

DOI 10.7251/VETJ1802392V

UDK 636.2.09:616.981.42

Originalni naučni rad

ZNAČAJ UPOTREBE ALERGIJSKOG KOŽNOG TESTA NA BRUCELIN U DIJAGNOSTICI BRUCELOZE GOVEDA^{1*}

Lejla Velić^{1*}, Toni Eterović¹, Silvijo Špičić², Željko Cvetnić², Amina Hrković Porobija¹, Benjamin Čengić¹, Selma Filipović¹, Tarik Bajrović¹

1 Veterinarski fakultet, Sarajevo, Bosna i Hercegovina

2 Hrvatski veterinarski institut, Zagreb, Hrvatska

*Korespondentni autor: Lejla Velić lejla.velic@vfs.unsa.ba

Kratak sadržaj: Brucele u organizmu inficiranih životinja induciraju i humoralni i ćelijski imunološki odgovor. Humoralni imunološki odgovor se bazira na praćenju pojave specifičnih antitijela protiv glatkog lipopolisaharida (S-LPS) ćelijske membrane brucele. Međutim kod говеда u dokazu specifičnih antitijela klasičnim serološkim metodama mogu se detektovati antigene determinate za druge vrste mikroorganizama (unakrsna reaktivnost) kao što su: *Escherichia coli* 0:157, *Yersinia enterocolitica* 0:9, *Salmonella urban*, *Pseudomonas malthophilia* i *Pasteurellae*. Cilj ovog rada je utvrditi ćelijski imunološki odgovor koji se bazira na upotrebi pročišćenog i standardiziranog alergena, kojem je u potpunosti odstranjen lipopolisaharid te kao takav ne dovodi do razvoja humoralnog imunološkog odgovora. Ukupno je ispitano 16 говеда s područja Federacije Bosne i Hercegovine kod kojih je - Rose Bengal testom ireakcijom vezivanja komplementa utvrđeno prisustvo specifičnih antitijela na бруцелозу. Кожни тест је изведен према упутима произвођача. U testu je korišten бруцелин, екстракт *B. melitensis* B115 (Synbiotics Brucellergene OCB). Kod 14 говеда je nakon 72 sata od aplikacije utvrđeno zadebljanje кожног набора, dok kod два говеда nije izmjereno nikakvo zadebljanje. Razlog svakako treba tražiti u činjenici da su два говеда imala pozitivan rezultat samo u Rose Bengal testu te se to može prepisati unakrsnoj reakciji s antigeno srodnim mikroorganizmima.

Kožni алергијски тест није препоручљив као самосталан дијагностички алат јер не реагују све заражене животиње, стога овај тест се не може препоручити као индивидуални дијагностички тест или у сврху међународне трговине. Међутим, због високе специфичности и адекватне осјетљивости на нивоу стада или стада, може се препоручити за надзор стада / стада у подручјима слободним од бруцелоze.

Кључне ријечи: бруцелоza, говеда, бруцелин, хуморални имунитет, ћелијски имунитет

^{1*} Презентован на 23. Годишњем савјетовању доктора ветеринарске медицине Републике Српске (БиХ). Теслић, 6-9- јуна 2018.

UVOD

Узročник бруцелозе су факултативне интрацелуларне грам–негативне бактерије из рода *Brucella*. Код пријемљивих животиња бруцеле потичу хуморални и целуларни имунолошки одговор. Док се хуморални имунолошки одговор базира на праћењу појаве и раста титра специфичних антитјела против липолисахарида- - глатких бруцела (S-LPS) (Benet i sar., 1991), ћелијски имунолошки одговор заснован је на активацији макрофага од стране лимфокина које излучују Т ћелије. На праћење хуморалног имунолошког одговора серолошким методима утичу многи фактори као што су дуг и варијабилан период инкубације болести током којег су серолошки тестови негативни (Nelson i sar., 1966.), имунолошки одговор настао вакцинацијом, варијација у серолошким одговорима појединих говеда као и стадијем gravidности у вријеме инфекције животиња (Fensterbank i sar. 1975.).

Бројни серолошки тестови који су тренутно доступни јасно указују да ни један тест не може задовољити оно што се дефинише као „идеалан“ као што је откривање ране фазе инфекције током дугог и промјенљивог инкубационог периода, присуство несPECIFICНИХ антитјела (унакрсне реакције), откривање latentних или хроничних носиоца узročника и разликовање вакциналних од инфективних антитјела (Nielsen i Duncan, 1990). Циљ овог рада је утврдити ћелијски имунолошки одговор код серолошки позитивних говеда употребом прочишћеног и стандардизираниог алергена, којем је у потпуности одстранјен липолисахарид те као такав не доводи до развоја хуморалног имунолошког одговора као и указати на значај примјене овог теста у постављању коначне дијагнозе бруцелозе код говеда.

MATERIAL I METODE

Ispitivane životinje

Istraživanje je provedeno na 14 говеда код којих је Rose Bengal тестом (test brze serumske aglutinacije) i реакцијом vezivanja komplementa (RVK) utvrđeno присуство специфичних антитјела за узročника бруцелозе, као и два говеда код којег је Rose Bengal тестом utvrđena pozitivna реакција, dok је реакција vezivanja komplementa dala negativan rezultat. Svi испитани узорци говеда су потicali из газдинства у којима се заједно узгајају говеда и овце које

nisu биле вакцинисане. Узорци крви говеда за серолошка испитивања достављани су на испитивање у Laboratorij за virusologiju i serologiju, Nacionalni referentni laboratorij за бруцелозу у оквиру годишње наредбе за контролу заразних и паразитарних болести у Federaciji Bosne i Hercegovine за 2017. godinu.

Kožni test

Test је извођен према упутству OIE Manuala (2016) i Seagerman i sar., (1999) - бруцелином, који је екстракт *B. melitensis* B115 (Synbiotics Brucellergene OCB).

Prema uputstvu proizvođača dlaka je šišana sa bočne strane i intradermalno je aplicirano 0,1 ml brucelina (2000 jedinica/ml). Debljina kožnog nabora je neposredno prije aplikacije mjerena - kutimetrom. Brucelin smo aplicirali s injektorom i iglom. Potvrda uspješne aplikacije bio je opipljiv čvorić na mjestu aplikacije. Očitavanje reakcije smo vršili 42-72 sata nakon aplikacije, primarno palpacijom, a nakon toga i mjerenjem kutimetrom. Pozitivna reakcija se ocjenjuje kvalitativno ili stvaranjem lokalnog ograničenog edematoznog otoka i otvrdnuća. Svako povećanje kožnog nabora veće - od 1,5 mm se

smatralo pozitivnom reakcijom. U cilju smanjenja mogućnosti varijacija u očitavanju, apliciranje kao i očitavanje je vršila ista osoba.

РЕЗУЛТАТИ

Kod svih говеда korištenih u ispitivanju nije zabilježena bolnost, nekroza ili oteknuće regionalnih limfnih čvorova na strani vrata na kojoj je apliciran alergen.

Reakcija je očitavana jednokratno, sedamdeset dva sata nakon aplikacije brucelina - mjerenjem debljine kožnog nabora. Dobijene vrijednosti mjerenja prikazane su u tabeli 1.

Tabela 1. Vrijednosti mjerenja kožnog nabora prije i poslije aplikacije brucelina

Goveda br.	Kožni nabor prije aplikacije brucelina (mm)	Kožni nabor 72 sata nakon aplikacije brucelina (mm)	Razlika u debljini kožnog nabora (mm)
1.	10	21	11
2.	9	12	3
3.	12	20	8
4.	13	16	3
5.	10	17	7
6.	10,5	17	6,5
7.	9	10	1
8.	13	19	6
9.	20	22	2
10.	8	11	3
11.	9	13	4
12.	10	15	5
13.	6	8	2
14.	6	13	7
15.	7	7	0
16.	10	13	3

Kao što je vidljivo u tabeli od 16 testiranih životinja povećanje kožnog nabora je utvrđeno kod 14, dok kod dva goveda nisu zabeležene promene. Prosječna vrijednost povećanja zadebljanja se kretala u prosjeku 4,5 mm. Iako se kožni alergijski test na brucelin bazira na reakciji kasne

preosjetljivosti, fenomenu koji se koristi kod - tuberkulinizacije, reakcija nakon aplikacije brucelina je dva do tri puta manje intenzivna u odnosu na - tuberkulinizaciju (Saegerman i sar, 1999) (slika 1).



Slika 1. Mjerenje kožnog nabora kutimetrom.

DISKUSIJA

Postavljanje precizne i konačne dijagnoze kod oboljenja kao što je bruceloza je od velike važnosti u kontroli bolesti kako kod životinja tako i kod ljudi. S obzirom na to da se bruceloza kod životinja manifestira pobačajima gravidnih ženki u zadnjoj trećini graviditeta postavljanje kliničke sumnje se bazira na anamnestičkim podacima vezanim za reproduktivne poremećaje u stadiu. Konačna dijagnoza se bazira na primjeni laboratorijskih direktnih i indirektnih metoda. Zlatni standard u di-

agnostici bruceloze je izolacija bruce-
la iz dijagnostičkog materijala (Alton i sar. 1988). Međutim ova- metoda zahtjeva odgovarajući biosigurnosni nivo - jer se radi o uzročniku visokog rizika. Molekularne metode su s druge strane važan alat u diјагностици бруцелозе - i u epizootiološkim istraživanjima, ali zahtijevaju veoma skupu i opremu kao i visoko educirano osoblje (Godfrid sar., 2010). Primjena seroloških metoda također ima svojih prednosti i mana. Serološki testovi za - izvođenje ne zahtijevaju posebne uslove, manje su zahtjevni, sigurniji i mnogo ekonomičniji u

odnosu na bakteriološke i molekularne metode. Iako je opće prihvaćeno da su serološki testovi pouzdani u dijagnostici bruceloze kod goveda (FAO/WHO, 1986), - niti jedan dostupan serološki test ne može detektirati specifična antitela u svim fazama infekcije - (Nielsen, 2002). U istraživanjima provedenim 60tih i 80tih godina prošlog vijeka utvrđeno je da u serumu goveda inficiranih malim brojem brucela imunološki odgovor je slab ili upotpunosti izostaje (Rose i sar., 1964; Nicoletti i Muraschi, 1966, Ray i sar., 1988).

Također, u slučajevima infekcije brucelama u kasnoj fazi graviditeta može doći do normalnog poroda, ali su takve životinje inficirane iako se u serumu takvih životinja rijetko može dokazati signifikantan titar antitijela (Cunningham, 1968).

Nedostatak seroloških testova se ogleda u tome što se kod dokazivanja prisustva antitijela protiv bruceloze u serumu inficiranih životinja mogu unakrsno dokazati antitijela nastala poticanjem antigeno srodnih mikroorganizama kao što su: *Escherichia coli* 0:157, *Yersinia enterocolitica* 0:9, *Salmonella urban*, *Pseudomonas malthophilia* i *Pasteurellae* (Corbel, 1985, Kittelberger i sar., 1995). Iz ovog proizilazi da ne postoji niti jedan serološki test koji bi mogao da precizno detektuje sve stadije bruceloze (Mylrea i Fraser, 1976, Nielsen, 2002).

U našem istraživanju koristili smo pročišćeni i standardizirani alergen brucelin kojem je u potpunosti odstranjen lipopolisaharid, te kao takav

ne može dovesti do stvaranja specifičnih antitijela. Ćelijski imunološki odgovor predstavlja najvažnij mehanizam odbrane kod infekcije brucelama. Mehanizam se sastoji u tome da limfocitnom stimulacijom dolazi do inhibicije migracije makrofaga, blastogeneze limfocita i razvoja kasnog tipa senzitivnosti (Soper i sar. 1978). Utvrđivanjem povećanja kožnog nabora kod 14 od 16 goveda kod kojih su s obje serološke metode (RB i RVK) dale pozitivan rezultat dokazuje da je kožni alergijski test najspecifičniji indirektni test za dijagnostiku bruceloze kod nevakciniranih životinja. Iako osetljivost i specifičnost kožnog alergijskog testa zavisi od odabranih kriterija za interpretaciju rezultata (De Massis i sar, 2005), - rezultati dobiveni ovim istraživanjima se podudaraju s rezultatima istraživanja drugih autora (MacDiarmida i Hellstroma, 1987, Pouillot i sar., 1997, Seagermana i sar., 1999). Mnogi autori (Bercovich i sar., 1992., Plommet, 1984., Seagerman i sar., 1999) smatraju da se vrijednost zadebljanja kožnog nabora - jednako i veće od 1mm, ne uzima kao granična vrijednost, nego da se svako vidljiva i/ili opipljiva reakcija smatra pozitivnom.

Negativan rezultat na kožni alergijski test koji smo dobili u našem istraživanju kod dva goveda je zabilježen kod goveda kod kojih je Rose Bengal bio pozitivan, dok je RVK dao negativan rezultat, a koji se prema Corbel, (1985) te Kittelberger sar. (1995) dovodi u vezu sa unakrsnom reakcijom sa drugim antigen srodnim

mikroorganizmima.

Važno je napomenuti da životinje koje su vakcinisane sa *B. melitensis* Rev.1, *B. abortus* S19 ili RB51 mogu dati pozitivne rezultate kožnim алергијским тестом годинама након вакцинације (Pouillot i sar., 1997; De Massis i sar., 2005). Zbog toga se ovaj test ne može preporučiti ni kao jedini дијагностички тест, нити у сврху међународне трговине у подручјима гдје се користе *Brucella*

vakcine. Такође важно је напоменути да не реагују све заражене животиње, стога овај тест се не може препоручити као индивидуални дијагностички тест или у сврху међународне трговине. Међутим, због високе специфичности и адекватне осјетљивости на нивоу стада или стада, може се препоручити за надзор стада / стада у подручјима слободним од бруцелозе (OIE 2016).

ZAKLJUČAK

Na osnovu iznesenog može se zaključiti da primjena kožnog алергијског теста у дијагностици бруцелозе говеда има нарочито велику вриједност код говеда код којих су серолошки тестови показали сумњив и нејасан резултат као потврдна метода код невакцинисаних говеда. У условима гдје је бруцелоza ензоотског карактера и гдје се примјењује вакцинација малих преживара те у условима гдје се овце и козе заједно држе с говедима

на истим паšnjacima и настaмбaма увођење додатног теста у дијагностици бруцелозе као што је кожни тест касне преосјетљивости на бруцелин је користан дијагностички алат у дијагностици бруцелоз. Недостатак кожног теста се огледа у томе да није примјенљив у случајевима вакцинације животиња као и то да се у код понављања кожног алергијског теста треба саčekати период десензибилизације организма 6 седмица (OIE 2016).

LITERATURA

1. Alton G.G., Jones L.M., Angus R.D. and Verger J.M. (1988): Techniques for the Brucellosis Laboratory, Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), Paris.
2. Benet J.J., Massard C., Garin-Bastuji B., Moutou F., Dufour B., Schaeffer C. and Cotton T. (1991): Reactions serologiques atypiques dans le depistage de la brucellose bovine: Enquete Bpidemiologique dans les departements condemes. *Epidtmiol. Sante Anim.*, 19: 97-130.
3. Bercovich Z., Ter Laak E.A., Vanlipzig J.H.H. (1992): Detection of brucellosis in dairy herds after an outbreak of the disease using a delayed-type hypersensitivity test. *Preventive Veterinary Medicine*, 13, 277–285.
4. Corbel M.J. (1985): Recent advances in the study of *Brucella* antigens and Their serological cross-reactions. *Vet Bull* 55, 927-942.

5. Cunningham B.(1968): The control and eradication of brucellosis. I. Serological response in cattle following vaccination with S,9 and killed *Brucella* 45120 adjuvant vaccine, *Vet. Rec.*, 82, 7.
6. De Massis F, Giovannini A., Di Emidio B., Ronchi G.F., Tittarelli M., Di Ventura M., Nannini D and Caporale V. (2005): Use of the complement fixation and brucellin skin tests to identify cattle vaccinated with *Brucella abortus* strain RB51. *Veterinarij italiana*, 41 (4), 291-299.
7. FAO/WHO (1986): Joint FAO/WHO expert committee on brucellosis, 740:1-132.
8. Fensterbank R., Plummet M., and Pardon, P. (1975): Traitement de Ia brucellose bovine par I' oxytetracycline, *Ann. Rech. Vet.*, 6, 43.
9. Godfroid J., Nielsen K., Saegerman C. (2010.): Diagnosis of brucellosis in livestock and wildlife. *Croat. Med. J.*, 15;51, 4:296-305.
10. Kittelberger R., Hilbink F., Hansen M.F., Ross G.P., Joyce M.A., Fenwick S., Heesemann J., Wolf-Waltz H., Nielsen K. (1995): Serological crossreactivity between *Brucella abortus* and *Yersinia enterocolitica* 0:9 II the use of *Yersinia* outer proteins for the specific detection of *Yersinia enterocolitica* infections in ruminants. *Vet Microbiol.* 47(3-4):271-80.
11. MacDiarmid S.C., Hellstrom J.S. (1987): An intradermal test for the diagnosis of brucellosis in extensively managed cattle herds. *Preventive Veterinary Medicine*, 4, 361-369.
12. Mylrea P.J., Fraser G.C. (1976): The use of supplementary tests in the serological diagnosis of bovine brucellosis. *Aust. Vet.J.* 52: 261-266.
13. Nelson C. J., Anderson R. K., Kimberling C. V., and Pietz D. E. (1966): Zoologic factors of bovine brucellosis: comparative bacteriologic studies of infected herds, *Am. J. Vet. Res.*, 25, 1515.
14. Nicoletti P. and Muraschi T. F. (1966): Bacteriologic evaluation of serologic test procedures for the diagnosis of brucellosis in problem cattle herds, *Am. J. Vet. Res.*, 27, 689.
15. Nielsen K. (2002): Diagnosis of brucellosis by serology. *Vet Microbiol*; 90: 447–59.
16. Nielsen K., Dunkan J.R. (1990): *Animal Brucellosis*, Animal Diseases Research Institute Agriculture Canada, Nepean, Ontario.
17. OIE (2016): "Terrestrial manual, Bovine brucellosis," in *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Brucellosis (Brucella abortus, B. melitensis and B. suis)*(NB: Version adopted in May 2016).

18. Plommet M. (1984): Les dernieres etapes de la prophylaxie de la brucellosis bovine. Bull Mens Soc Vet Prat Fr, 68, 507-520.
19. Pouillot R., Garin- Bastuji B., Gerbier G., Coche Y., Cau C., Dufour B et al (1997): The brucellin skin test as a tool to discriminate false positive serological reactions in bovine brucellosis Vet.Res.28 (4), 365-374.
20. Ray W.C., Brown R.R., Stringfellow D.A., Schnurrenberger P.R., Scanlan C.M., Swann A.I. (1988): Bovine brucellosis: an investigation of latency in progeny of culture-positive cows. J. Am. Vet. Med. Assoc., 192, 182-186
21. Rose J, E., Lambert G., and Roepke M. H. (1964): Ultra-centrifugation and heat. Inactivation studies on serogglutinins of pregnant heifers artificially infected with virulent *Brucella abortus*, Am. J. Vet. Res., 25, 329.
22. Seagerman C., Vo T.K., De Waele L., Glison, D., Bastin A., Dubray G., Flanagan P., Limet J.N., Ietesson J.J and Godfroid, J. (1999): Diagnosis of Bovine Brucellosis by Skin Test: Conditions for the test and evaluation of its performance. The Veterinary Record, 145: pp 214 – 218.
23. Soper F. E., Muscoplat C. C., and Johnson D. W. (1978): In vitro stimulation of bovine peripheral blood lymphocytes: analysis of variation of lymphocyte blastogenic response in normal dairy cattle, Am. J. Vet. Res., 39, 1039.

Rad primljen: 05.06.2018.

Rad prihvaćen: 31.10.2018.