godine 2017./2018. bila sam na ERASMUS + stručnoj praksi u Kleintierklinik Breitensee, smještenoj u Beču.