

Epizootija bruceloze ovaca i svinja na području Sisačko - moslavačke županije - opis slučaja



Ž. Cvetnić*, Irena Reil, Maja Zdelar-Tuk, Sanja Duvnjak, Z. Dumbović, I. Brkić, Ž. Mihaljević, B. Habrun i S. Špičić

Uvod

Bruceloza je kronična zarazna bolest različitih vrsta životinja i ljudi (zoonoza). Karakterizirana je nekrotičnim promjenama napadnutih organa i pobačajem gravidnih životinja. U ljudi je pretežito profesionalna bolest i obično se prenosi sa životinje na čovjeka. Bruceloza prouzročena vrstom *Brucella (B.) melitensis* jedna je od najčešćih bolesti u svijetu s više od 500 000 registriranih slučajeva godišnje (Samadi i sur., 2010.). Najočitiiji klinički znak melitokokoze jest pobačaj u posljednjoj trećini graviditeta, a može pobaciti od 50% do 90% ovaca u stadu (Cvetnić, 2015.). U Europskoj Uniji (EU) *B. melitensis* suzbijena je u sjevernoj, srednjoj i zapadnoj, a još uvijek predstavlja problem u južnom mediteranskom dijelu Europe. Endemska područja s najvećom prevalencijom u svijetu su tijekom posljednjih godina Bliski i Srednji Istok, Mediteran, Indijski potkontinent,

Subsaharska Afrika, Mongolija i nekoliko azijskih država bivšeg Sovjetskog Saveza (Bosilkovski, 2013.). Stalna žarišta bruceloze prouzročene vrstom *B. melitensis* u pojedinim područjima Bosne i Hercegovine ukazuju na stalnu opasnost od širenja te bolesti u Hrvatsku (Obradović i Velić, 2010., Murić Sabić i sur., 2014.).

U radu je prikazana epizootija melitokokoze na farmi goveda, ovaca i svinja na području Sisačko-moslavačke županije. U dokazu bolesti korištene su različite serološke te bakteriološke i molekularne tehnike dijagnostike bruceloze.

Materijali i metode

Tijekom mjeseca veljače (od 01. 02. do 20. 02. 2017.) u jednom obiteljskom poljoprivrednom gospodarstvu na

Dr. sc. Željko CVETNIĆ*, dr. med. vet., akademik (dopisni autor, e-mail: cvetnic@veinst.hr), Irena REIL, dr. med. vet., asistentica, dr. sc. Maja ZDELAR-TUK, dr. med. vet., znanstvena savjetnica, dr. sc. Sanja DUVNJAK, mag. ing. mol. biolog., postdoktorand, Hrvatski veterinarski institut, Zagreb, Hrvatska; mr. Zvonko DUMBOVIĆ, dr. med. vet., Ministarstvo poljoprivrede Republike Hrvatske - Uprava za veterinarstvo i sigurnost hrane, Zagreb, Hrvatska; Inoslav BRKIĆ, dr. med., Zavod za javno zdravstvo Sisačko-moslavačke županije, Sisak, Hrvatska; dr. sc. Željko MIHALJEVIĆ, dr. med. vet., znanstveni savjetnik, dr. sc. Boris HABRUN, dr. med. vet., znanstveni savjetnik, naslovni izvanredni profesor, dr. sc. Silvio ŠPIČIĆ, dr. med. vet., znanstveni savjetnik, Hrvatski veterinarski institut, Zagreb, Hrvatska

području Dvora na Uni došlo je do učestalih pobačaja te je pobacilo oko 15 ovaca. Gospodarstvo je imalo 20 goveda u tipu simentalac, 68 ovaca i 2 ovna pasmine pramenka i 9 križanih šarih svinja. Nakon što su se utvrdili pobačaji izvršen je inspeksijski nadzor te provedeno epidemiološko istraživanje.

Serološke pretrage

Uzorci krvi. U Hrvatski veterinarski institut je 10.02. dostavljena krv ovce (HR 620571232) koja je pobacila. Kasnije (23. 02. 2017.) po rješenju Veterinarske inspekcije dostavljene su krvi i ostalih životinja na gospodarstvu - 68 ovaca (44 ovce, 22 šilježice i 2 janjeta), 2 ovna i 9 svinja te krvi 20 goveda (12 krava, 7 junica i bik). Uzeti su i uzorci krvi 5 ljudi koji su bili u dodiru sa zaraženim stadom. Sve dostavljene krvi serološki su pretražene na brucelozu.

Serološki testovi. U serološkoj dijagnostici bruceloze koristili smo serološke metode propisane u "OIE Manual of standards for diagnostic test and vaccines, 2014". Za kontrolu bruceloze u ovaca (*B. melitensis*) koristili smo Rose Bengal test (RBT) kao test probira, a kao konfirmatorni test koristili smo reakciju vezanja komplementa (RVK). Koristili smo komercijalni antigen (Rose Bengal i RVK) proizvođača IDEXX, Francuska. Za dijagnostiku bruceloze u goveda korišteni su: RBT, RVK i imunoenzimski testovi (iELISA-Brucellosis serum, IDEXX, USA, Brucella-Ab C-ELISA-SVANOVIR, Švedska). Za dijagnostiku bruceloze u svinja korišten je RBT i iELISA (Ingensim Brucella Porcina-Španjolska), a za serološku dijagnostiku ljudi RBT, RVK i cELISA. Rezultati su prosuđivani prema uputama proizvođača ili uputama za izvođenje testova.

Bakteriološke pretrage

Uzorci materijala. Dostavljeni su (10. 02. 2017.) organi pobačenog ploda (jetra i sadržaj želuca) radi bakteriološke

pretrage na uzročnike pobačaja. Dana 21. 02. 2017., ista ovca oznake (HR 620571232) je eutanazirana te su radi bakteriološke pretrage uzeta jetra, maternica i limfni čvorovi. Iz istog gospodarstva 9 svinja je eutanazirano te je uzet materijal (spolni organi, jetra i limfni čvorovi) radi bakteriološke pretrage na brucelozu.

Bakteriološka pretraga. Nekoliko grama dostavljenog materijala (organe pobačenog ploda, jetre, spolnih organa i limfnih čvorova ovce i svinja) smo homogenizirali te oko 1 mL homogenata nacijepili na selektivne hranjive podloge: krvni agar, modificiranom selektivnom hranjivom podlogom *Brucella* agar i modificiranu selektivnu hranjivu podlogu Farrell (Alton i sur., 1988.). Ploče s nacijepljenim materijalom inkubirali smo 10 dana u termostatu pri normalnoj atmosferi na temperaturi od 37 °C i uz dodatak 10% CO₂. Rast kolonija promatra se u dnevnim razmacima, a obično je vidljiv 3-7 dana. Izolate smo identificirali na bazi morfologije kolonija (sitne, konveksne, prozirne i hrapave (R), rastu na CO₂, produkciji H₂S, rastu na podlogama s dodatkom 20 µg/mL tionina i bazičnog fuksina (Corbel i sur., 1983., Alton i sur., 1988.).

Molekularne pretrage

Nakon izdvajanja *Brucella* sp. bakteriološkom pretragom iz dostavljenog materijala, metodom Bruce-ladder pretraženi izolati podrijetlom iz jetre i sadržaja želuca pobačenog ploda, jetre i maternice eutanazirane ovce i izolat podrijetlom iz limfnog čvora svinje (ukupno 5 izolata).

Izolacija DNK

Izolacija DNK iz bakterijske kulture provedena je otapanjem bakteriološke ušice pune kulture u 100 µL destilirane vode (AccuGENE®, Lonza, Belgija) te inkubacijom u termobloku (Thermomixer comfort, Eppendorf, Njemačka) pri temperaturi 95 °C tijekom 20 min. uz istodobno tresenje pri 350 rpm-ova.

Nakon inkubacije uzorak je centrifugiran na 14 000 g-ova kroz 1 min. (SL8, Thermo Scientific, Njemačka) te se nakon hlađenja do sobne temperature supernatant koristio kao DNK kalup u PCR reakciji.

Tipizacija brucela molekularnom metodom Bruce-ladder

Za identifikaciju vrste brucela korištena je molekularna metoda multiplex PCR (Bruce-ladder) opisana u referenci Lopez-Goni i sur. (2011.). Ukupni volumen reakcijske smjese od 20 µL sastojao se od 10 µL QIAGEN Multiplex PCR Master Mix-a (Qiagen, Hilden, Njemačka), 2,5 µL vode (RNase-Free Water, Qiagen, Hilden, Njemačka), 0,4 µM početnica BMEI0998f i BMEI0997r (Invitrogen, Velika Britanija), 0,1 µM svake od ostalih početnica opisanih u referenci te 2 µL DNK. Umnažanje PCR produkata provedeno je na uređaju ProFlex PCR System (Applied Biosystems, SAD), s početnom denaturacijom na 95 °C kroz 15 min. te 35 ciklusa denaturacije na 95 °C kroz 30 sec., vezanja početnica na 64 °C kroz 45 sec. i produljivanja lanaca na 72 °C kroz 3 min., sa završnim korakom produljivanja lanaca na 72 °C kroz 10 min. Produkti umnožavanja DNK analizirani su pomoću uređaja za kapilarnu elektroforezu QIAxcel system (QIAGEN, Hilden, Njemačka) koristeći marker veličine 100-2500 baznih parova.

Kao pozitivnu kontrolu koristili smo standardne sojeve brucela: *B. abortus* 544, *B. suis* 1330, *B. melitensis* 16M, *B. ovis* 63/290 i *Brucella melitensis* Rev1.

Rezultati

Serološke pretrage

Pozitivne serološke reakcije dalo je 20 (28,6%) krvi ovaca Rose Bengal testom, a reakcijom vezanja komplementa pozitivne reakcije potvrđene su u 15 (21,4%) ovaca od 70 pretraženih. Svih 20 krvi goveda dale su negativnu reakciju, a od 9 krvi svinja pozitivne reakcije utvrđene su u 6 (66,7%) svinja. Isto tako dostavljene su krvi 5 ljudi u kojih su imunoenzimskim testom utvrdene negativne serološke reakcije (tabela 1).

Bakteriološke pretrage

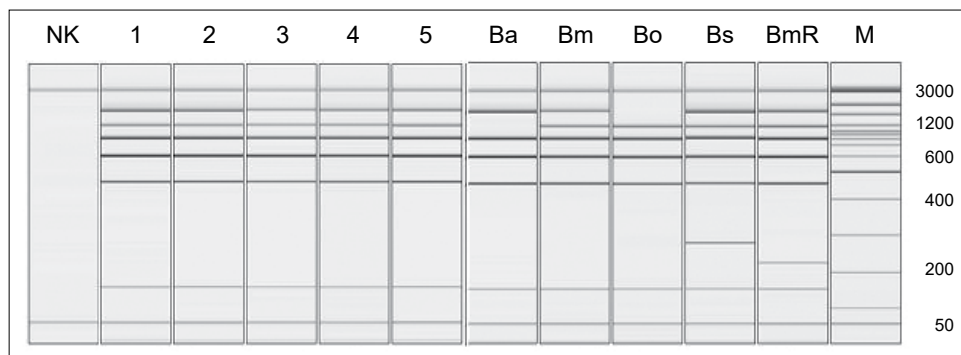
Bakteriološkom pretragom *Brucella* sp. izdvojeno je 5 izolata (iz jetre i sadržaja želuca pobačenog janjeta, maternice i jetre eutanazirane ovce i limfnog čvora eutanazirane svinje).

PCR pretrage

Molekularnom metodom Bruce-ladder dokazana je *Brucella melitensis* u svih pet izolata izdvojenih bakteriološkom pretragom iz pobačenog janjeta, ovce i svinje.

Tabela 1. Prikaz broja pretraženih krvi životinja i ljudi i broja pozitivnih na brucelozi.

Vrsta	Broj pretraženih krvi	Broj pozitivnih reakcija na brucelozi					
		RBT	%	RVK	%	ELISA	%
Ovca	70	20	28,6	15	21,4	-	-
Govedo	20	0	0	0	0	0	0
Svinja	9	0	0	0	0	6	66,7
Čovjek	5	0	0	0	0	0	0
Ukupno	104	20	19,2	15	14,4	6	5,8



Slika 1. Identifikacija *Brucella* na razini vrste pomoću Bruce-ladder multiplex PCR molekularne metode. NK - negativna kontrola; 1 - jetra pobačenog ploda; 2 - sadržaj želuca pobačenog ploda; 3 - jetra eutanazirane ovce; 4 - maternica eutanazirane ovce; 5 - limfni čvor eutanazirane svinje; kontrolni sojevi [Ba - *Brucella abortus* 544, Bm - *Brucella melitensis* 16M, Bo - *Brucella ovis* 63/290, Bs - *Brucella suis* 1330, BmR - *Brucella melitensis* Rev1], M - marker 50-3000 bp (Qiagen)

Rasprava

Bruceloza (melitokokoza) prouzročena vrstom *B. melitensis* smatra se jednom od najraširenijih i najopasnijih zoonoza u svijetu. Najčešći i najočitiji klinički znak bruceloze u ovaca i koza je pobačaj, a prilikom prve pojave bolesti može pobaciti i do 90% ovaca u stadu. U predmetnoj epizootiji evidentiran je pobačaj u oko 15 (34,1%) od 44 ovce, a dvije ovce su uginule. Pozitivne serološke reakcije utvrđene su testom probira (Rose Bengal) u 20 (28,6%) ovaca, a potvrdnim testom (reakcijom vezanja komplementa) pozitivne reakcije potvrđene su u 15 (21,4%) od 70 pretraženih ovaca. Zanimljiv je i nalaz pozitivne reakcije (imunoenzimskim testom) u 6 (66,7%) od 9 pretraženih krvi svinja. Svih 20 krvi goveda dale su negativnu reakciju na brucelozu. Obično, u pravilu najčešće od melitokokoze prvo obole ljudi koji su profesionalno vezani za rad sa stokom (stočari, veterinari, farmeri), a zatim i ostali koji konzumiraju proizvode (mlijeko, sir) zaraženih životinja (Punda-Polić i Cvetnić, 2006.). Međutim, tijekom ove epizootije serološkim pretragama krvi podvrgnuto je 5 ljudi i utvrđene su negativne reakcije s više seroloških metoda. Unatoč negativnih

seroloških reakcija ljudi su prema uputama epidemiološke službe podvrgnuti profilaktičkoj terapiji (doksiciklin 2 x 100 mg i rifampicin 1 x 300 mg/21 dan). U gospodarstvu su provedene sve mjere prema aktualnom "Pravilniku o mjerama za suzbijanje i iskorjenjivanje bruceloze ovaca i koza (*B. melitensis*)."

Melitokokoza je tijekom stoljeća ugrožavala zdravlje ljudi i životinja. Poznato je da je jedna od najtežih zoonoza te joj zbog toga pripada važno mjesto. Iako je bolest već dugo poznata, postoje iskustva u kontroli i suzbijanju bolesti, postoje područja u našem okruženju gdje bolest opstaje. Još uvijek se pojavljuju problemi u suzbijanju i iskorjenjivanju melitokokoze u EU - u Portugalu i Grčkoj te u manjoj mjeri i u Španjolskoj. Problem melitokokoze u ovaca i koza osobito je izražen u Makedoniji, Kosovu, Albaniji te Bosni i Hercegovini (BiH). Postoje različiti načini kontrole bruceloze u tim zemljama, a najčešće se primjenjuje cijepjenje (Murić Sabić i sur., 2014., Hamidi i sur., 2016.).

U Hrvatskoj je u tijeku provođenje programa suzbijanja melitokokoze u ovaca i koza. Tijekom niza godina sustavnim radom ova bolest je gotovo suzbijena, ali unatoč svim naporima

ona i dalje opstaje u različitim intenzitetima. Da bi se spriječila i u početku suzbile epidemije i epizootije navedenih bolesti u ljudi i životinja, potreban je stalni nadzor nad zdravljem životinja. Nadzorom Veterinarske inspekcije utvrđeno je da je navedenom gospodarstvu još 2015. dodijeljen status stada službeno slobodnog od *B. melitensis* sukladno Programu kontrole i iskorjenjivanja bruceloze ovaca i koza u Republici Hrvatskoj. Po svemu sudeći je navedeno stado nakon svih kontrola bilo u kontaktu s nekim drugim stadom koje je bilo zaraženo, ili je to bio unos zaraženih ovnova ili ovaca bez prethodne kontrole bruceloze. Gospodarstvo se nalazi na samoj granici s BiH u prilično nepristupačnom području te je stalna kontrola gotovo nemoguća.

U Hrvatskoj je opisano nekoliko većih epizootija i epidemija melitokokoze. Prva je opisana u Istri i to 1947. godine, tada je od melitokokoze je oboljelo preko 300 osoba. Navodi se da je tada posljednji slučaj oboljelog čovjeka zabilježen 1954. godine, a u ovaca i koza još i 1961. godine (Karlović, 2000., Terlević, 2005.). Postoje podatci u Hrvatskom veterinarskom institutu, Zagreb da se tijekom 1990. i 1991. godine epizootija pojavila u Istri i sjevernoj Hrvatskoj. Godine 2004. godine u Splitsko-dalmatinskoj županiji utvrđena je epizootija prouzročena *B. melitensis*. Bruceloza je klinički prvo dokazana u čovjeka iz okolice Splita, a koji se bavio stočarstvom i nakupom ovaca i koza. Tijekom akcije kontrole stada u razdoblju lipanj - studeni 2004., godine pretražene su krvi 21 893 krv koza, ovaca i goveda iz 424 stada u mjestima Sinj, Vrlika, Dismo, Otok, Trilj i Hrvace. Pozitivne reakcije utvrđene su u 372 koze i ovce te 4 psa u 5 stada. Veterinarsko-sanitarnim mjerama neškodljivo je uklonjeno 1 572 koza i ovaca. Tijekom epizootije utvrđeni su klinički simptomi bruceloze u četvero ljudi. Kasnije je utvrđen slučaj bruceloze čovjeka iz Dubrovačko-nere-

tvanske županije (Metković), a bruceloza je zabilježena u nekoliko stada koza i ovaca tijekom 2005. godine. Izvor bruceloze bila su inficirana stada koza i ovaca te neposredan kontakt s inficiranim životinjama. Na temelju epizootioloških podataka uvijek se moglo zaključiti da su izvor *B. melitensis* bile koze ili ovce ilegalno uvezene iz BiH, a u svim slučajevima se radi o mjestima neposredno uz granicu s BiH (Cvetnić i sur., 2006., Punda-Polić i Cvetnić, 2006.). Upravo u tom razdoblju (od 2000. do 2005.) u BiH je prijavljeno 245 oboljelih od bruceloze (Dautović-Krkić 2005., Zvizdić i sur., 2006.). Obradović i Velić (2010.) navode da je od 2001. do 2003. bilo prijavljeno samo 64 slučajeva bruceloze, a već 2004. je taj broj bio 90, a 2008. 778 te je broj oboljelih te godine bio najviši i iznosio je 64/100 000. Špičić i sur. (2010.) godine 2008. dokazuju *B. melitensis* biovar 3 u Hrvatskoj u 2 stada u dvije županije (Karlovačka i Splitsko-dalmatinska), a po prvi puta je dokazana *B. melitensis* i u goveda. Kasnija istraživanja od 2009. do 2013. dokazala su brucelozu u 1,8% pretraženih ovaca i koza u Republici Hrvatskoj u Karlovačkoj, Ličko-senjskoj i Splitsko-dalmatinskoj županiji (Cvetnić i sur., 2014.). Svaki put je objektivno dokazano da su stada bila u neposrednoj blizini granice i da su u stado unesene zaražene životinje podrijetlom iz BiH.

Provođenjem "Programa kontrole i iskorjenjivanja bruceloze ovaca i koza (*B. melitensis*) u Republici Hrvatskoj" doprinjelo je da velika većina stada ovaca i koza u Hrvatskoj (više od 95%) ima službeno slobodan status od bruceloze (*B. melitensis*). Na temelju ovog istraživanja i ranijih istraživanja može se zaključiti da Hrvatska ima relativno povoljnu situaciju s obzirom na infekciju ljudi s *B. melitensis*. Međutim, postoji stalna prijetnja od unosa uzročnika s područja BiH u Hrvatsku zbog nepovoljne epizootiološko/epidemiološke situacije na graničnim područjima. Nedavno

potvrđeni slučajevi bruceloze ovaca na području Karlovačke i sada Sisačko-moslavačke županije uz samu granicu s BiH ukazuju na aktualnu prijetnju, a pri čemu treba posebno paziti na moguće širenje i to najviše na ilegalne migracije i moguće kontakte u prirodi poput divljih životinja. Iako u ovom opisanom slučaju to nije objektivno dokazano, ali je to bilo uvijek pravilo u svim ranije opisanim i dokazanim epizootijama prouzročeni vrstom *B. melitensis*.

Sažetak

U radu je opisana epizotija bruceloze prouzročena vrstom *Brucella melitensis* u stadu ovaca iz okolice Dvora na Uni na području Sisačko-moslavačke županije. U predmetnoj epizootiji evidentirani su pobačaji u oko 15 (34,1%) od 44 ovce, a dvije ovce iz stada su uginule. Pozitivne serološke reakcije utvrđene su testom probira (Rose Bengal) u 20 (28,6%) ovaca, a potvrđenim testom (reakcijom vezanja komplementa) pozitivne reakcije potvrđene su u 15 (21,4%) od 70 pretraženih ovaca. Zanimljiv je i nalaz pozitivne reakcije (imunoenzimskim testom) u 6 (66,7%) od 9 pretraženih krvi svinja. Negativne serološke reakcije utvrđene su u krvi 20 goveda i u 5 ljudi. Bakteriološkom pretragom *Brucella sp.*, izdvojena je iz jetre i sadržaja želuca pobačenog ploda, jetre i maternice etuanazirane ovce i limfnih čvorova svinje. Molekularnom metodom (Bruce-ladder) iz izdvojenih izolata identificirana je *B. melitensis*. *B. melitensis* je prvi puta dokazana u svinja u Republici Hrvatskoj. U stadu su provedene sve mjere prema "Pravilniku o mjerama za suzbijanje i iskorjenjivanje bruceloze ovaca i koza (*B. melitensis*). Provođenjem "Programa kontrole i iskorjenjivanja bruceloze ovaca i koza (*B. melitensis*) u Republici Hrvatskoj" doprinijelo je da velika većina stada ovaca i koza u Hrvatskoj ima službeno slobodan status od bruceloze (*B. melitensis*). Može se zaključiti da postoji stalna opasnost od unosa uzročnika u Hrvatsku zbog nepovoljne epizootiološko/epidemiološke situacije na graničnim područjima te je stalna kontrola bruceloze i dalje nužna.

Ključne riječi: bruceloza, ovca, svinja, Sisačko-moslavačka županija

Literatura

- ALTON, G. G., L. M. JONES, R. D. ANGUS and J. M. VERGER (1988): Techniques for the brucellosis laboratory. 1st Ed. 190 p., Inra, Paris.
- BOSILKOVSKI, M. (2013): Human brucellosis in Republic of Macedonia - Clinical experience in endemic region. Bruceloza u Hrvatskoj i susjednim zemljama (HAZU, Zagreb, 25. 9. 2013). Knjiga sažetaka, str. 5-6.
- CORBEL, M. J., K. P. W. GILL and E. L. THOMAS (1983): Methods for the identification of *Brucella*. Central Veterinary Laboratory, New Haw, Weybridge, Surrey KT15 3NB.
- CVETNIĆ, Ž., A. GAŠPAR, E. LISTEŠ, V. PUNDA-POLIĆ, S. ŠPIČIĆ i S. MARJANOVIĆ (2006): Epizootija bruceloze u ovaca i koza u Južnoj Hrvatskoj. Vet. stn. 37, 69-75.
- CVETNIĆ, Ž., S. ŠPIČIĆ, T. KIŠ, M. ZDELAR-TUK, S. DUVJAK, I. RAČIĆ, M. BENIĆ, B. HABRUN, I. REIL and Z. ŠOSTAR (2014): Melitococcosis in the Republic of Croatia. Psychiatr. Danub. 26 (Suppl 3), 546-551.
- CVETNIĆ, Ž. (2015): Bruceloza. Medicinska naklada/Hrvatski veterinarski institut. *Brucella melitensis*, 90-101.
- DAUTOVIĆ KRKIĆ, S. (2005): Humana bruceloza u BiH, klinički i epidemiološki aspekti. »Bruceloza - javnozdrastveni problem« 20-ti simpozijum iz infektivnih bolesti s međunarodnim sudjelovanjem (Sarajevo, 23-25. veljače 2006.). Knjiga sažetaka (str. 16.).
- KARLOVIĆ, M. (2000): Melitokokoza u Istri (1947.-1961.): Različitost podataka u objavljenim raspravama i neobjavljenim zapisnicima i izvještajima. Vet. stn. 31, 39-46.
- LOPEZ-GONI, I., D. GARCIA-YOLDI, C. M. MARIN, M. J. DE MIGUEL, E. BARQUERO-CALVO, C. GUZMAN-VERRI, D. ALBERT and B. GARIN-BASTUJI (2011): New Bruce-ladder multiplex PCR assay for the biovar typing of *Brucella suis* and the discrimination of *Brucella suis* and *Brucella canis*. Vet. Microbiol. 154, 152-155.
- HAMIDI, A., A. MAYER-SCHOLL, S. DRESHAJ, A. ROBAJ, D. SYLEJMANI, N. RAMADANI, S. AL DAHOUK and K. NÖCKLER (2016): Isolation and identification of *Brucella melitensis* biovar 3 from vaccinated small ruminants: A public health threat in Kosovo. Transbound Emerg. Dis. 63, e296 - e299.
- MURIĆ SABIĆ, I., Z. JUSUFHODŽIĆ, E. NOGIĆ, A. ŠUNJE RIZVAN i J. PAVLOVIĆ (2014): Efikasnost provođenja programa kontrole i suzbijanja bruceloze ovaca i na području Unsko-sanskog kantona. Veterinaria 63, 55-61.
- OBRADOVIĆ, Z. and R. VELIĆ (2010): Epidemiological characteristics of brucellosis in Federation of Bosnia and Hercegovina. Croat. Med. J. 51, 345-350.

13. PUNDA POLIĆ, V. and Ž. CVETNIĆ (2006): Human brucellosis in Croatia. *Lancet Inf. Diseases*, 6, 540-541.
14. SAMADI, A., M. K. ABABNEH, N. D. GIADINIS, S. Q. LAFI (2010): Ovine and caprine brucellosis (*Brucella melitensis*) in aborted animals in Jordanian sheep and goat flocks. *Vet. Med. Inter.* doi: 10.4061/2010/458695.
15. ŠPIČIĆ, S., M. ZDELAR-TUK, I. RAČIĆ, S. DUVNJAK and Ž. CVETNIĆ (2010): Serological, bacteriological and molecular diagnosis of brucellosis in domestic animals in Croatia. *Croat. Med. J.* 51, 320-326.
16. TERLEVIĆ, E. (2005): Bruceloza u Hrvatskoj: područje Istre. »Bruceloza – javnozdrastveni problem« 20-ti simpozijum iz infektivnih bolesti s međunarodnim sudjelovanjem (Sarajevo, 23-25. veljače 2006.). Knjiga sažetaka (str. 42.).
17. ZVIŽDIĆ, S., D. ČENGIĆ, M. BRATIĆ, S. MEHANIĆ, F. PINJO and S. HAMZIĆ (2006): *Brucella melitensis*: review of the human infection case. *Bosn. J. Basic. Med. Sci.* 6, 15-18.

Brucellosis outbreak in sheep and swine in Sisak-Moslavina County – a case report

Željko CVETNIĆ, DVM, PhD, Academician, Irena REIL, DVM, Assistant, Maja ZDELAR TUK, DVM, PhD, Scientific Advisor, Sanja DUVNJAK, BSc, Postdoctoral Student, Croatian Veterinary Institute, Zagreb, Croatia; Zvonko DUMBOVIĆ, DVM, MSc, Ministry of Agriculture Republic of Croatia - Veterinary and Public Health Directorate, Zagreb, Croatia; Inoslav BRKIĆ, DM, Public Health Sisak-Moslavina County, Sisak, Croatia; Željko MIHALJEVIĆ, DVM, PhD, Scientific Advisor, Boris HABRUN, DVM, PhD, Scientific Advisor, Associate Professor, Silvo ŠPIČIĆ, DVM, PhD, Scientific Advisor, Croatian Veterinary Institute, Zagreb, Croatia

This paper describes a brucellosis outbreak caused by *Brucella melitensis* in a flock of sheep located in the vicinity of Dvor na Uni within Sisak-Moslavina County. Within this outbreak, abortions were recorded in 15 (34.1%) of 44 sheep, with the resultant death of two sheep of this flock. Positive serological reactions were confirmed in 20 (28.6%) sheep by the screening Rose Bengal Test, while a confirmatory test (complement fixation test) confirmed positive reactions in 15 (21.4%) of 70 examined sheep. There were also interesting findings of positive reactions (by immunoenzyme test) in 6 (66.7%) of 9 examined pig blood samples. Negative serological reactions were found in the blood of 20 cattle and 5 humans. Bacteriological testing revealed *Brucella* sp. in the liver and gastric contents of an aborted foetus, in the liver and uterus of a euthanized sheep, and in the lymph nodes of a pig. Further molecular

identification (Bruce-ladder method) showed that all isolates belonged to *B. melitensis*. This is the first report of the occurrence of *B. melitensis* in pigs in Croatia. All measures listed under the "Ordinance on measures for suppression and eradication of sheep and goat brucellosis (*B. melitensis*)" were implemented in this herd. The systematic implementation of the "Programme for control and eradication of sheep and goat brucellosis (*B. melitensis*) in the Republic of Croatia" has led to the vast majority of sheep and goat flocks in Croatia receiving the status of being officially free from brucellosis (*B. melitensis*). It can be concluded that there is a constant risk of the introduction of pathogens into Croatia due to the unfavourable epidemiological situation in border areas, and continuous brucellosis control is still necessary.

Key words: brucellosis, swine, sheep, Sisak-Moslavina County