

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΙΑΤΡΙΚΟ ΤΜΗΜΑ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΥΓΙΕΙΝΗΣ ΚΑΙ ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑΣ

Διευθυντής: Επίκουρος Καθηγητής Χ. Χατζηχριστοδούλου

ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΟΡΟΛΟΓΙΚΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ
ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΑΣ ΠΟΛΩΣΗΣ ΤΟΥ ΦΩΤΟΣ
(FLUORESCENCE POLARIZATION ASSAY- FPA)
ΣΤΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ
ΤΗΣ ΒΡΟΥΚΕΛΛΩΣΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ

Αθανάσιος Π. Κωνσταντινίδης
Κτηνίατρος

Διδακτορική Διατριβή που υποβλήθηκε στο Ιατρικό Τμήμα
του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Λάρισα 2007

Στη Στέλλα

Στον Παντελή – Στέφανο

Στον πατέρα μου

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Ιατρικό Τμήμα του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα (Νόμος 5343, άρθρο 202, παράγραφος 2).

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Επιβλέπων: Χ. Χατζηχριστοδούλου, Επίκ. Καθηγητής Παν/μίου Θεσσαλίας

Μέλη: Α. Μανιάτης, Καθηγητής Παν/μίου Θεσσαλίας

Ν. Σταθάκης, Καθηγητής Παν/μίου Θεσσαλίας

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή

Α. Γερμενής, Καθηγητής Παν/μίου Θεσσαλίας

Κ. Γουργουλιάνης, Καθηγητής Παν/μίου Θεσσαλίας

Α. Μανιάτης, Καθηγητής Παν/μίου Θεσσαλίας

Ν. Σακελλαρίδης, Καθηγητής Παν/μίου Θεσσαλίας

Ν. Σταθάκης, Καθηγητής Παν/μίου Θεσσαλίας

Γ. Χατζηγεωργίου, Επίκουρος Καθηγητής Παν/μίου Θεσσαλίας

Χ. Χατζηχριστοδούλου, Επίκουρος Καθηγητής Παν/μίου Θεσσαλίας

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	5
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	10
ΕΙΣΑΓΩΓΗ – ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	11
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	14
1. ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ	15
2. ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ	17
2.1 Περιγραφή του γένους	17
- Μορφολογία	17
- Είδη του γένους	17
- Αντιγονική σύσταση	19
- Αντιγόνα επιφανείας	19
- Ενδοκυτταρικά αντιγόνα	21
- In vivo αντιγόνα	21
- Συνθήκες ανάπτυξης και μορφολογία αποικιών	21
- Καλλιεργητικά υποστρώματα	22
- Βασικά θρεπτικά υποστρώματα	23
- Ειδικά θρεπτικά υποστρώματα	24
- Υποστρώματα χρωστικών για αναστολή ανάπτυξης	26
2.2 Ταυτοποίηση της <i>Brucella spp</i>	26
- Χρώση	26
- Συγκόλληση με πολυδύναμο αντιορό	26
- Συγκόλληση με μονοδύναμους αντιορούς	26
- Βιοχημικές δοκιμές	27
- Ανάπτυξη σε υποστρώματα βασικών χρωστικών	31
- Λύση από φάγους	32
- Μέθοδοι διαφοροποίησης της φάσης των αποικιών	33
2.3 Ευαισθησία σε φυσικούς και χημικούς παράγοντες	34
2.4 Ευαισθησία στα αντιβιοτικά	36
3. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ	37
3.1 Η βρουκέλλωση παγκοσμίως	38
3.2 Η βρουκέλλωση στην Ελλάδα	42
3.3 Η νόσος στον άνθρωπο	46
- Μολυσματική δόση	46
- Τρόποι μετάδοσης της νόσου	46
- Μετάδοση από το πεπτικό σύστημα	46
- Μετάδοση από το αναπνευστικό σύστημα	47
- Μετάδοση με άμεση επαφή (δέρμα, βλεννογόνοι)	47

- Μετάδοση από μεταμόσχευση μυελού των οστών ή μετάγγιση αίματος	47
- Κάθετη μετάδοση	48
- Οριζόντια μετάδοση	48
- Άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν την μετάδοση της νόσου ..	48
- Πρόληψη της νόσου	49
- Αποφυγή της έκθεσης του ανθρώπου στην βρουκέλλωση	49
4. ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ	53
4.1 Χρόνος επώασης	53
4.2 Κλινική εικόνα	53
- Κλινικές εκδηλώσεις από τα διάφορα συστήματα	54
- Σπάνιες κλινικές εκδηλώσεις	55
- Συμπτώματα – Συχνότητα εμφάνισης τους	55
- Κλινικές μορφές και εργαστηριακός έλεγχος	57
4.3 Διάγνωση	57
4.4 Θεραπευτική αγωγή	60
- Θεραπεία της μη επιπλεγμένης βρουκέλλωσης στους ενήλικες και σε παιδιά μεγαλύτερα των 8 ετών	60
- Κύρια εναλλακτική θεραπεία	61
- Δευτερεύουσα εναλλακτική θεραπεία	61
- Προτεινόμενα θεραπευτικά σχήματα από τον Π.Ο.Υ.	62
- Θεραπεία των επιπλεγμένων μορφών βρουκέλλωσης	63
- Θεραπεία κατά την διάρκεια της εγκυμοσύνης	63
- Θεραπεία σε παιδιά μικρότερα των 8 ετών	63
- Προληπτική θεραπευτική αγωγή μετά από έκθεση στον παθογόνο παράγοντα	64
4.5 Παράγοντες κινδύνου για την υποτροπή της νόσου	64
5. ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ	65
5.1 Κυτταρική ανοσία	65
5.2 Χυμική ανοσία	66
5.3 Εργαστηριακή διάγνωση της βρουκέλλωσης στον άνθρωπο	67
- Τεχνικές απ' ευθείας ανίχνευσης και ταυτοποίησης του βακτηρίου	67
- Καλλιέργεια και απομόνωση	67
- Τεχνικές μοριακής βιολογίας	68
- Ορολογικές δοκιμές ανίχνευσης των ειδικών έναντι της βρουκέλλας αντισωμάτων	69
- Συγκολλητινοαντιδράσεις	70

	- Βραδεία οροσυγκόλληση σε σωληνάρια	70
	- Μέθοδος Ερυθρού της Βεγγάλης	70
	- Coomb's Test	70
	- Δοκιμή σύνδεσης του συμπληρώματος	71
	- Βασικές δεσμευτικές ορολογικές μέθοδοι	71
	- Ανοσοενζυμική μέθοδος – ELISA	71
	- Ανοσοφθορισμός	72
	- Ραδιοανοσολογική μέθοδος – RIA	72
	- Μέθοδος της φθορίζουσας πόλωσης του φωτός	72
	- Αντιδράσεις ανοσοκαθίζησης	72
	- Ενδοδερμική δοκιμασία	74
5.4	Εργαστηριακή διάγνωση της βρουκέλλωσης στα ζώα	75
	- Τεχνικές απ' ευθείας ανίχνευσης και ταυτοποίησης του βακτηρίου	75
	- Ορολογικές δοκιμές ανίχνευσης των ειδικών έναντι της βρουκέλλας αντισωμάτων	75
	- Συγκολλητινοαντιδράσεις	75
	- Βασικές δεσμευτικές ορολογικοί μέθοδοι	75
	- Αντιδράσεις ανοσοκαθίζησης	75
	ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	76
1.	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	77
1.1	Επιλογή των συμμετεχόντων στην μελέτη	77
	- Κριτήρια επιλογής συμμετεχόντων	77
	- Ομάδες συμμετεχόντων	78
1.2	Συλλογή δειγμάτων αίματος	80
	- Προέλευση των δειγμάτων	80
	- Αιμοληψία – Χειρισμός των δειγμάτων αίματος	80
1.3	Εκτέλεση του πειραματικού μέρους	80
	- Ορολογικές μέθοδοι	81
	- Βραδεία οροσυγκόλληση σε σωληνάρια	81
	- Μέθοδος Ερυθρού της Βεγγάλης	83
	- Ανοσοενζυμική μέθοδος ELISA	84
	- ELISA IgG	85
	- ELISA IgM	86
	- Μέθοδος της φθορίζουσας πόλωσης του φωτός	88
1.4	Μετρήσεις – Στατιστική ανάλυση	93
2.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	96
2.1	Εξετασθέντα δείγματα	96

2.2	Αξιολόγηση της FPA και σύγκριση με τις άλλες μεθόδους	97
	- Αξιολόγηση σε θετικούς στην βρουκέλλωση ασθενείς και αρνητικούς στην βρουκέλλωση μάρτυρες – Ομάδες A και M	97
	- Αξιολόγηση σε ύποπτους ασθενείς με δύο τουλάχιστον μεθόδους θετικές και αρνητικούς στην βρουκέλλωση μάρτυρες – Ομάδες B και M	100
	- Εκτίμηση της κάθε μεθόδου χωριστά	100
	- FPA	100
	- RBT	103
	- SAT	105
	- ELISA IgM	107
	- ELISA IgG	109
	- ELISA (IgM ή/και IgG).....	111
	- Σύγκριση των μεθόδων μεταξύ τους	113
	- Σύγκριση των AUC	114
	- Συμφωνία αποτελεσμάτων	116
	- Αξιολόγηση σε ύποπτους ασθενείς με μία τουλάχιστον μέθοδο θετική και αρνητικούς στην βρουκέλλωση μάρτυρες – Ομάδες Γ και M	117
	- Εκτίμηση της κάθε μεθόδου χωριστά	117
	- FPA	117
	- RBT	121
	- SAT	123
	- ELISA IgM	125
	- ELISA IgG	127
	- ELISA (IgM ή/και IgG).....	129
	- Σύγκριση των μεθόδων μεταξύ τους	131
	- Σύγκριση των AUC	132
	- Συμφωνία αποτελεσμάτων	134
3.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ	137
3.1	Γενικά	137
3.2	Αξιολόγηση των αποτελεσμάτων	139
3.3	Σύγκριση της εφαρμογής της FPA στον άνθρωπο και τα ζώα	145
	- Διαφορά στην τιμή cut-off	145
	- Διαφορά στην ευαισθησία της FPA	146
	- Διαφορά στην ειδικότητα της FPA	147

3.4	Σύγκριση της εφαρμογής της FPA στην παρούσα μελέτη και στην προϋπάρχουσα της Lucero N et al	148
	- Διαφορά στην τιμή cut-off	148
	- Διαφορά στην ευαισθησία της FPA	151
	- Διαφορά στην ειδικότητα της FPA	151
3.5	Σύγκριση όλων των ορολογικών μεθόδων μεταξύ τους	152
	- Ομάδα Α	152
	- Ομάδα Β	153
	- Ευαισθησία και ειδικότητα	153
	- Περιοχή κάτω από την καμπύλη	154
	- Συμφωνία αποτελεσμάτων – Τιμή Κ	154
	- Ομάδα Γ	155
	- Ευαισθησία και ειδικότητα	155
	- Περιοχή κάτω από την καμπύλη	157
	- Συμφωνία αποτελεσμάτων – Τιμή Κ	157
3.6	Συμπεράσματα επί του συνόλου των αποτελεσμάτων	158
3.7	Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα της μεθόδου FPA	159
3.8	Μελλοντικά πεδία έρευνας της μεθόδου FPA	160
	ΤΕΛΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	163
	ΠΕΡΙΛΗΨΗ	164
	ABSTRACT.....	169
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	173

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Για την εκπόνηση και ολοκλήρωση της παρούσας διδακτορικής διατριβής υπήρξε πολύτιμη βοήθεια και συνεισφορά από πολλούς, προς τους οποίους εκφράζω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες.

Προς το δάσκαλο μου, Επίκουρο Καθηγητή κ. Χ. Χατζηχριστοδούλου, εκφράζω την βαθιά μου ευγνωμοσύνη για την εμπνευσμένη καθοδήγηση και τη συνεχή και συνεπή υποστήριξη του καθ' όλη τη διάρκεια της μελέτης, καθώς και για τις παρατηρήσεις και ουσιαστικές υποδείξεις του στη διαμόρφωση του τελικού κειμένου.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες εκφράζω προς τα μέλη της τριμελούς επιτροπής Καθηγητές κ.κ. Α. Μανιάτη και Ν. Σταθάκη για την πολύτιμη βοήθεια και συμβολή τους στην ολοκλήρωση της παρούσας μελέτης.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ εκφράζω προς τον συνάδελφο, Επίκουρο Καθηγητή ΤΕΙ Λάρισας, κ. Α. Μηνά για την αμέριστη συμπαράσταση και βοήθεια που μου παρείχε σε όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της παρούσας διατριβής.

Προς το Λέκτορα κ. Σ. Πουρνάρα εκφράζω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες για την πολύτιμη βοήθεια του στην εκτέλεση του πειραματικού μέρους.

Την κ. Α. Κανσουζίδου, Δ/ντρια του Μικροβιολογικού Εργαστηρίου του Νοσοκομείου Ειδικών Παθήσεων Θεσ/νίκης, ευγνωμονώ βαθιά για τη βοήθεια της στη συλλογή μέρους των δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στο πειραματικό μέρος της μελέτης.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες εκφράζω προς τον Δρ. Β. Δανηλίδη για τις πολύτιμες παρατηρήσεις του στη διαμόρφωση του τελικού κειμένου.

Προς τα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς επιτροπής Καθηγητές κ.κ. Α. Γερμενή, Κ. Γουργουλιάνη, Ν. Σακελλαρίδη και Επίκουρο Καθηγητή κ. Γ. Χατζηγεωργίου, εκφράζω τις ευχαριστίες μου για τις ουσιαστικές τους υποδείξεις.

Τη φιλόλογο κ. Β. Τσέτσου ευχαριστώ θερμά για τη γλωσσική επιμέλεια του τελικού κειμένου.

Ευχαριστώ επίσης το προσωπικό του Κτηνιατρικού Εργαστηρίου Λάρισας και του Μικροβιολογικού και Ανοσολογικού Εργαστηρίου της Ιατρικής Σχολής για τη βοήθεια τους κατά την εκτέλεση του πειραματικού μέρους.

Με το αποτέλεσμα της παρούσας διατριβής εύχομαι να δικαιώσω τη σύζυγο μου Στέλλα Ράλλη για τη συνεχή παρότρυνσή της, την αμέριστη ηθική συμπαράστασή της και τη γεμάτη κατανόηση στάση της όλα αυτά τα χρόνια. Για το γιο μου Παντελή – Στέφανο ελπίζω πως η προσπάθεια αυτή θα αποτελέσει ένα μικρό κίνητρο για τη δική του ζωή. Του την αφιερώνω.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ – ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Η βρουκέλλωση είναι μια κλασική και πολύ σημαντική ζωνόσος, η οποία, παρά το γεγονός ότι είναι γνωστή εδώ και πολλά χρόνια, εξακολουθεί να αποτελεί μεγάλο πρόβλημα όχι μόνο για τις αναπτυσσόμενες χώρες, αλλά και για εκείνες με προηγμένη κτηνοτροφία.

Ως νόσος που προσβάλλει πρωταρχικά πολλά είδη παραγωγικών ζώων (αιγοπρόβατα, βοοειδή, χοίρος), αλλά και ζώα αναψυχής (σκύλος), εμφανίζει παγκόσμια εξάπλωση και πολύ λίγες είναι εκείνες οι γεωγραφικές περιοχές του πλανήτη ή τα κράτη που θεωρούνται απαλλαγμένα από τη βρουκέλλωση. Αντίθετα, σε πολλές χώρες (μεσογειακές χώρες, χώρες Μέσης Ανατολής, χώρες Λατινικής Αμερικής, Κίνα κ) η συχνότητα της νόσου στον ζωικό πληθυσμό είναι μεγάλη, και συνεπώς η εμφάνισή της στον άνθρωπο πολύ συχνή.

Στην Ελλάδα τη δεκαετία 1979-1988 δηλώθηκαν στις υπηρεσίες του Υπουργείου Υγείας 5.958 κρούσματα σε ανθρώπους, από τα οποία τα περισσότερα, καταγράφηκαν σε γεωργοκτηνοτροφικές περιοχές (Χατζηχριστοδούλου 1997).

Η βρουκέλλωση θεωρείται νόσημα με τεράστιο κοινωνικό-οικονομικό κόστος για περισσότερες από 120 χώρες συμπεριλαμβανομένων και των μεσογειακών χωρών (Joint FAO/WHO 1986, MZCC/WHO 1992). Κόστος που προέρχεται κατ' αρχάς από τη μεγάλη μείωση της παραγωγής των προσβεβλημένων ζώων (αποβολές, ελάττωση της παραγωγής του γάλακτος και του κρέατος), αλλά και από την υψηλή νοσηρότητα στον άνθρωπο που έχει ως αποτέλεσμα μεγάλο αριθμό χαμένων εργατωρών και υψηλό κόστος νοσηλείων και θεραπευτικής αγωγής, ενώ σε μερικές περιπτώσεις μπορεί να οδηγήσει σε μόνιμες βλάβες ή/και θάνατο (παραμελημένα ή αδιάγνωστα-αθεράπευτα περιστατικά).

Είναι νόσος που απασχολεί σε παγκόσμιο επίπεδο τις Κτηνιατρικές και Υγειονομικές Αρχές. Ο έλεγχός της θα πρέπει να βασίζεται στη σωστή και στενή συνεργασία όλων των εμπλεκόμενων φορέων και υπηρεσιών, όχι μόνο σε τοπικό-εθνικό επίπεδο, αλλά σε διακρατικό μέσω των παγκόσμιων οργανισμών και φορέων υγείας.

Η εξάλειψή της στα ζώα, και κατ' επέκταση η μείωση των περιστατικών στον άνθρωπο, είναι πολύ δύσκολη και απαιτεί τη σχολαστική εφαρμογή όλων των προτεινόμενων ή επιλεγμένων προγραμμάτων ελέγχου, τα οποία με τη σειρά τους απαιτούν εξειδικευμένο προσωπικό και υλικοτεχνική υποδομή με υψηλό κόστος. Κατά συνέπεια, η σωστή εφαρμογή τους θα πρέπει να αποτελεί κεντρική πολιτική επιλογή των εκάστοτε προϊσταμένων αρχών.

Τα κλινικά σημεία και συμπτώματα της βρουκέλλωσης συνήθως είναι έντονα, αλλά εύκολα συγχέονται με εκείνα πλήθους άλλων παθολογικών καταστάσεων. Επομένως η σωστή διάγνωση της νόσου βασίζεται κατά ένα πολύ μεγάλο μέρος στη συνδρομή του εργαστηρίου. Η απομόνωση του βακτηρίου μετά από καλλιέργειες παθολογικού υλικού (αίμα, μυελός των οστών κλπ), είναι η μόνη μέθοδος για την ασφαλή και οριστική διάγνωση της νόσου. Από τη στιγμή όμως που τα ποσοστά ευαισθησίας της μεθόδου (70 % στην οξεία και < 5% στην χρόνια μορφή), είναι χαμηλά και η καλλιέργεια και απομόνωση του βακτηρίου εγκυμονεί κινδύνους για το προσωπικό του εργαστηρίου, η διάγνωση της νόσου βασίζεται κυρίως στην εφαρμογή ορολογικών μεθόδων.

Η μη ειδική κλινική εικόνα της βρουκέλλωσης και η φύση του αιτιολογικού παράγοντα (*Brucella* spp.), καθιστούν τη διάγνωσή της ακόμη και σήμερα μια πρόκληση. Η βελτίωση και απλούστευση των υπάρχοντων εργαστηριακών μεθόδων και η ανάπτυξη, αξιολόγηση και εφαρμογή νέων, μπορούν να διευρύνουν το πεδίο της εργαστηριακής διάγνωσης της νόσου. Για το λόγο αυτό, μια εύκολα εφαρμόσιμη, γρήγορη, με χαμηλό κόστος και μεγάλη αξιοπιστία, ορολογική μέθοδος, θα προσέφερε τα μέγιστα στην εργαστηριακή διάγνωση της νόσου.

Ένας μεγάλος αριθμός ορολογικών μεθόδων έχει εφαρμοστεί για τη διάγνωση της βρουκέλλωσης από το 1897, που οι Wright και Smith περιέγραψαν την πρώτη εργαστηριακή μέθοδο διάγνωσης της νόσου. Αυτές που μέχρι σήμερα χρησιμοποιούνται ευρέως στην πράξη είναι οι εξής:

1. Η μέθοδος της βραδείας οροσυγκόλλησης σε σωληνάρια (Serum Agglutination Test – SAT, Μέθοδος Wright)

Η βραδεία οροσυγκόλληση σε σωληνάρια είναι η πρώτη μέθοδος που εφαρμόστηκε για την ορολογική διάγνωση της βρουκέλλωσης. Επιπλέον παραμένει ακόμη και σήμερα το χρυσό πρότυπο, με το οποίο συγκρίνονται όλες οι άλλες μέθοδοι και χρησιμοποιείται παγκοσμίως από το σύνολο σχεδόν των νοσοκομείων και των ιδιωτικών μικροβιολογικών εργαστηρίων. Είναι μια μέθοδος με αρκετά υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα, ιδίως στην οξεία μορφή της νόσου, το κόστος της δεν είναι υψηλό, δεν απαιτεί ιδιαίτερο εξοπλισμό ούτε και εξειδικευμένο προσωπικό.

2. Η μέθοδος του Ερυθρού της Βεγγάλης (Rose Bengal Test – RBT)

Η μέθοδος Rose Bengal έχει υψηλή ευαισθησία, πολύ χαμηλό κόστος, είναι ταχύτατη, δεν απαιτεί εξειδικευμένο προσωπικό και χρησιμοποιείται ευρέως είτε ως ορολογική μέθοδος διαλογής (screening test) ιδιαίτερα στις περιοχές που η νόσος ενδημεί, είτε ως αρχική μέθοδος διάγνωσης των ύποπτων περιστατικών.

3. Ανοσοενζυμική μέθοδος (Enzyme linked Immunosorbent Assay – ELISA)

Η ειδική - έναντι των IgM και IgG βρουκελλικών αντισωμάτων - ανοσοενζυμική μέθοδος είναι η μέθοδος που αναφέρεται στη διεθνή βιβλιογραφία ότι έχει την υψηλότερη ευαισθησία και ειδικότητα. Χρησιμοποιείται παγκοσμίως σε οργανωμένα εργαστήρια για τη διάγνωση τόσο της οξείας και της χρόνιας, όσο και των εντοπισμένων μορφών της νόσου. Είναι επίσης μέθοδος ταχεία και χωρίς ιδιαίτερα υψηλό κόστος.

Η ορολογική μέθοδος της **φθορίζουσας πόλωσης του φωτός (FPA – Fluorescence Polarization Assay)** εφαρμόζεται εδώ και λίγα χρόνια στη διάγνωση της βρουκέλλωσης των ζώων. Είναι μια μέθοδος με υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα, πολύ εύκολη στην εκτέλεσή της, γρήγορη στη λήψη των αποτελεσμάτων, με χαμηλό κόστος, θεωρείται μέθοδος μη ειδική του είδους (multi-species assay), ανήκει στην κατηγορία των ομοιογενών μεθόδων και δεν απαιτεί εξειδικευμένο προσωπικό ή εργαστήριο.

Για το λόγο αυτό, αποφασίστηκε η εκπόνηση της συγκεκριμένης διατριβής με θέμα: «Αξιολόγηση της ορολογικής μεθόδου FPA στη διάγνωση της βρουκέλλωσης του ανθρώπου» που:

- (α) Θα αξιολογήσει την μέθοδο της φθορίζουσας πόλωσης του φωτός (Fluorescence Polarization Assay - FPA),
- (β) Θα συγκρίνει τη μέθοδο FPA με τις τρεις πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες, αξιολογημένες ορολογικές μεθόδους, τις SAT, RBT και ELISA (IgM και IgG).

Η παρούσα μελέτη χωρίζεται σε δύο μέρη. Στο **γενικό μέρος** γίνεται μια εκτεταμένη αναφορά: (α) στα μικροβιολογικά δεδομένα της βρουκέλλας, (β) στην επιδημιολογία της νόσου τόσο στην Ελλάδα, όσο και παγκοσμίως, (γ) στην παθοφυσιολογία της νόσου (κλινική εικόνα, διάγνωση, θεραπευτική αντιμετώπιση) και (δ) στα ανοσολογικά δεδομένα της νόσου με ιδιαίτερη έμφαση στην εργαστηριακή διάγνωση της βρουκέλλωσης. Το **ειδικό μέρος** αποτελεί την παρουσίαση της δικής μας έρευνας και περιλαμβάνει: (α) τα υλικά και μεθόδους, (β) την παρουσίαση όλων των αποτελεσμάτων (αξιολόγηση της μεθόδου FPA και σύγκριση της με όλες τις άλλες ορολογικές μεθόδους) και (γ) τη συζήτηση των αποτελεσμάτων με βάση τα δεδομένα της διεθνούς βιβλιογραφίας και τα συμπεράσματα της μελέτης.

Με δεδομένο ότι η εμπειρία από την εφαρμογή της FPA στον άνθρωπο είναι πάρα πολύ μικρή και μόνο μια μελέτη έχει πραγματοποιηθεί παγκοσμίως πριν από τη δική μας, μας κάνει να ελπίζουμε ότι η παρούσα διατριβή θα αποτελέσει για οποιονδήποτε ερευνητή, ένα μικρό εφόδιο στην παραπέρα διερεύνηση της FPA στην εργαστηριακή διάγνωση της βρουκέλλωσης του ανθρώπου.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ

1799 : Η Μεγάλη Βρετανία καταλαμβάνει τη Μάλτα και τη χρησιμοποιεί ως ναυτική βάση. Η βρουκέλλωση αρχίζει να απασχολεί έντονα τις υγειονομικές αρχές της Μεγάλης Βρετανίας και τον ιατρικό κόσμο, γιατί καθημερινά αναφέρονται κρούσματα και θάνατοι στους στρατιώτες από άγνωστη νόσο, η οποία αρχίζει να αναφέρεται βιβλιογραφικά ως «Πυρετός της Μάλτας» και αργότερα ως «Πυρετός της Νάπολης», «Πυρετός της Κύπρου», «Πυρετός του Γιβραλτάρ» και τέλος ως «Μελιταίος πυρετός» (Bruce D. 1889).

1857 : Ο Δανός κτηνίατρος Fredrik Bang ανακαλύπτει έναν ενδοκυττάριο μικροοργανισμό που προκαλούσε αποβολές στις αγελάδες, και τον ονομάζει «*Bacillus abortus*», ενώ το νόσημα ονομάζεται «νόσος του Bang», χωρίς όμως να συνδέεται με τον «πυρετό της Μάλτας» (Bang B. 1897, Bang B. 1906).

1861 : Ο Marston, βοηθός χειρουργός του βρετανικού στρατού στη Μάλτα, δίνει πρώτος μια ακριβή περιγραφή της νόσου στον άνθρωπο, χωρίς όμως να έχει καθορίσει τον αιτιολογικό παράγοντά της (Marston J.L.A. 1861).

1883 : Ο Βρετανός γιατρός David Bruce διορίζεται στο νοσοκομείο της ναυτικής βάσης της Μάλτας.

1887 : Ο Bruce διενεργεί νεκροτομή σε στρατιώτη που πέθανε από τον «πυρετό της Μάλτας» και στη μικροσκοπική εξέταση επιχρίσματος από το σπλήνα, «αναγνωρίζει» τον αιτιολογικό παράγοντα και τον ονομάζει «*Micrococcus melitensis*» (Bruce D. 1887). Την ίδια χρονιά η γιατρός Carruana Secluna καλλιεργεί τον ίδιο μικροοργανισμό από αίμα που πήρε από πάσχοντες (Bruce D. 1887, Bruce D. 1889).

1897 : Οι Wright και Smith για πρώτη φορά εφαρμόζουν ορολογική μέθοδο, με την οποία μπορεί να διαγνωστεί το νόσημα (Wright A.E. & Semple D. 1897, Wright A.E. & Smith F. 1897).

1905 : Ο γιατρός Themistokles Zammit μετά από επιδημιολογικές έρευνες καταλήγει στο συμπέρασμα ότι οι αίγες αποτελούν την πηγή μόλυνσης για τους ανθρώπους, μέσω του γάλακτος και των γαλακτοκομικών προϊόντων (Zammit T. 1905).

1914 : Ο Mohler J.R. από τις Η.Π.Α. καλλιεργεί από το ήπαρ και τους νεφρούς χοιριδίων, ένα μικροοργανισμό παρόμοιο με τον *Bacillus abortus* (Mohler J.R. 1913-1914).

1918 : Η αμερικανίδα μικροβιολόγος Alice Evans ανακαλύπτει τη σχέση μεταξύ του *Bacillus abortus* και του *Micrococcus melitensis* και προτείνει για τη νόσο την ονομασία «Βρουκέλλωση» προς τιμήν του David Bruce (Evans A.C. 1918).

- 1927** : Η Alice Evans περιγράφει το πρώτο περιστατικό βρουκέλλωσης από *B. suis*. (Evans A.C. 1927).
- 1953** : Οι Buddle και Boyes απομονώνουν την *B. onis* από κριούς που εμφάνιζαν στειρότητα (Buddle M.B. & Boyes B.W. 1953).
- 1957** : Οι Stoenner και Lackman απομονώνουν από ποντίκια την *B. Neotomae* (Stoener H.G. & Lackman D.B. 1957).
- 1966** : Ο Αμερικανός κτηνίατρος Charmickael απομονώνει την *B. Canis* από σκύλους που εμφάνισαν αποβολές (Carmichael L.E. 1966).
- 1968** : Γίνεται από το CDC η πρώτη αναφορά κρούσματος βρουκέλλωσης από *B. canis* σε εργαζόμενο που ερχόταν σε επαφή με καλλιέργειες του μικροοργανισμού (Χατζηχριστοδούλου Χ. 1997).
- 1994** : Απομονώνεται η *B. Maris* από θαλάσσια θηλαστικά και αναφέρεται, χωρίς να δημοσιευθεί, το πρώτο ανθρώπινο κρούσμα που οφείλεται σ' αυτό το είδος βρουκέλλας (Jahans K.L. et al 1997).

2. ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ

Οι βρουκέλλες αποτελούν μια ομοιογενή ομάδα βακτηρίων, που δε μοιάζει φαινοτυπικά ή γονοτυπικά με καμιά άλλη ομάδα ή γένος, δεν ανήκουν σε καμία Οικογένεια και ταξινομούνται χωριστά, χωρίς να εμφανίζουν γνωστές συγγένειες με άλλα είδη βακτηρίων. Μπορεί να υπάρχουν ομοιότητες στην αλληλουχία νουκλεοτιδίων σε μερικές θέσεις DNA με άλλα είδη, και στο γεγονός αυτό οφείλονται οι διασταυρούμενες ορολογικές δοκιμές που παρατηρούνται (Αρσένη Α. 1994).

Μελέτες μοριακής βιολογίας έχουν αποδείξει ότι πρόκειται για ένα μοναδικό είδος, το οποίο διαφοροποιείται σε έναν αριθμό βιοτύπων με διαφορετικό ξενιστή ο κάθε ένας. Για λόγους όμως ευκολίας έχει επικρατήσει οι βιότυποι αυτοί να εξετάζονται ως διαφορετικά είδη του ίδιου γένους, ανάλογα με τον ξενιστή στον οποίο συναντώνται (De Ley J. et al 1987, Verger J.M. et al 1985, Hoyer B.H. & Mc Cullough N.B. 1968a, Hoyer B.H. & Mc Cullough N.B. 1968b).

2.1 Περιγραφή του γένους

2.1.1 Μορφολογία

Οι βρουκέλλες εμφανίζονται με τη μορφή κοκκοβακίλλων ή μικρών βακτηρίων μεγέθους 0,5-0,7 μm X 0,6-1,5 μm, είναι ακίνητες, μη σπορογόνες, δε φέρουν έλυτρο και διατάσσονται μονήρεις, σε ζεύγη ή σε μικρές αλυσίδες (Moyer N.R. & Holcomb L.A. 1995, Corbel J. 1998). Αρκετές φορές όμως μπορεί να εμφανίζονται με τη μορφή κόκκων ή/και βακίλλων (Corbel J. 1998, Παπαπαναγιώτου Ι.Κ. & Κυριαζοπούλου-Δαλαΐνα Β. 2001).

2.1.2 Είδη του γένους

Το γένος *Brucella* περιλαμβάνει τα πιο κάτω είδη:

Brucella melitensis: προσβάλλει κατά κύριο λόγο τα αιγοπρόβατα. Διακρίνονται τρεις βιότυποι:

Βιότυποι	Στέλεχος αναφοράς
1	<i>B. melitensis</i> 16M
2	<i>B. melitensis</i> 63/9
3	<i>B. melitensis</i> Ether

Brucella abortus : προσβάλλει κυρίως τα βοοειδή. Διακρίνονται εννέα βιότυποι:

Βιότυποι	Στέλεχος αναφοράς
1	B. abortus 544
2	B. abortus 86/8/59
3	B. abortus Tulya
4	B. abortus 292
5	B. abortus b3196
6	B. abortus 870
9	Brus C68

Οι βιότυποι 7 και 8 της *Brucella abortus* θεωρούνται πλέον άνευ σημασίας και γι' αυτό δεν εξετάζονται στα περισσότερα σύγχρονα συγγράμματα (Corbel J. 1998).

Brucella suis : προσβάλλει κυρίως τον χοίρο. Διακρίνονται πέντε βιότυποι:

Βιότυποι	Στέλεχος αναφοράς
1	B. suis 1330
2	B. suis Thomsen
3	B. suis 686
4	B. suis 40
5	B. suis 514

Brucella canis : προσβάλλει κυρίως τον σκύλο. Δεν διακρίνονται βιότυποι.

Βιότυποι	Στέλεχος αναφοράς
-	B. canis RM6/66

Brucella onis : προσβάλλει κυρίως τον κριό. Δεν διακρίνονται βιότυποι.

Βιότυποι	Στέλεχος αναφοράς
-	B. onis 63/290

Brucella neotomae : προσβάλλει κυρίως τους επίμυες της ερήμου των Δυτικών Η.Π.Α. Δεν διακρίνεται σε βιότυπους.

Βιότυποι	Στέλεχος αναφοράς
-	B. neotomae 5K33

Brucella maris: προσβάλλει κυρίως θαλάσσια θηλαστικά (δελφίνια, φάλαινες, φώκιες, θαλάσσιους ελέφαντες κλπ), απομονώθηκε τη δεκαετία του 1990 και με βάση τις μέχρι τώρα μελέτες θεωρείται ότι υπάρχουν αρκετοί βιότυποι που έχουν σχέση με

το είδος του θηλαστικού που προσβάλλουν. Μέχρι τώρα έχουν διακριθεί δύο βιότυποι:

Βιότυποι	Στέλεχος αναφοράς
1	B. maris 2/94
2	B. maris ? (NCTC 12891)

(Carter G.R. 1979, Corbel M.J. et al 1983, Jahans K.L. et al. 1997, Corbel M.J. 1998).

Στον Πίνακα 1 αναφέρονται όλα τα είδη του γένους *Brucella* και οι φυσικοί ξενιστές τους.

Πίνακας 1: Είδη του γένους και φυσικοί ξενιστές (Παπαπαναγιώτου Ι.Κ.& Κυριαζοπούλου-Δαλαΐνα Β. 2001, Αντωνιάδου Α. 2002).

Είδη βρουκέλλας	Φυσικοί ξενιστές	Άλλα ζώα που προσβάλλονται
<i>Brucella melitensis</i>	Αιγοπρόβατα	Βοοειδή, Καμήλα
<i>Brucella abortus</i>	Βοοειδή	Βουβάλι, Βίσων, Τσακάλι, Ύαινα
<i>Brucella suis</i>	Χοίρος	Λύκος, Αλεπού, Λαγός, Τάρανδος
<i>Brucella canis</i>	Σκύλος	Κανένα
<i>Brucella onis</i>	Πρόβατο (κριός)	Κανένα
<i>Brucella neotomae</i>	Επίμυς της ερήμου (ΗΠΑ)	Κανένα
<i>Brucella maris</i>	Θαλάσσια θηλαστικά	Κανένα

2.1.3 Αντιγονική σύσταση

Τα αντιγόνα του κυττάρου της βρουκέλλας χωρίζονται σε τρεις ομάδες.

2.1.3.1 Αντιγόνα επιφανείας (Surface antigens)

LPS αντιγόνα (LPS antigens)

Η αντιγονική σύνθεση της επιφανείας του κυττάρου της βρουκέλλας ποικίλλει και εξαρτάται από τη φάση στην οποία βρίσκονται οι αποικίες της. Τα αντιγόνα επιφανείας ανιχνεύονται σε όλες τις βρουκέλλες που βρίσκονται στην S φάση, δηλαδή στην *B. abortus*, *B. melitensis* και *B. suis*. Δεν ανιχνεύονται στα είδη που βρίσκονται στην R φάση (*B. canis* και *B. onis*), αλλά και σε εκείνα της S φάσης, όταν οι αποικίες τους μεταπίπτουν στην R φάση (Παπαπαναγιώτου Ι.Κ.& Κυριαζοπούλου-Δαλαΐνα Β. 2001).

Το κύριο δομικό στοιχείο της κυτταρικής επιφανείας είναι ένα σύμπλεγμα πρωτεϊνών (40-50%), υδατανθράκων (25%) και λιπιδίων (7% εκ των οποίων: 2% είναι φωσφολιπίδια, 2,5% ουδέτερα λιπίδια και 2,5% δεσμευμένα λιπίδια), το οποίο καλείται LPS complex. Η Ο αλυσίδα του SLPS (Smooth LPS) συμπλέγματος εμφανίζει δύο διαφορετικούς επίτοπους, τον Α και τον Μ. Οι δύο αυτοί επίτοποι

βρίσκονται και στα τρία είδη βρουκέλλας S φάσης (*B. abortus*, *melitensis* και *suis*), σε διαφορετική όμως αναλογία στο κάθε είδος. Επομένως οι αντιγονικές διαφορές μεταξύ τους είναι ποσοτικές και όχι ποιοτικές. Η αναλογία σε κάθε είδος είναι :

Brucella abortus A : M = 20 : 1

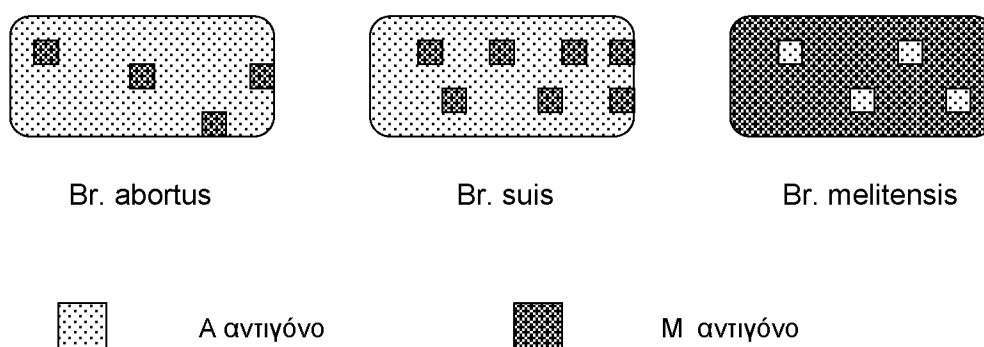
Brucella melitensis A : M = 1 : 20

Brucella suis A : M = 1 : 1

(Παπαπαναγιώτου Ι.Κ. & Κυριαζοπούλου-Δαλαΐνα Β. 2001).

Στο Σχήμα 1 φαίνεται η αναλογία των Α και Μ αντιγόνων σε κάθε είδος.

Σχήμα 1: Αναλογία Α και Μ αντιγόνων ανάλογα με το είδος (Buxton A. & Fraser G. 1977)



Λόγω της διαφορετικής αναλογίας των Α και Μ αντιγόνων το κάθε είδος συγκολλείται από τον αντίστοιχο ειδικό αντιορό. Έτσι η *B. abortus* συγκολλείται από τον ειδικό Α αντιορό, η *B. melitensis* από τον ειδικό Μ αντιορό, ενώ στην *B. suis* η συγκόλληση ποικίλλει ανάλογα με το βιότυπο.

Τα είδη που βρίσκονται στην R φάση (*B. canis* και *B. onis*) δε φέρουν τα Α και Μ αντιγόνα, αλλά ένα τρίτο, το R αντιγόνο, και έτσι συγκολλούνται μόνο από τον ειδικό R αντιορό.

Άλλα πολυσακχαριδικά αντιγόνα (Other polysaccharide antigens)

Υπάρχουν και άλλοι πολυσακχαρίτες που μοιάζουν δομικά με την Ο αλυσίδα του LPS complex και καλούνται «φυσικά αντιγόνα» ή «φυσικά απτένια» (native antigen ή native harten). Επικρατεί η άποψη ότι πρόκειται για Ο αλυσίδα που δε συνδέεται με το LPS μόριο (Moreno E. et al 1979, Moreno E. et al 1987, Cloeckaert A. & Zygmunt M.S.1992).

Αντιγόνα εξωτερικής μεμβράνης (Outer-membrane antigens)

Οι πρωτεΐνες της εξωτερικής μεμβράνης του κυττάρου της βρουκέλλας (Outer Membrane Proteins - Omp) περιλαμβάνουν τρεις ομάδες τις 1, 2 και 3. Η ομάδα 1 φέρει πρωτεΐνες με Μ.Β. 88-94 kDa, η ομάδα 2 πρωτεΐνες με Μ.Β. 36-38 kDa και η ομάδα 3 πρωτεΐνες με Μ.Β. 25-27 kDa.

Από τις τρεις παραπάνω ομάδες τη μεγαλύτερη αντιγονική σημασία φέρει η ομάδα 2 (Omp2 antigen). Για τις πρωτεΐνες αυτές επικρατεί η άποψη ότι εμπλέκονται με τη χυμική ανοσολογική απάντηση του οργανισμού (Corbel M.J. 1998).

2.1.3.2 Ενδοκυτταρικά αντιγόνα (Intracellular antigens)

Τα ενδοκυτταρικά αντιγόνα που απελευθερώνονται κατά τη ρήξη του κυττάρου της βρουκέλλας είναι κυρίως πρωτεΐνες, γλυκοπρωτεΐνες και πεππίδια, κοινά σε όλα τα είδη του γένους και ανεξάρτητα από τη φάση που βρίσκονται οι αποικίες (S ή R φάση) και από τους βιότυπους του κάθε είδους. Τα αντιγόνα αυτά χαρακτηρίζονται ως A1, A2, A3, A4, B1, B2 και C. Κάποια από αυτά σχετίζονται με την L7/L12 ριβοσωμική πρωτεΐνη που δίνει καθυστερημένη αντίδραση υπερευαισθησίας σε μολυσμένα ζώα. Επίσης, μια κυτταροπλασματική πρωτεΐνη με M.W. 18 kDa ανιχνεύεται στα ζώα και στον άνθρωπο με ενεργό λοίμωξη (Corbel M.J. 1998).

2.1.3.3 In vivo αντιγόνα (In vivo antigens)

Έχει αποδειχθεί ότι τα κύτταρα της βρουκέλλας, που αναπτύσσονται μέσα στον ξενιστή εμφανίζουν αξιοσημείωτες διαφορές σε σχέση με αυτά των καλλιεργειών. Για παράδειγμα, κύτταρα *B. abortus* που απομονώθηκαν από πλακούντα ασθενών βοοειδών εμφάνιζαν μεγαλύτερη αντοχή στην ενδοκυτταρική καταστροφή τους μέσα στα μακροφάγα, σε σχέση με τις ίδιες κυτταρικές σειρές που αναπτύχθηκαν *in vitro* (Corbel M.J. 1998). Φαίνεται ότι κατά την *in vivo* ανάπτυξη παράγεται κάποιος προστατευτικός παράγοντας που δεν παράγεται *in vitro*. Η σύσταση του προστατευτικού αυτού παράγοντα που σχετίζεται με το κυτταρικό περίβλημα, δεν έχει εξακριβωθεί ακόμη.

Η βρουκέλλα επίσης σε δυσμενείς συνθήκες περιβάλλοντος απαντά με την παραγωγή πρωτεϊνών θερμικού shock (heat shock proteins) παρόμοιων με τις GroEL και Htr πρωτεΐνες της *E.coli*.

Σε συνθήκες όξινου περιβάλλοντος συνθέτει πρωτεΐνες σχετιζόμενες με καταστάσεις stress. Σε pH 6,5 – 4,5 οι πρωτεΐνες που παράγονται έχουν σχέση με τη διατήρηση της ομοιόστασης, ενώ σε pH 3,8 έχουν σχέση με την προσπάθεια για επιβίωση σε πολύ όξινο περιβάλλον (Lin J. & Ficht T.A. 1995). Τα *in vivo* αντιγόνα που παράγονται βοηθούν στη κατανόηση των μηχανισμών επιβίωσης της βρουκέλλας μέσα στα μακροφάγα κύτταρα του ξενιστή (Corbel M.J. 1998).

2.1.4 Συνθήκες ανάπτυξης και μορφολογία αποικιών

Οι βρουκέλλες αναπτύσσονται στις συνήθεις αερόβιες συνθήκες εκτός από κάποια είδη, για την ανάπτυξη των οποίων απαιτείται παρουσία CO₂ σε συγκέντρωση 5-10% (μικροαερόφιλο περιβάλλον) (Παπαπαναγιώτου I.K. & Κυριαζοπούλου-Δαλαΐνα Β. 2001). Για την ανάπτυξή τους είναι απαραίτητη η

παρουσία διαφόρων αμινοξέων, θειαμίνης, βιοτίνης, νικοτιναμίδης, μαγνήσιου, σιδήρου και μαγγάνιου.

Η ανάπτυξη αρκετών στελεχών βελτιώνεται με την παρουσία παντοθενικού οξέος και ισοερυθριτόλης. Ειδικότερα οι *B. abortus*, *B. melitensis* και *B. suis* χρησιμοποιούν την ισοερυθριτόλη ως πηγή ενέργειας αντί της γλυκόζης. Έτσι εξηγείται και το κυριότερο σύμπτωμα της βρουκέλλωσης των αιγοπροβάτων, βοοειδών και χοίρων (που προσβάλλονται αντίστοιχα από τα πιο πάνω είδη βρουκέλλας) που είναι η αποβολή, αφού στον πλακούντα των ζώων αυτών υπάρχει υψηλή συγκέντρωση ισοερυθριτόλης κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης και οι βρουκέλλες εμφανίζουν σαφή τροπισμό προς την κυοφορούσα μήτρα στα παραπάνω είδη ζώων.

Η άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης των βρουκελλών είναι 37° C με εύρος 10-40° C, ενώ το ιδανικό pH 6,6-7,4. Οι πρώτες αποικίες διαμέτρου 1 mm εμφανίζονται μετά από επώαση 48-72 ωρών, ενώ το μέγεθος τους φθάνει τα 2-3 mm μετά από 4-5 ημέρες (Hausler W.J. et al. 1985).

Όλα τα είδη του γένους δίνουν κατά την ανάπτυξή τους αποικίες S (Smooth) φάσης, εκτός από τις *B. onis*, *B. canis* και κάποια εμβολιακά στελέχη της *B. abortus* (εμβολιακό στέλεχος RB-51), που δίνουν αποικίες R (Rough) φάσης. Στις συνθήκες ανάπτυξης στο εργαστήριο, είναι συχνή η μετάπτωση (dissociation) των S αποικιών σε αποικίες R, ενώ το αντίστροφο είναι σχετικά σπάνιο φαινόμενο. Επίσης, αρκετά συχνά εμφανίζονται αποικίες M (Mucoid) φάσης (Hausler W.J. et al. 1985).

Όσον αφορά στη μορφολογία τους, οι αποικίες S είναι στρογγυλές, διαφανείς, γυαλιστερές, υγρές, με απαλό μελί χρώμα, ενώ διαθλούν το έμμεσο φως που προσπίπτει από πλάγια. Με την πάροδο του χρόνου, το χρώμα τους γίνεται σκοτεινότερο. Οι αποικίες της R φάσης συνήθως είναι μεγαλύτερες, ξηρές, με κοκκώδη εμφάνιση, η επιφάνεια τους εμφανίζει ρωγμές, δεν είναι διαφανείς και το χρώμα τους συνήθως είναι υπόλευκο έως ελαφρά κίτρινο. Οι αποικίες M φάσης εμφανίζονται διαυγείς με ανοικτό γκρίζο χρώμα και διακρίνονται λόγω της βλεννώδους υφής τους, όταν τις αγγίζουμε με βελόνα ή κρίκο (Alton G.G. et al 1988).

2.1.5 Καλλιεργητικά υποστρώματα

Τα καλλιεργητικά υποστρώματα που χρησιμοποιούνται για την απομόνωση της βρουκέλλας από διάφορα παθολογικά υλικά ή την ανάπτυξη πρότυπων στελεχών αναφοράς ή εμβολιακών στελεχών που χρησιμοποιούνται στην πράξη διακρίνονται σε:

2.1.5.1 Βασικά θρεπτικά υποστρώματα

Serum Dextrose agar (SDA): χρησιμοποιείται κυρίως για την πραγματοποίηση ανακαλλιεργειών από ύποπτες καλλιέργειες, για την ανάπτυξη και διατήρηση εργαστηριακών στελεχών, καθώς επίσης και για την απομόνωση της βρουκέλλας από μη επιμολυσμένο παθολογικό υλικό.

Περιέχει:

- Βασικό αιματούχο άγαρ (Oxoid N° 2)
- Αδρανοποιημένο ορό ίππου
- Γλυκόζη
- Απεσταγμένο - αποστειρωμένο νερό

(Corbel M.J. et al 1983).

Glycerol Dextrose agar (GDA): χρησιμοποιείται κυρίως για την εξέταση των αποικιών, όσον αφορά στο διαχωρισμό σε S, R ή M φάση (dissociation).

Περιέχει:

- Βασικό αιματούχο άγαρ (Oxoid)
- Γλυκερόλη
- Γλυκόζη
- Απεσταγμένο - αποστειρωμένο νερό

(Corbel J. et al 1983).

Albimi Brucella broth: χρησιμοποιείται κυρίως για τον πολλαπλασιασμό των φάγων που λύουν τις βρουκέλλες, καθώς επίσης και, όταν απαιτείται, για την καλλιέργεια της βρουκέλλας υπόστρωμα που δεν περιέχει ορό.

Περιέχει:

- Albimi Brucella broth (Gibco Laboratories)
- Απεσταγμένο - αποστειρωμένο νερό

(Corbel J. et al 1983).

Tryptone soya agar, Trypticase soy agar, Tryptic soy agar (TSA): χρησιμοποιείται ως βασικό μέσο απομόνωσης των βρουκελλών από εμβολιακά στελέχη ή για ανάπτυξη και διατήρηση πρότυπων στελεχών στο εργαστήριο.

Περιέχει:

- Θρεπτικό άγαρ
- Πεπτόνη
- Χλωριούχο νάτριο (NaCl)
- Οπό βοδινού κρέατος
- Απεσταγμένο νερό

- Ορό ίππου (για την καλλιέργεια του βιότυπου 2 της *B. abortus* και της *B. onis*).

(Alton G.G. et al 1988).

Potato agar και Dehydrated potato agar: χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα επιλογής για την καλλιέργεια του εμβολιακού στελέχους 19 της *B. abortus* σε φιάλες Roux.

Περιέχει:

- Φιλτραρισμένη αλεσμένη πατάτα
- Βασικό θρεπτικό άγαρ
- Απεσταγμένο νερό
- Χλωριούχο νάτριο (NaCl)
- Πεπτόνη
- Οπό βοδινού κρέατος
- Γλυκερόλη
- Υδροξείδιο του νατρίου (NaOH).

(Alton G.G. et al 1988).

2.1.5.2 Ειδικά θρεπτικά υποστρώματα

Kuzdas και Morse agar: χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα ανάπτυξης της βρουκέλλας σε όλες τις περιπτώσεις, εκτός από πολύ επιμολυσμένα παθολογικά υλικά.

Περιέχει:

- Βασικό άγαρ
- Απεσταγμένο νερό
- Cycloheximide ως μυκητοστατικό
- Bacitracin ως αντιβιοτικό έναντι Gram θετικών βακτηρίων
- Θεική Polymyxin B ως αντιβιοτικό έναντι Gram αρνητικών βακτηρίων

(Alton G.G et al 1988).

Υπόστρωμα Farrell's ή Τροποποιημένο κατά Farrell SDA υπόστρωμα: χρησιμοποιείται ως θρεπτικό υπόστρωμα επιλογής για πολύ επιμολυσμένα υλικά.

Περιέχει:

- Serum Dextrose agar
- Bacitracin
- Cycloheximide
- Polymyxin B
- Vancomycin
- Nalidixic acid
- Nystatin

(Corbel M.J. et al 1983, Alton G.G. et al 1988).

Υγρό υπόστρωμα Brodie και Sinton's: στην ουσία πρόκειται για υγρό υπόστρωμα εμπλουτισμού που χρησιμοποιείται, όταν γίνεται προσπάθεια για την απομόνωση της βρουκέλλας από επιμολυσμένα υλικά. Αφού το δείγμα – υλικό εμπλουτιστεί, στη συνέχεια τοποθετείται σε στερεό υπόστρωμα.

Περιέχει:

- Tryptone Soya Agar (TSA)
- Αδρανοποιημένο ορό ίππου
- Bacitracin
- Θειική Polymyxin B
- Nalidixic acid
- Vancomycin
- Nystatin
- Cycloheximide
- Amphotericin B
- D-cycloserine

(Corbel M.J. et al 1983).

Serum Dextrose Agar VCN-F υπόστρωμα: είναι ένα τροποποιημένο Thayer Martin υπόστρωμα, το οποίο χρησιμοποιείται με επιτυχία για την απομόνωση της *Brucella* από το σπέρμα κριού. Επειδή είναι λιγότερο ανασταλτικό για άλλα βακτήρια σε σχέση με τα προηγούμενα μέσα ανάπτυξης, δεν ενδείκνυται ως υπόστρωμα επιλογής για την απομόνωση της βρουκέλλας από έντονα επιμολυσμένα υλικά.

Περιέχει:

- Serum Dextrose agar (SDA)
- VCN (Vancomycin-Colistin-Nystatin) αναστολέα
- Furadantin

(Corbel M.J. et al 1983).

Διφασικό υπόστρωμα Castañeda για καλλιέργεια αίματος: ενδείκνυται, όταν γίνεται προσπάθεια απομόνωσης της βρουκέλλας από δείγματα αίματος. Χρησιμοποιούνται ειδικές φιάλες, στις οποίες τοποθετείται μια υγρή και μια στερεή φάση υποστρώματος. Η υγρή χρησιμοποιείται για εμπλουτισμό ενώ η στερεή για την ανάπτυξη στη συνέχεια ευδιάκριτων αποικιών χωρίς να είναι απαραίτητες συνεχείς ανακαλλιέργειες.

Περιέχει:

Υγρή φάση

- Dextrose broth

- Tri-sodium citrate
- Απεσταγμένο νερό
- Αδρανοποιημένο ορό ίππου
- Όλοι οι αντιμικροβιακοί παράγοντες που χρησιμοποιούνται στο υπόστρωμα Farrell's (Bacitracin, Cycloheximide, Polymyxin B, Vancomycin, Nalidixic acid, Nystatin)

Στην περίπτωση ανθρώπινου δείγματος αίματος οι παραπάνω αντιμικροβιακοί παράγοντες μπορεί να παραλειφθούν (Corbel M.J. 1983).

Στερεή φάση

- Υπόστρωμα Farrell's
- Oxoid agar N^o 1

Στην περίπτωση ανθρώπινου δείγματος μπορούν να παραλειφθούν οι αντιμικροβιακοί παράγοντες και το υπόστρωμα Farrell's να αντικατασταθεί από το βασικό υπόστρωμα SDA (Corbel M.J. 1983).

2.1.5.3 Υποστρώματα χρωστικών για την δοκιμή αναστολής ανάπτυξης: χρησιμοποιούνται για την ταυτοποίηση των βιοτύπων των ειδών της *Brucella*, ανάλογα με την αναστολή ή μη της ανάπτυξης στο συγκεκριμένο υπόστρωμα.

Περιέχει

- Ένα από τα SDA, Trypticase soy agar ή Tryptose agar ως βασικό υπόστρωμα ανάλογα με το είδος που θα αναπτυχθεί
- Μία από τις χρωστικές Thionin, Basic Fuschin ή Safranin O ανάλογα με το είδος της βρουκέλλας που θα αναπτυχθεί.

2.2 Ταυτοποίηση της *Brucella* spp.

2.2.1 Χρώση

Οι βρουκέλλες είναι αρνητικά στη χρώση Gram βακτήρια. Επίσης, χωρίς να είναι πραγματικά οξεάντοχες, εμφανίζουν μέτρια αντίσταση στον αποχρωματισμό με ασθενή οξέα (π.χ. με οξικό οξύ), και γι' αυτό χρωματίζονται ερυθρές στη χρώση Stamp (τροποποιημένη Ziehl-Neelsen) (Alton et al 1988).

2.2.2 Συγκόλληση με πολυδύναμο αντιορό βρουκέλλας

Όλα τα είδη του γένους εμφανίζουν συγκόλληση και εμφάνιση κροκίδων κατά την ανάμειξή τους με πολυδύναμο αντιορό βρουκέλλας. Η συγκόλληση είναι ορατή είτε με τη χρήση μεγεθυντικού φακού, είτε μερικές φορές με γυμνό οφθαλμό.

2.2.3 Συγκόλληση με ειδικούς μονοδύναμους αντιορούς βρουκέλλας

Χρησιμοποιούνται ειδικοί A, M και R αντιοροί βρουκέλλας. Όλα τα είδη του γένους ανάλογα με το βιότυπο, συγκολλούνται από έναν ή περισσότερους

μονοδύναμους αντιορούς, και έτσι είναι δυνατή η ταυτοποίηση όχι μόνο του είδους, αλλά και του βιότυπου.

Στον Πίνακα 2 αναφέρονται όλα τα είδη και οι βιότυποι του γένους *Brucella* και η συγκόλληση με τους μονοδύναμους αντιορούς.

Πίνακας 2 : Συγκόλληση με μονοδύναμους αντιορούς βρουκέλλας (Moyer N.P. & Holcomb L.A. 1995, Jahans K.L. et al. 1997).

Είδος	Βιότυπος	Συγκόλληση με αντιορούς		
		A	M	R
Br. melitensis	1	-	+	-
	2	+	-	-
	3	+	+	-
Br. abortus	1	+	-	-
	2	+	-	-
	3	+	-	-
	4	-	+	-
	5	-	+	-
	6	+	-	-
	9	-	+	-
Br. suis	1	+	-	-
	2	+	-	-
	3	+	-	-
	4	+	+	-
	5	-	+	-
Br. neotomae		+	-	-
Br. ovnis		-	-	+
Br. canis		-	-	+
Br. maris	Αρκετοί ;	+	+/-	-

2.2.4 Βιοχημικές δοκιμές

Για την ταυτοποίηση του είδους της βρουκέλλας απαιτείται πρόσφατη και καθαρή καλλιέργεια. Πραγματοποιείται πλήρης σειρά βιοχημικών δοκιμών που περιλαμβάνει:

Δοκιμή καταλάσης : μικρή ποσότητα καθαρής καλλιέργειας τοποθετείται σε αντικειμενοφόρο πλάκα προσθέτοντας συγχρόνως 1-2 σταγόνες πρόσφατου διαλύματος υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂) 3%. Παρατηρείται σχηματισμός φυσαλίδων (έκλυση οξυγόνου - O₂). Όλα τα είδη της βρουκέλλας είναι θετικά στη

δοκιμασία της καταλάσης (Alton G.G. et al 1975, Κτηνιατρικό Εργαστήριο Λάρισας 2002).

Δοκιμή οξειδάσης: μικρή ποσότητα καθαρής καλλιέργειας τοποθετείται σε διηθητικό χαρτί ή χαρτί Whatman N^ο 1 και πάνω της ενσταλάσσονται 1-2 σταγόνες πρόσφατου διαλύματος tetramethyl-p-phenylenodiamine 1%. Σε χρόνο μικρότερο των 10 sec η αποικία αποκτά βαθύ ιώδες χρώμα. Όλα τα είδη του γένους είναι θετικά στη δοκιμασία εκτός των *B. onis* και *B. neotomae* (Alton G.G. et al 1975, Κτηνιατρικό Εργαστήριο Λάρισας 2002).

Δοκιμή υδρόλυσης της ουρίας : μικρή ποσότητα καθαρής καλλιέργειας ενοφθαλμίζεται σε κεκλιμένη επιφάνεια υποστρώματος Christensen, επωάζεται στους 37 °C και σημειώνεται ο απαιτούμενος χρόνος (λίγα λεπτά έως 24 ώρες) για την υδρόλυση της ουρίας που εκδηλώνεται με κερασέρυθρο χρωματισμό του υποστρώματος. Όλα τα είδη του γένους είναι θετικά στη δοκιμή σε χρόνο που ποικίλλει ανάλογα με το είδος, εκτός της *B. onis* (Alton G.G. et al 1975, Κτηνιατρικό Εργαστήριο Λάρισας 2002).

Δοκιμή κιτρικών : μικρή ποσότητα καθαρής καλλιέργειας ενοφθαλμίζεται σε κεκλιμένη επιφάνεια υποστρώματος Koser's citrate medium. Μετά από επώαση για 48 ώρες στους 37 °C παρατηρείται τυχόν αλλαγή του χρώματος από πράσινο σε βαθύ γαλάζιο. Όλα τα είδη του γένους είναι αρνητικά στη δοκιμή (Alton G.G. et al 1975, Κτηνιατρικό Εργαστήριο Λάρισας 2002).

Δοκιμή ινδόλης : μικρή ποσότητα καθαρής καλλιέργειας ενοφθαλμίζεται στο υγρό υπόστρωμα ινδόλης. Μετά από επώαση για 24-48 ώρες στους 37 °C ανιχνεύεται η παρουσία ινδόλης με την προσθήκη 5-10 σταγόνων αντιδραστηρίου Kovacs's. Δεν εμφανίζεται κόκκινος δακτύλιος, γιατί όλα τα είδη του γένους είναι αρνητικά στη δοκιμή (Alton G.G. et al 1975, Κτηνιατρικό Εργαστήριο Λάρισας 2002).

Δοκιμή ερυθρού του μεθυλίου (methyl red) : μικρή ποσότητα καθαρής καλλιέργειας ενοφθαλμίζεται σε υγρό υπόστρωμα Clark και Lubs. Μετά από επώαση για 24-48 ώρες στους 37 °C προστίθενται 5-10 σταγόνες ερυθρού του μεθυλίου. Δεν παρατηρείται ερυθρός χρωματισμός (πτώση του pH κάτω από 6), γιατί όλα τα είδη του γένους είναι αρνητικά στη δοκιμή (Alton G.G. et al 1975, Κτηνιατρικό Εργαστήριο Λάρισας 2002).

Δοκιμή Voges-Proskauer (παραγωγή ακετυλομεθυκαρβινόλης): μικρή ποσότητα καθαρής καλλιέργειας ενοφθαλμίζεται σε υπόστρωμα Clark και Lubs. Μετά από επώαση για 24-48 ώρες στους 37 °C προστίθενται σε 5 μέρη καλλιέργειας, 3 μέρη α-naphthol 5% και 1 μέρος KOH 4%. Δεν εμφανίζεται ρόδινη χροιά εντός 30 λεπτών (θετικό αποτέλεσμα), γιατί όλα τα είδη είναι αρνητικά στη δοκιμή (Alton G.G. et al 1975, Κτηνιατρικό Εργαστήριο Λάρισας 2002).

Δοκιμή κινητικότητας: μικρή ποσότητα καθαρής καλλιέργειας ενοφθαλμίζεται κάθετα στην επιφάνεια του υποστρώματος, σε δύο υποστρώματα κινητικότητας και μετά από επώαση για 24-48 ώρες, το ένα στους 37 °C και το άλλο στους 20 °C, παρατηρείται τυχόν ανάπτυξη αποικιών περιφερικά και σε μεγαλύτερη επιφάνεια από τη γραμμή ενοφθαλισμού (θετικό αποτέλεσμα). Όλα τα είδη του γένους είναι ακίνητα, και γι' αυτό η δοκιμή είναι αρνητική (Alton G.G. et al 1975, Κτηνιατρικό Εργαστήριο Λάρισας 2002).

Δοκιμή νιτρικών (αναγωγή των νιτρικών αλάτων σε νιτρώδη) : μικρή ποσότητα καθαρής καλλιέργειας ενοφθαλμίζεται στο υπόστρωμα των νιτρικών (θρεπτικός ζωμός με νιτρικό κάλιο -KNO₃- 1%) και μετά από επώαση για 24-48 ώρες στους 37 °C ελέγχεται η παρουσία νιτρωδών με την προσθήκη μερικών σταγόνων θειανιλικού οξέος πρώτα και α-ναφθυλαμίνης στην συνέχεια. Το υπόστρωμα αποκτά ερυθρό χρώμα, γιατί όλα τα είδη του γένους είναι θετικά στη δοκιμή με εξαίρεση την *B. onis*, στην οποία το χρώμα του υποστρώματος δεν αλλάζει (Alton G.G. et al 1975, Κτηνιατρικό Εργαστήριο Λάρισας 2002).

Δοκιμή παραγωγής H₂S (υδροθείου) : μικρή ποσότητα καθαρής καλλιέργειας ενοφθαλμίζεται σε σωληνάρια με υπόστρωμα SDA (Serum Dextrose Agar) και τοποθετείται ταινία διηθητικού χαρτιού, εμποτισμένη με υδατικό διάλυμα οξεικού μολύβδου 10% με τέτοιο τρόπο, ώστε να βρίσκεται απέναντι από την καλλιεργημένη επιφάνεια και σε απόσταση 1 cm. Η καλλιέργεια σφραγίζεται και επωάζεται στους 37 °C και η ταινία ελέγχεται καθημερινά για τέσσερις μέρες για την εμφάνιση ζώνης μαύρου χρώματος. Γίνεται καθημερινή αλλαγή της ταινίας. Όλα τα είδη του γένους είναι αρνητικά στη δοκιμή, εκτός της *B. abortus* (βιότυποι 1, 2, 3, 4, 9), της *B. suis* (βιότυπος 1) και της *B. neotomae*, οι οποίες παράγουν υδρόθειο (Alton G.G. et al 1975, Κτηνιατρικό Εργαστήριο Λάρισας 2002).

Δοκιμή ONPG: μικρή ποσότητα καθαρής καλλιέργειας αραιώνεται σε αποστειρωμένο φυσιολογικό ορό, στον οποίο έχει προστεθεί δισκίο ONPG, και επωάζεται για 4 ώρες στους 37 °C. Ελέγχεται για αλλαγή χρώματος (κίτρινο χρώμα σημαίνει θετική αντίδραση). Όλα τα είδη του γένους είναι αρνητικά στη δοκιμή, δεν απελευθερώνουν *o*-nitro-phenol από την *o*-nitrophenol-*b*-D-galactoside και επομένως δεν παρατηρείται αλλαγή χρώματος (Alton G.G. et al 1975, Κτηνιατρικό Εργαστήριο Λάρισας 2002).

Απαίτηση παρουσίας CO₂ για την ανάπτυξη : πάντα το προς καλλιέργεια υλικό τοποθετείται και σε συνθήκες μικροαερόφιλου περιβάλλοντος, δηλαδή παρουσία CO₂ σε συγκέντρωση 5-10%. Όλα τα είδη του γένους απαιτούν αερόβιες συνθήκες ανάπτυξης εκτός της *B. abortus* (βιότυποι 1, 2, 3, 4, 9) και της *B. onis* που απαιτούν παρουσία CO₂ (Alton G.G. et al 1975, Κτηνιατρικό Εργαστήριο Λάρισας 2002).

Στους Πίνακες 3 και 4 παρουσιάζονται συνοπτικά όλες οι βιοχημικές δοκιμές του γένους *Brucella*.

Πίνακας 3 : Βιοχημικές δοκιμές του γένους *Brucella* (Corbel M.J. et al 1983, Hausler W.J. JR et al 1985, Alton et al 1988, Αρσένη Α. 1994).

Είδος	Βιότυπος	Βιοχημικές δοκιμές					
		Καταλάση	Οξειδάση	Ουρία	Κιτρικά	Ινδόλη	M-R & V-P
<i>B. melitensis</i>	1	+	+	+	-	-	-
	2	+	+	+	-	-	-
	3	+	+	+	-	-	-
<i>B. abortus</i>	1	+	+	+	-	-	-
	2	+	+	+	-	-	-
	3	+	+	+	-	-	-
	4	+	+	+	-	-	-
	5	+	+	+	-	-	-
	6	+	+	+	-	-	-
	9	+	+	+	-	-	-
<i>B. suis</i>	1	+	+	+	-	-	-
	2	+	+	+	-	-	-
	3	+	+	+	-	-	-
	4	+	+	+	-	-	-
	5	+	+	+	-	-	-
<i>B. neotomae</i>		+	-	+	-	-	-
<i>B. ovis</i>		+	-	-	-	-	-
<i>B. canis</i>		+	+	+	-	-	-
<i>B. maris</i>	Αρκετοί ;	+	+	+	-	-	-

Πίνακας 4 : Βιοχημικές δοκιμές του γένους *Brucella* (Corbel M.J. et al 1983, Hausler W.J. JR et al 1985, Alton et al 1988, Αρσένη Α. 1994).

Είδος	Βιότυπος	Βιοχημικές δοκιμές					
		Απαίτηση σε CO ₂	Παραγωγή H ₂ S	ONPG	Νιτρικά	Κινητικότητα	
						20 ° C	37 ° C
<i>B. melitensis</i>	1	-	-	-	+	-	-
	2	-	-	-	+	-	-
	3	-	-	-	+	-	-
<i>B. abortus</i>	1	+	+	-	+	-	-
	2	+	+	-	+	-	-
	3	+	+	-	+	-	-
	4	+	+	-	+	-	-
	5	-	-	-	+	-	-
	6	-	-	-	+	-	-
	9	-/+	+	-	+	-	-
<i>B. suis</i>	1	-	+	-	+	-	-
	2	-	-	-	+	-	-
	3	-	-	-	+	-	-
	4	-	-	-	+	-	-
	5	-	-	-	+	-	-
<i>B. neotomae</i>		-	+	-	+	-	-
<i>B. ovis</i>		+	-	-	-	-	-
<i>B. canis</i>		-	-	-	+	-	-
<i>B. maris</i>	Αρκετοί;	-/+	-	-	+	-	-

2.2.5 Ανάπτυξη σε υποστρώματα βασικών χρωστικών

Η προσθήκη των χρωστικών basic fuchsin, και thionin σε διάφορες συγκεντρώσεις στα βασικά θρεπτικά υποστρώματα και κυρίως στα Serum Dextrose Agar (SDA) και Trypticase Soy Agar (TSA) επιτρέπει ή όχι την ανάπτυξη των ειδών και των βιοτύπων του γένους *Brucella*, έτσι ώστε να αποτελεί μία από τις μεθόδους ταυτοποίησης του είδους. Η συγκέντρωση των χρωστικών ποικίλλει από 1:25.000

μέχρι 1:500.000 και εμφανίζεται διαφορετικό αποτέλεσμα σε κάθε μια απ' αυτές (Hausler W.J. JR et al 1985).

Εκτός από τις τρεις παραπάνω χρωστικές, μπορεί να χρησιμοποιηθεί και η χρωστική safranin O σε συγκέντρωση 1:10.000 για τη διαφοροποίηση της *B. suis* της οποίας οι περισσότεροι βιότυποι δεν αναπτύσσονται (Alton et al 1988).

Στον Πίνακα 5 φαίνεται συνοπτικά η ανάπτυξη των ειδών και των βιοτύπων της *Brucella* σε υπόστρωμα παρουσία χρωστικών σε διάφορες συγκεντρώσεις.

Πίνακας 5: Βιοχημικές δοκιμές του γένους *Brucella*.

Είδος	Βιότυπος	Χρωστικές						
		Basic Fuchsin			Thionin			
		II	III	I	II	III	IV	
<i>B. melitensis</i>	1	+	+	+	+	+	+	
	2	+	+	+	+	+	+	
	3	+	+	+	+	+	+	
<i>B. abortus</i>	1	+	+	-	-	-	+	
	2	-	-	-	-	-	-	
	3	+	+	+	-	+	+	
	4	+	+	-	-	-	+	
	5	+	+	-	+	+	+	
	6	+	+	-	+	+	+	
<i>B. suis</i>	9	+	+	-	+	+	+	
	1	+	-	+	+	+	+/-	
	2	+	-	-	+	+	-	
	3	+	+	+	+	+	+	
	4	+	+	+	+	+	-	
5	+	+	+	+	+	-		
<i>B. neotomae</i>		-	-	-	+	+	+	
<i>B. ovis</i>		+	+	+	+	+	-	
<i>B. canis</i>		-	-	+	+	+	+/-	
<i>B. maris</i>	Αρκετοί ;	+	+	+	+	+	?	

+ = ανάπτυξη, - = αναστολή ανάπτυξης, ? = δεν υπάρχουν στοιχεία

I = 1 : 25.000, II = 1 : 50.000, III = 1 : 100.000, IV = 1 : 500.000

(Hausler W.J. JR et al 1985, Alton et al 1988, WHO Guidance 2003)

2.2.6 Λύση από φάγους

Η χρήση φάγων ειδικών έναντι της βρουκέλλας αποτελεί μία από τις μεθόδους ταυτοποίησης του είδους και του βιοτύπου της. Είναι όμως περίπλοκη και μπορεί να εφαρμοστεί μόνο σε εξειδικευμένα εργαστήρια. Οι φάγοι που

χρησιμοποιούνται είναι οι εξής: Tb (Tbilisi phage), Fi 75/13 (Firenze phage), Wb (Weybridge phage), BK₂ (Berkeley phage), R/C (Rough Colony phage), Iz₁ (Izatnagar phage) και Np (Nepean phage) (Corbel M.J. et al 1983).

Στον Πίνακα 6 φαίνεται η λυτική δράση του κάθε φάγου στα είδη του γένους *Brucella*.

Πίνακας 6 : Λυτική δράση διαφόρων φάγων στα είδη του γένους *Brucella*.

Phage group	Phage Strain	B. abortus		B. melitensis		B. suis		B. neotomae		B. canis	B. ovis	B. maris
		S	R	S	R	S	R	S	R	R	R	R
		RTD ^α										
1	Tb	Λ	ΚΛ	ΚΛ	ΚΛ	ΚΛ	ΚΛ	ΚΛ/ΜΛ	ΚΛ	ΚΛ	ΚΛ	ΚΛ
2	Fi	Λ	ΚΛ	ΚΛ	ΚΛ	ΜΛ	ΚΛ	Λ	ΚΛ	ΚΛ	ΚΛ	Λ
3	Wb	Λ	ΚΛ	Π	ΚΛ	Λ	ΚΛ	Λ	ΚΛ	ΚΛ	ΚΛ	Λ
4	BK ₂	Λ	ΚΛ	Λ/ΜΛ	ΚΛ	Λ	ΚΛ	Λ	ΚΛ	ΚΛ	ΚΛ	Λ
5	R/C	ΚΛ	Λ	ΚΛ	ΚΛ	ΚΛ	ΚΛ	ΚΛ	ΚΛ	Λ	Λ	ΚΛ
6	Iz ₁	Λ	ΚΛ	Λ/ΜΛ	Π	Λ/ΜΛ	Π/ΚΛ	Λ	ΜΛ	ΚΛ	ΚΛ	Λ
7	Np	Λ	ΚΛ	ΚΛ	ΚΛ	ΚΛ	ΚΛ	Λ	ΚΛ	ΚΛ	ΚΛ	?

α = Routine Test Dilution Λ= Λύση ΚΛ = Καθόλου λύση Π= Ποικίλλει ΜΛ = Μερική λύση

? = δεν υπάρχουν στοιχεία.

(Corbel M.J. et al 1983, Corbel M.J. 1998, WHO Guidance 2003).

2.2.7 Μέθοδοι διαφοροποίησης της φάσης των αποικιών

Δοκιμή ακριφλαβίνης : μικρή ποσότητα καθαρής καλλιέργειας εναιωρείται σε μια σταγόνα διαλύματος ουδέτερης ακριφλαβίνης 1:1.000 και παρατηρείται στο στερεοσκόπιο. Οι αποικίες Smooth φάσης δε συγκολλούνται, οι αποικίες Rough φάσης συγκολλούνται αμέσως, ενώ οι βλεννώδεις σχηματίζουν νημάτια (Alton et al 1988).

Χρώση των αποικιών με crystal violet : στο τρυβλίο με τις αποικίες προστίθεται διάλυμα εργασίας χρώσης crystal violet με ammonium oxalate και μετά από 20 sec παρατηρείται στο στερεοσκόπιο. Οι αποικίες της Smooth φάσης δε συγκρατούν το διάλυμα της χρωστικής και διατηρούν τον φυσιολογικό χρωματισμό τους με μία ιώδη στεφάνη στην βάση τους. Οι αποικίες Rough φάσης λόγω της ανώμαλης επιφάνειας τους και των ρωγμών που υπάρχουν σ' αυτή, συγκρατούν χρωστική (Alton et al 1988).

Απ' ευθείας παρατήρηση κάτω από έμμεσο φωτισμό : χρησιμοποιείται μικροσκόπιο με φίλτρο μπλε χρώματος, στερεοσκόπιο με φως υπό γωνία και καθρέφτης που αντανακλά το φως του στερεοσκοπίου και το κατευθύνει προς την κάτω επιφάνεια του τρυβλίου που είναι τοποθετημένο στο μικροσκόπιο. Οι αποικίες Smooth φάσης φαίνονται συμπαγείς, λείες και λαμπερές έχοντας μπλε χρωματισμό.

Οι Rough φαίνονται ξηρές, κοκκώδεις και κίτρινες, ενώ οι Mucoid γκρίζες με βλεννώδη σύσταση και εμφάνιση (Alton et al 1988).

Συγκόλληση με ειδικό μονοδύναμο αντιορό βρουκέλλας : οι rough αποικίες συγκολλούνται από το μονοδύναμο R αντιορό, ενώ όλες οι άλλες όχι.

Λύση από R φάγους : οι R αποικίες λύνονται από τον R/C φάγο, ενώ όλες οι άλλες δε λύνονται.

Χρήση ανοσοειδικής χρώσης : απαιτούνται δύο ειδικοί αντιοροί, ο ένας έναντι Smooth στελεχών βρουκέλλας, ο οποίος συνδέεται με HRPX (Horse Radish Peroxidase) και ο άλλος έναντι Rough στελεχών ο οποίος συνδέεται με FITC (Fluoresceine Iso-thiocyanate). Στην συνέχεια παρασκευάζονται επιχρίσματα από τις προς εξέταση αποικίες και, αφού βαφούν με ειδικές τεχνικές, εξετάζονται σε μικροσκόπιο υπεριώδους ακτινοβολίας μήκους κύματος 490 nm. Τα Smooth στελέχη φαίνονται καφέ, ενώ τα rough φαίνονται πράσινα (Corbel M.J. et al 1983).

Δοκιμή θερμοσυγκόλλησης : οι rough αποικίες στελεχών, συγκολλούνται μετά από θέρμανση στους 80-100 ° C για 2 ώρες, όταν εναιωρηθούν σε διάλυμα χλωριούχου νατρίου (NaCl) 0,15 M. Είναι μέθοδος συμπληρωματική των παραπάνω (Corbel M.J. et al 1983).

2.3 Ευαισθησία σε φυσικούς και χημικούς παράγοντες

Η ικανότητα επιβίωσης της *Brucella* spp εκτός ξενιστή είναι σχετικά μεγάλη σε σχέση με άλλα ασπορογόνα βακτήρια, ειδικά όταν βρίσκεται κάτω από ευνοϊκές συνθήκες, όπως pH>4, χαμηλή θερμοκρασία, υψηλή υγρασία και απουσία απ' ευθείας έκθεσης στο ηλιακό φως. Παραμένει λοιμογόνος για αρκετούς μήνες στο νερό, στα αποβληθέντα έμβρυα και στους εμβρυικούς υμένες, στα κόπρανα και στα υγρά απόβλητα, στο μαλλί, στο χορτόδεμα, στις κτιριακές εγκαταστάσεις, στα ενδύματα και υποδήματα κ.α. (Σαρρής Κ. 2002).

Στον Πίνακα 7 δίνεται ο χρόνος επιβίωσης της βρουκέλλας σε διαφορετικές συνθήκες περιβάλλοντος.

Πίνακας 7 : Χρόνος επιβίωσης της βρουκέλλας σε διάφορες συνθήκες περιβάλλοντος.

Περιβάλλον	Συνθήκες	Χρόνος επιβίωσης
Ήλιος	< 31 ⁰ C	5 ώρες
Νερό (εργαστήριο)	20 ⁰ C	2,5 μήνες
Νερό	-4 ⁰ C	4 μήνες
Νερό λίμνης	37 ⁰ C , pH = 7,2 8 ⁰ C , pH = 6,5	< 24 ώρες > 2 μήνες
Έδαφος	Αποξηραμένο-εργαστήριο	< 4 ημέρες
	Αποξηραμένο - 18 ⁰ C	69-72 ημέρες
	Υγρό	< 7 ημέρες
	Σε υγρή ατμόσφαιρα	> 2 μήνες
	Σε υγρασία 90%	50-75 ημέρες
	Φεβρουάριος με ξηρασία	72 ημέρες
Ούρα	37 ⁰ C, pH = 8,5	16 ώρες
	8 ⁰ C , pH = 6,5	6 ημέρες
Φρέσκο γάλα	25 – 37 ⁰ C	24 ώρες
	8 ⁰ C	48 ώρες
	-40 ⁰ C	2,5 χρόνια
Τυρόγαλα	17 – 24 ⁰ C	< 5 ημέρες
	5 ⁰ C	> 6 ημέρες
Φρέσκια κρέμα γάλακτος	4 ⁰ C	4 εβδομάδες
Ποικιλίες τυριών εκτός φέτας	8 ⁰ C	142 ημέρες
Τυρί φέτα	8 ⁰ C	8 – 11 εβδομάδες
Βούτυρο	8 ⁰ C	142 ημέρες
Κοπριά – κοπροσπόρος	Καλοκαίρι	24 ώρες
	25 ⁰ C	1 μήνας
	Χειμώνας	2 μήνες
	8 ⁰ C	1 χρόνος
	- 3 ⁰ C	3 μήνες
Υγρά απόβλητα ζωοστασίου	Χειμώνας	6 μήνες
	Καλοκαίρι	3 μήνες
	Σε δεξαμενή	1,5 μήνας
	Σε δεξαμενή 12 ⁰ C	> 8 μήνες
Μαλλί	Αποθηκευμένο	4 μήνες
Χορτόδεμα		Ημέρες – μήνες
Σκόνη δρόμου		3 – 44 ημέρες
Ξύλινοι τοίχοι – χωρίσματα		4 μήνες
Βοσκότοποι	Λιαζόμενοι	< 5 ημέρες
	Σε σκιά	> 6 ημέρες

Buxton A. & Fraser G. 1977, FAO/WHO Committee 1986, Χατζηχριστοδούλου Χ. 1997, Corbel M.J. 1998, Σαπρής Κ. 2002).

Καταστρέφεται με τη θέρμανση στους 60⁰ C για 10 min και σε pH < 4. (Buxton A. & Fraser G. 1977, Corbel M.J. 1998). Ο χρόνος επιβίωσης επιμηκύνεται, όταν η θερμοκρασία προσεγγίζει τους 0⁰ C (Joint FAO/WHO Committee 1986), ενώ, όταν λυοφιλοποιηθεί με προστατευτικούς παράγοντες, επιβιώνει για δεκαετίες (Corbel M.J. 1998).

Η χαμηλή (LTLT – 63⁰C x 30 min) και η υψηλή (HTST – 72⁰C x 15 sec) παστερίωση, όπως επίσης και η αποστείρωση (UHTST – 135-140⁰C x 5-10 sec) του γάλακτος καταστρέφουν το μικροοργανισμό. Αντίθετα η βρουκέλλα δεν καταστρέφεται κατά την κατάψυξη στη διαδικασία παραγωγής του παγωτού. Επιβιώνει επίσης για μεγάλο χρονικό διάστημα στο κατεψυγμένο κρέας (Verger J.M. & Plomet M. 1985).

Η υπεριώδης και η γ - ακτινοβολία στις συνήθεις απολυμαντικές δόσεις καταστρέφουν τη βρουκέλλα, όπως επίσης και τα συνήθη απολυμαντικά και αντισηπτικά, όπως : αιθανόλη, φαινόλες, ισοπροπανόλη, φορμαλδεΐδη, ιωδιούχα και υποχλωριώδη (Joint FAO/WHO 1986).

2.4 Ευαισθησία στα αντιβιοτικά

Η μεγάλη ενδοκυτταρική διείσδυση είναι πάρα πολύ σημαντική για την επιτυχή in vivo αντιμετώπιση της βρουκέλλας. Τα περισσότερα στελέχη της βρουκέλλας είναι ανθεκτικά στην πενικιλίνη, κεφαλοσπορίνες α' και β' γενιάς, τριμεθοπρίμη – σουλφαμεθοξαζόλη, ερυθρομυκίνη και τομπραμυκίνη. Αντίθετα, είναι ευαίσθητα στη στρεπτομυκίνη, χλωραμφαινικόλη, ριφαμπικίνη, τετρακυκλίνες, καναμυκίνη, γενταμικίνη, ορφλοξασίνη, κλαριθρομυκίνη και δοξυκυκλίνη, ενώ μερικά στελέχη είναι ευαίσθητα και στις κεφαλοσπορίνες γ' γενιάς: κεφοταξίμη, κεφτιζοξίμη και κεφτριαξόνη (Moyer N.P. & Holcomb L.A. 1995, Corbel M.J. 1998).

3. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ

Παρά το γεγονός ότι σε πολλές χώρες του κόσμου η βρουκέλλωση έχει εξαλειφθεί (Νορβηγία, Σουηδία, Κύπρος, ΗΠΑ), σε παγκόσμιο επίπεδο η νόσος φαίνεται να εμφανίζει αυξημένη επίπτωση (Joint FAO/WHO 1986, Χατζηχριστοδούλου Χ. 1997). Το γεγονός αυτό οφείλεται σε πολλούς παράγοντες, όπως:

- Στην αύξηση του αριθμού των εκτροφών παραγωγικών ζώων και στην αστικοποίηση αγροτικών περιοχών, που έφερε σε μεγαλύτερη επαφή τον άνθρωπο με τα ζώα, στην έλλειψη μέτρων υγιεινής κατά το χειρισμό των ζώων και κατά την παρασκευή και χειρισμό των τροφίμων ζωικής προέλευσης, στο χαμηλό μορφωτικό επίπεδο και στην άγνοια των κτηνοτρόφων πάνω στις βασικές αρχές πρόληψης της νόσου
- Στην αύξηση των διεθνών μετακινήσεων για επαγγελματικούς και λόγους αναψυχής, η οποία διευκολύνει ή/και ευνοεί την επαφή με διαφορετικές διατροφικές συνήθειες καθώς και τη δοκιμή τοπικών «εξωτικών προϊόντων και εδεσμάτων»
- Στην αύξηση των εισαγωγών τροφίμων από τις χώρες καταγωγής (που πολλές φορές είναι ενδημικές περιοχές) στις χώρες διαμονής προκειμένου να εξυπηρετηθούν μεγάλες πληθυσμιακές ομάδες μεταναστών ή προσφύγων (WHO Guidance 2003, Memish Z.A. & Balkhy H.H. 2004).

Όσον αφορά στο είδος της βρουκέλλας που ενδημεί σε κάθε περιοχή, αυτό εξαρτάται από τις γεωργοκτηνοτροφικές συνθήκες που επικρατούν στη συγκεκριμένη περιοχή (Χατζηχριστοδούλου Χ. 1997).

Η *B. melitensis* είναι το πιο συχνά συναντώμενο είδος βρουκέλλας σε ανθρώπους που νοσούν από βρουκέλλωση. Επικρατεί σε περιοχές φτωχές σε βλάστηση, όπως οι μεσογειακές χώρες, όπου εκτρέφονται κυρίως αιγοπρόβατα που είναι και οι φυσικοί ξενιστές του είδους. Προσβάλλει όμως και άλλα είδη ζώων, όπως βοοειδή, σκύλους και καμήλες. Είναι πολύ λοιμογόνος για τον άνθρωπο και προκαλεί σοβαρή γενικευμένη νόσο, τόσο όταν μεταδίδεται από τα αιγοπρόβατα, όσο και από τα βοοειδή.

Η *B. abortus* είναι το είδος της βρουκέλλας που εμφανίζει τη μεγαλύτερη εξάπλωση παγκοσμίως, και ενδημεί σε περιοχές με πλούσια βλάστηση, όπως η Λατινική Αμερική, όπου εκτρέφονται κυρίως βοοειδή. Προσβάλλει και άλλα είδη ζώων όπως βίσωνες, βούβαλους, γιακς, καμήλες και σκύλους. Είναι λοιμογόνος για τον άνθρωπο, δεν σχετίζεται όμως με νόσο τόσο βαριά όπως η *B. melitensis*.

Η B. suis είναι λιγότερο συχνό είδος σε σχέση με τα δύο προηγούμενα, και έχει σημασία κυρίως στις περιοχές, όπου η χοιροτροφία είναι η κύρια κτηνοτροφική κατεύθυνση. Προσβάλλει και άλλα είδη ζώων, όπως ο τάρανδος και το ελάφι στην Αλάσκα, Καναδά και Βόρεια Ρωσία. Η νόσος που προκαλεί είναι σοβαρότατη και εξαρτάται κυρίως από το βιότοπο που επικρατεί σε κάθε περιοχή.

Η B. canis προσβάλλει το σκύλο και, παρά το ότι έχει παγκόσμια εξάπλωση, δεν προκαλεί συχνά νόσο στον άνθρωπο. Κυρίως μολύνονται οι εργαστηριακοί που εργάζονται με καλλιέργειες του είδους και οι εκτροφείς και εκπαιδευτές σκύλων (Nicoletti P. 1980, Polt S.S. et al 1982)

Η επιδημιολογία και ο τρόπος μετάδοσης της νόσου στον άνθρωπο είναι διαφορετική στις ενδημικές και στις μη ενδημικές περιοχές. Στις ενδημικές περιοχές η μετάδοση της νόσου οφείλεται κυρίως στην κατανάλωση μολυσμένων τροφίμων ζωικής προέλευσης και στις κακές συνθήκες υγιεινής, ενώ στις μη ενδημικές περιοχές είναι επαγγελματική νόσος και οφείλεται σε τυχαία επαφή με το μολυσματικό παράγοντα (Araj G. 1999).

3.1 Η Βρουκέλλωση παγκοσμίως

Σε παγκόσμιο επίπεδο τα ετήσια δηλωμένα κρούσματα ανέρχονται σε <0,01 έως >200 / 100.000 κατοίκους ανάλογα με την περιοχή (Corbel M.J. 1997), ενώ κατ' άλλους συγγραφείς σε 500.000/έτος (Araj G. 1999). Ο πραγματικός όμως ετήσιος αριθμός είναι πολύ μεγαλύτερος και αυτό οφείλεται στην υποδήλωση της νόσου στις αρχές είτε λόγω αδιαφορίας, είτε λόγω κακής οργάνωσης των υπεύθυνων υπηρεσιών, είτε τέλος στην εσφαλμένη διάγνωση της νόσου ή στη μη διάγνωση αυτής ειδικά στις μη ενδημικές περιοχές, όπου η νόσος είναι σπάνια και συνήθως δε συμπεριλαμβάνεται στη διαφορική διάγνωση των περιστατικών. Ενδεικτικά αναφέρεται ότι ανάλογα με την περιοχή η αναλογία δηλωθέντων προς πραγματικά περιστατικά είναι 1:10 με 1:26 (Araj G. 1999).

Στην Ευρωπαϊκή Ένωση, το έτος 2000 εννέα κράτη-μέλη θεωρούνταν επίσημα απαλλαγμένα από τη νόσο και αυτά ήταν: Βέλγιο, Δανία, Φινλανδία, Γερμανία, Ολλανδία, Ιρλανδία, Λουξεμβούργο, Σουηδία και Μεγάλη Βρετανία. Σ' αυτά το 2001 προστέθηκαν η Αυστρία και η Νορβηγία, όπως επίσης και 17 περιφέρειες της Γαλλίας και δύο επαρχίες της Ισπανίας. Αντίθετα η Ελλάδα, το μεγαλύτερο τμήμα της Γαλλίας και της Ισπανίας, η Πορτογαλία και η Ιταλία, εφαρμόζουν ακόμα προγράμματα ελέγχου και εκρίζωσης και δεν προσεγγίζουν το επίπεδο του επίσημα απαλλαγμένου κράτους (Godfroid J. 2002).

Ειδικά για την Ιταλία, αναφέρεται ότι η μεγαλύτερη επίπτωση της νόσου εμφανίζεται στο νότιο τμήμα της χώρας και ιδιαίτερα στην Σικελία όπου είναι πολύ

πιο ανεπτυγμένη η αιγοπροβατοτροφία σε σχέση με την υπόλοιπη χώρα (De Massis F. et al 2005).

Στη Βαλκανική χερσόνησο η FYROM εμφανίζει στοιχεία μετά το 1980 και έχει επίπτωση περίπου 30/100.000 κατοίκους, τα κρούσματα οφείλονται κυρίως στην *B. melitensis* και έχουν εποχική εμφάνιση (Μάϊος και Ιούνιος). Η Βουλγαρία θεωρείται απαλλαγμένη από τη νόσο και μόνο δύο περιστατικά έχουν αναφερθεί το χρονικό διάστημα 1996-2001. Η Κροατία θεωρούνταν απαλλαγμένη από το 1960 μέχρι το 1990 που παρατηρήθηκε μια έξαρση της νόσου στα ζώα και αυξήθηκαν κατακόρυφα τα κρούσματα στον άνθρωπο (από 56 περιστατικά το 1990, σε 420 το 1991). Όμως μέσα σε μια δεκαετία η επίπτωση της νόσου στον άνθρωπο μειώθηκε και πάλι (5 περιστατικά το 2000). Στη Γιουγκοσλαβία, τέλος, στοιχεία υπάρχουν μέχρι τα μέσα της δεκαετίας του '90, οπότε αναφέρθηκαν περίπου 800 περιστατικά τη δεκαετία 1985-1995. (Taleski V. et al 2002). Για την Αλβανία δεν υπάρχουν επίσημα στοιχεία από το 2000 και έπειτα, ενώ η τελευταία επίσημη αναφορά ήταν 460 περιστατικά το 1999 (Pappas G. et al 2005). Η Τουρκία εμφανίζει μεγάλη αύξηση των ετησίων περιστατικών κατά τη δεκαετία 1990 – 2000, οπότε από 8/100.000 κατοίκους το 1991 η επίπτωση έφτασε στο 23/100.000 το 2001 με θνησιμότητα αντίστοιχα 0.07/100.000 και 0.03/100.000 κατοίκους αντίστοιχα (Köse Ş. et al 2005).

Η Κύπρος θεωρείται επίσημα απαλλαγμένη από τη νόσο από το 1985, μετά από την εφαρμογή ενός προγράμματος εκρίζωσης που διήρκησε 13 χρόνια. Παρ' όλα αυτά η νόσος εμφανίστηκε σε ένα κοπάδι αιγοπροβάτων το 1993 και σε τέσσερα το 1997, σε περιοχές που γειννιάζαν με τα κατεχόμενα εδάφη. Και στις δύο περιπτώσεις, οι αρμόδιες Κυπριακές αρχές προχώρησαν σε άμεση σφαγή όλων των μολυσμένων ζώων (WHO/MZCP 1998).

Στη Ρωσία τα επίσημα περιστατικά που αναφέρονται είναι από 320 περίπου το 1999, μέχρι 600 το 2003 (Pappas G. et al 2005).

Στην Εικόνα 1 παρουσιάζεται το επίσημο καθεστώς ως προς τη βρουκέλλωση όλων των Ευρωπαϊκών χωρών (Pappas G. et al 2005).

Εικόνα 1: Επίσημο καθεστώς ως προς την βρουκέλλωση των Ευρωπαϊκών χωρών.



Για την Αφρική τα στοιχεία που υπάρχουν είναι ελλιπέστατα. Παρ' όλα αυτά η βρουκέλλωση αναφέρεται σε όλες τις χώρες της ηπείρου, ενώ είναι ενδημική σε όλες σχεδόν τις εκτροφές της υποσαχάριας Αφρικής (Smits H.L. & Cutler S.J. 2004). Οι μόνες χώρες, για τις οποίες υπάρχουν διαθέσιμα στοιχεία, είναι η Τυνησία με 123 και η Αλγερία με 2.766 επίσημα δηλωμένα περιστατικά το 2003 (Pappas G. et al 2005).

Στις Η.Π.Α. με τη βελτίωση των μέτρων υγιεινής τις τελευταίες δεκαετίες, τα ετήσια κρούσματα βρουκέλλωσης περιορίστηκαν από >6.000 το 1945, σε 125 το 2002. Παρατηρείται όμως μια αλλαγή στην επιδημιολογία της νόσου η οποία από επαγγελματική (κτηνοτρόφοι, χειριστές τροφίμων), έγινε τροφιμογενής. Αιτία είναι η κατανάλωση μολυσμένων τροφίμων που εισάγονται από το Μεξικό για τις ισπανόφωνες κοινότητες κυρίως των πολιτειών της Καλιφόρνια και του Τέξας, περιοχές στις οποίες εντοπίζεται το 50-60% των ετήσιων περιστατικών. Υπολογίζεται επίσης ότι λόγω της φύσης της νόσου και της περιορισμένης εμφάνισης ή της

απουσίας της από πολλές Πολιτείες για αρκετές δεκαετίες, μόνο το 4-10% των πραγματικών περιστατικών δηλώνονται επίσημα στις υγειονομικές αρχές (Troy S.B. 2005).

Η Λατινική Αμερική, περιοχή με πολύ ανεπτυγμένη βοοτροφία, εμφανίζει υψηλή επίπτωση της νόσου, ιδιαίτερα στο Μεξικό με 2.850 περιστατικά το 2002, στο Περού με 1000 και στην Αργεντινή με 350 περιστατικά για το ίδιο έτος (Pappas G. et al 2005).

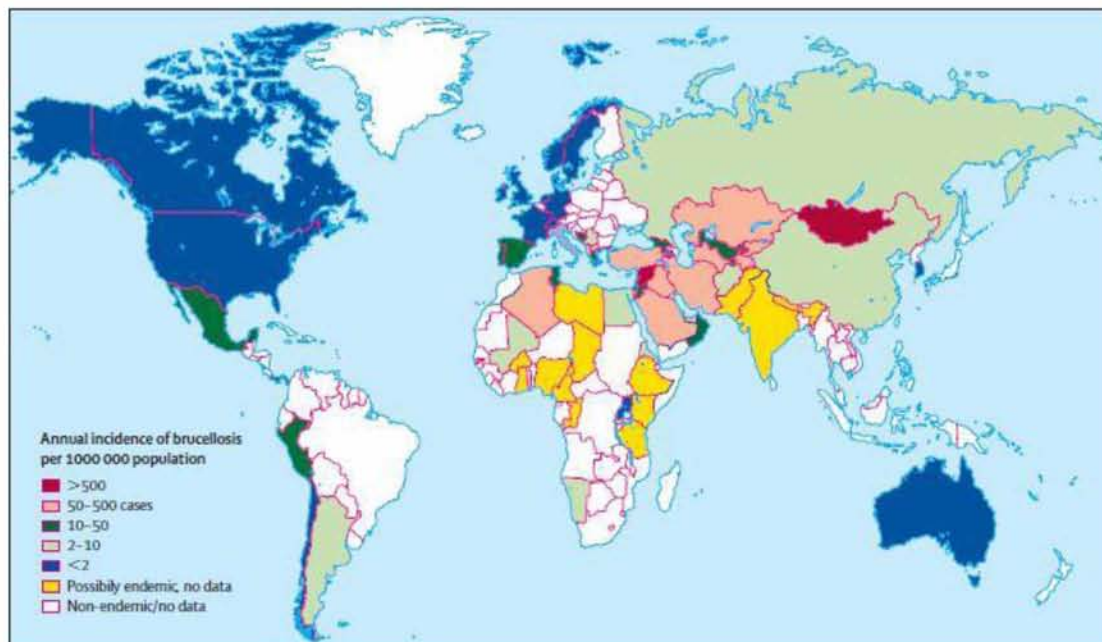
Η Μέση Ανατολή είναι ίσως η περιοχή του πλανήτη με τη μεγαλύτερη επίπτωση της νόσου. Ειδικά στη Σαουδική Αραβία και το Κουβέιτ αναφέρονται $\geq 70/100.000$ (16.000 περιστατικά στην Σαουδική Αραβία το έτος 1999), στον Λίβανο, στο Ιράν και στο Ιράκ 11-20/100.000 (430 περιστατικά στο Λίβανο το έτος 1997, 18.000 περιστατικά στο Ιράν το έτος 2003), και στην Ιορδανία 6-10/100.000 με 160 περιστατικά το έτος 2003 (Araj G.F. 1999, Alsubaie S. et al 2005, Pappas G. et al 2005).

Στην Ασία οι χώρες με την υψηλότερη επίπτωση είναι το Κιργιστάν με 1.800 περιστατικά ετησίως, το Τατζικιστάν με 1.500 και το Αζερμπαϊτζάν και το Τουρκμενιστάν με 400 περιστατικά ετησίως τα έτη 2002-2003 (Pappas G. et al 2005). Στο Χονγκ-Κονγκ για πρώτη φορά το 2005, αναφέρθηκε επίσημα κρούσμα βρουκέλλωσης σε άνθρωπο, ενώ στην Κίνα, παρά το γεγονός ότι το ποσοστό μολυσμένων βοοειδών, αιγοπροβάτων και χοίρων κυμαίνεται στο 1-5%, σποραδικά κρούσματα βρουκέλλωσης αναφέρονται στον άνθρωπο (Lee M.K.P & Fung K.S.C 2005). Στην Κορέα η βρουκέλλωση των βοοειδών εκριζώθηκε από τη δεκαετία του 1960, αλλά σταδιακά επανεμφανίστηκε και από 100 περιστατικά σε βοοειδή το 1984, η συχνότητα εμφάνισης έφτασε τα 1.100 περιστατικά το 2003. Όμως, περιστατικό βρουκέλλωσης στον άνθρωπο δεν αναφερόταν επίσημα μέχρι το 2002 οπότε δηλώθηκε 1 κρούσμα, και το 2003 οπότε δηλώθηκαν 2 κρούσματα (Park M.Y. et al 2005).

Στην Ινδία η επίπτωση κυμαίνεται στο 1-5/100.000 κατοίκους (Araj G.F. 1999). Η νόσος παρά την ανεπτυγμένη βοοτροφία, οφείλεται μάλλον στην *B. melitensis*, πιθανότατα επειδή η αγελάδα θεωρείται «ιερό ζώο» και δεν καταναλώνεται.

Στην Εικόνα 2 παρουσιάζεται η επίπτωση της βρουκέλλωσης παγκοσμίως (Pappas G. et al 2005).

Εικόνα 2: Επίπτωση της βρουκέλλωσης παγκοσμίως.



3.2 Η Βρουκέλλωση στην Ελλάδα

Η βρουκέλλωση στην Ελλάδα οφείλεται κυρίως στην *B. melitensis* στα αιγοπρόβατα και στην *B. abortus* στα βοοειδή (Λ. Στεφάνου 1978, Παππούς Χ. 1988). Από τα δύο αυτά είδη βρουκέλλας η *B. Melitensis* είναι υπεύθυνη κατά συντριπτικό ποσοστό για την εμφάνιση της νόσου στον άνθρωπο. Σχετικά με την επικράτηση των ειδών και των βιοτύπων της βρουκέλλας στη χώρα μας, το Νοσοκομείο Λοιμωδών Νοσημάτων Θεσ/νίκης μελέτησε λεπτομερέστατα τα τελευταία 35 χρόνια 640 στελέχη βρουκελλών (Κανσουζίδου-Κανακούδη Α. και Δανιηλίδης Δ.Β. 1985, Κανσουζίδου-Κανακούδη Α. και Δανιηλίδης Δ.Β. 1986, Κανσουζίδου-Κανακούδη Α. και συν 1996, Κανσουζίδου-Κανακούδη Α. και συν 2002). Από τις μελέτες αυτές προκύπτει ότι ενώ μέχρι το 2000 ο βιότυπος 2 της *B. melitensis* ήταν ο συχνότερα απομονωνόμενος βιότυπος, τα τελευταία χρόνια παρατηρείται μια μεταβολή και ο βιότυπος 3 είναι εκείνος που κατά κύριο λόγο προκαλεί τη νόσο. Όσον αφορά στην απομόνωση της *B. abortus* μόνο μία αξιόπιστη αναφορά υπάρχει στην Ελλάδα, επιβεβαιωμένη από το Weybridge (Κανσουζίδου-Κανακούδη Α. και Δανιηλίδης Δ.Β. 1985).

Συνοπτικά στον Πίνακα 8 παρουσιάζεται η κατανομή των βιοτύπων της βρουκέλλας στη χώρα μας τα τελευταία 30 χρόνια.

Πίνακας 8: Κατανομή των ειδών και βιοτύπων της βρουκέλλας στον άνθρωπο, στην Ελλάδα τα τελευταία 30 χρόνια.

Είδος και βιότυποι βρουκέλλας	1970-1995 (384 στελέχη)	1996-2000 (203 στελέχη)	2001-2002 (53 στελέχη)
B.melitensis - βιότυπος 1	2,4%	4%	13,2%
B.melitensis - βιότυπος 2	97,1%	80%	28,3%
B.melitensis - βιότυπος 3	0,5%	16%	58,5%
B. abortus	1 στέλεχος	0 στέλεχος	0 στέλεχος

Η επίπτωση της νόσου στην Ελλάδα ήταν πολύ υψηλή μέχρι πριν από 25-30 χρόνια. Με την έναρξη όμως του προγράμματος ελέγχου και εκρίζωσης της νόσου του Υπουργείου Γεωργίας το 1975, υπήρξε μια σαφής μείωση της επίπτωσης, η οποία όμως στα τέλη της δεκαετίας 1990, έδειξε να αυξάνει και πάλι, ακολουθώντας την πορεία της νόσου στα παραγωγικά ζώα και ιδιαίτερα στα αιγοπρόβατα (Χατζηχριστοδούλου Χ. 1997, Minas A. et al 2004). Το πρόγραμμα ελέγχου που ξεκίνησε το 1975 βασίστηκε στον εμβολιασμό των νεαρών ζώων ηλικίας 3-6 μηνών, τα οποία χρησιμοποιούνταν για αντικατάσταση των ζώων που σφάζονταν, και εφαρμόστηκε μέχρι το 1992. Η εφαρμογή των εμβολιασμών για περισσότερο από 15 χρόνια έδωσε την εντύπωση ότι η νόσος είχε ελεγχθεί και έτσι αποφασίστηκε να ακολουθηθεί η μέθοδος της σφαγής των οροθετικών ζώων, η οποία όμως δεν απέδωσε τα αναμενόμενα. Έτσι το 1998 ξεκίνησε επείγοντως ένα πρόγραμμα εμβολιασμών τόσο των νεαρών, όσο και των ενηλίκων ζώων, το οποίο εφαρμόζεται μέχρι σήμερα (Minas A. et al 2004).

Στο Διάγραμμα 1 φαίνεται η πορεία της νόσου κατά την εφαρμογή των προγραμμάτων εκρίζωσης της βρουκέλλωσης στα ζώα.

Διάγραμμα 1: Επίπτωση της νόσου στον άνθρωπο κατά την εφαρμογή των προγραμμάτων εκρίζωσης.



Στο Διάγραμμα 2 παρουσιάζονται τα επίσημα δηλωθέντα ετήσια κρούσματα βρουκέλλωσης κατά την περίοδο 1998-2006 σύμφωνα με τα στοιχεία του ΚΕΕΛΠΝΟ του 2007 (ΚΕΕΛΠΝΟ 2007, προσωπική επαφή).

Διάγραμμα 2: Ετήσια περιστατικά βρουκέλλωσης κατά την περίοδο 1998 – 2006.



Με βάση τα Διαγράμματα 1 και 2 φαίνεται ότι η έναρξη του προγράμματος επείγοντος μαζικού εμβολιασμού το 1998 απέδωσε και πάλι. Μέσα στην πρώτη τριετία (1998-2000) και έως ότου το πρόγραμμα ελέγχου αποδώσει, η επίπτωση της νόσου αυξανόταν κάθε χρόνο (4,2-5,5/100.000). Στη συνέχεια όμως, η επίπτωση της νόσου άρχισε να μειώνεται και από το 5,5/100.000 το 2000 έφτασε στο 2,9/100.000 το έτος 2006. Η μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης της νόσου είναι στους νομούς Γρεβενών, Λακωνίας, Λάρισας, Φθιώτιδας και Φλώρινας, ενώ σημαντική επίπτωση εμφανίζει και η περιφέρεια της Ηπείρου, πιθανότατα λόγω γειννίασης με την Αλβανία (Ανδίκου Ι. et al 2005).

Πρέπει επίσης να τονιστεί, ότι η νόσος τα τελευταία χρόνια στη χώρα μας πλήττει κυρίως αλλοδαπούς. Οι κυριότεροι λόγοι είναι ότι πλέον πολλοί αλλοδαποί εργάτες εργάζονται ως βοηθητικό προσωπικό στις κτηνοτροφικές μονάδες, και οι περισσότεροι από αυτούς προέρχονται από χώρες (Βουλγαρία, Ρουμανία) όπου η βρουκέλλωση έχει εκριζωθεί, επομένως δεν έχουν γνώση της νόσου και των μέτρων πρόληψης αυτής. Η άγνοια επίσης της ελληνικής γλώσσας καθιστά πολύ δύσκολη, έως αδύνατη την επικοινωνία και τη λήψη ικανοποιητικών μέτρων πρόληψης στις ομάδες αυτές.

Στο Διάγραμμα 3 παρουσιάζεται η κατανομή των κρουσμάτων της νόσου ως προς την ηλικία.

Διάγραμμα 3: Κατανομή των κρουσμάτων βρουκέλλωσης ως προς την ηλικία, το έτος 1998.



Από το παραπάνω διάγραμμα γίνεται εύκολα αντιληπτό, ότι η βρουκέλλωση πλήττει κυρίως τις ηλικίες 25-65 ετών, στις οποίες οι ομάδες υψηλού κινδύνου (κτηνοτρόφοι, εκδοροσφαγείς, κτηνίατροι) βρίσκονται σε πλήρη επαγγελματική δραστηριότητα (μετάδοση κυρίως με άμεση επαφή), ενώ τα κρούσματα στις μικρότερες και στις μεγαλύτερες ηλικίες μάλλον πρέπει να αποδοθούν σε τροφιμογενή μετάδοση.

Οι παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση της νόσου είναι κατά κύριο λόγο η κατανάλωση μη παστεριωμένου γάλακτος και γαλακτοκομικών προϊόντων, το επάγγελμα του κτηνοτρόφου και του εκδοροσφαγέα και η ύπαρξη παραγωγικών ζώων στο σπίτι, ενώ δευτερευόντως η εμφάνιση αποβολών στα ζώα, η ύπαρξη κοπριάς στην αυλή, το φύλο και η ηλικία (Χατζηχριστοδούλου Χ. 1997).

3.3 Η νόσος στον άνθρωπο

3.3.1 Μολυσματική δόση

Η ελάχιστη μολυσματική δόση για την *per os* μετάδοση της νόσου είναι περίπου 5.000 μικροοργανισμοί για την *B. melitensis* και 10^6 - 10^7 για την *B. abortus* και την *B. suis*, ενώ για τη μετάδοση με την εισπνοή μολυσμένου αέρα ή μέσω του επιπεφυκότα απαιτούνται περίπου 1.300 μικροοργανισμοί για την *B. melitensis* και λιγότεροι από 100 για την *B. abortus* και την *B. suis* (Kaufmann A.F. et al 1980, Flynn M.P. 1983).

3.3.2 Τρόποι μετάδοσης της νόσου

Η νόσος μεταδίδεται στον άνθρωπο με πολλούς διαφορετικούς τρόπους, ανάλογα με την ενδημικότητα της νόσου και τον έλεγχο της ή όχι σε κάθε περιοχή.

3.3.2.1 Μετάδοση από το πεπτικό σύστημα

Η κατανάλωση μολυσμένων τροφών είναι ο πιο συχνός τρόπος μετάδοσης της νόσου στους αστικούς πληθυσμούς. Η κατανάλωση φρέσκου μη παστεριωμένου γάλακτος και γαλακτοκομικών προϊόντων που παράγονται από τέτοιο γάλα, είναι η κυριότερη πηγή μόλυνσης (Sabbaghian H. 1975, Syrjamaki C. et al 1984, Taliani G. et al 2004).

Μόλυνση επίσης μπορεί να προκληθεί και από την κατανάλωση κρέατος και παραπροϊόντων αυτού (αίμα, ήπαρ, σπλήνας, νεφροί, μήτρα, ουροδόχος κύστη και όρχεις) που μπορεί να καταναλώνονται ωμά ή ατελώς μαγειρεμένα σε πολλές χώρες του κόσμου, ανάλογα με τις τοπικές διατροφικές ή θρησκευτικές συνήθειες (WHO Guidance 2003).

Άτομα με αχλωρυδρία που οφείλεται σε νόσο ή σε λήψη αντιόξινων φαρμάκων ή H_2 – αναστολέων, εμφανίζουν αυξημένο κίνδυνο να μολυνθούν λόγω του υψηλότερου pH στο στόμαχο, αφού το χαμηλό pH θεωρείται ότι έχει προστατευτική δράση (Cristiano P. & Paradisi F. 1982). Αυτός είναι και ο λόγος που

τα παιδιά, λόγω χαμηλότερου pH στο στόμαχο εμφανίζουν σχετική ανθεκτικότητα στη μόλυνση σε σχέση με τους ενήλικες (Χατζηχριστοδούλου Χ. 1997).

3.3.2.2 Μετάδοση από το αναπνευστικό σύστημα

Η μετάδοση από το αναπνευστικό σύστημα στις ενδημικές περιοχές, οφείλεται κυρίως στον παραδοσιακό τρόπο σταβλισμού των ζώων, που χαρακτηρίζεται από κακές συνθήκες υγιεινής (προϊόντα αποβολής που αποξηραίνονται στο δάπεδο και στη συνέχεια αναμιγνύονται με τη σκόνη και τον αέρα του στάβλου). Αντίθετα, στις μη ενδημικές περιοχές η μετάδοση από το αναπνευστικό σύστημα είναι από τους συχνότερους τρόπους μετάδοσης της νόσου στους εργαζόμενους στα σφαγεία και στους εργαστηριακούς που έρχονται σε επαφή με τις καλλιέργειες του βακτηρίου (Kaufmann A.F. 1980, Ollé-Going J.E. & Canela-Soler J. 1987, Staszkiwicz J. et al 1991, Martin-Mazuelos E. et al 1994, Fiori P.L. et al 2000).

3.3.2.3 Μετάδοση με άμεση επαφή από το δέρμα ή τους βλεννογόνους

Είναι οι κυριότερες οδοί μετάδοσης της βρουκέλλωσης στις ανεπτυγμένες χώρες, όπου η νόσος θεωρείται επαγγελματική. Ομάδες υψηλού κινδύνου είναι οι εργαζόμενοι στα σφαγεία, οι κτηνοτρόφοι, οι κτηνίατροι και οι εργαστηριακοί. Η άμεση επαφή χωρίς προστατευτικά γάντια με τα προϊόντα αποβολής ή το κρέας του σφαγίου, και οι χειρισμοί κατά τη διάρκεια του τοκετού ή της αντιμετώπισης περιστατικών δυστοκίας, είναι οι συχνότεροι τρόποι μόλυνσης των παραπάνω επαγγελματικών ομάδων. Η βρουκέλλα εισέρχεται από λύση συνεχείας του δέρματος που προϋπάρχει ή δημιουργείται κατά τη διάρκεια των χειρισμών (Buchanan T.M. et al 1974, Williams E. 1982, Mudaliar S. et al 2003, Noviello S. et al 2004). Συχνή επίσης είναι η μόλυνση μέσω του επιπεφυκότα ειδικά στους εργαστηριακούς και στους κτηνιάτρους που διενεργούν εμβολιασμούς με ζωντανά εμβόλια. Ιδιαίτερα λοιμογόνο θεωρείται το ζωντανό εμβόλιο REV-1 που χρησιμοποιείται και στη χώρα μας για τον εμβολιασμό των αιγοπροβάτων και των βοοειδών με ενστάλαξη στον επιπεφυκότα των ζώων, διαδικασία κατά την οποία τα «ατυχήματα» είναι ιδιαίτερα συχνά (Bardenstein S. et al 2002). Συχνά επίσης είναι τα ατυχήματα και κατά τη χρήση του ενέσιμου εμβολίου RB51 (Ashford D.A. et al 2004), το οποίο τώρα εφαρμόζεται πειραματικά στη χώρα μας.

3.3.2.4 Μετάδοση από μεταμόσχευση μυελού των οστών – μεταγγιση αίματος

Η νόσος μπορεί να μεταδοθεί, αν μεταγγισθεί αίμα από δότη που εμφανίζει βακτηριαίμια ή αν ληφθεί μυελός των οστών για μεταμόσχευση από πάσχοντα από οξεία ή χρόνια βρουκέλλωση (Wood E.E. 1955, Ertem M. et al 2000, Akcakus M. et al 2005).

3.3.2.5 Κάθετη μετάδοση

Αναφέρεται στη βιβλιογραφία ως πιθανός τρόπος η μετάδοση από τη μητέρα στο έμβρυο μέσω του πλακούντα (Hagebusch O.E. & Frei C.F. 1941, Lubani M.M. et al 1988a). Εξαιρετικά μικρός όμως αριθμός περιπτώσεων αποδίδεται στην κάθετη μετάδοση.

3.3.2.6 Οριζόντια μετάδοση

Σήμερα θεωρείται πλέον σίγουρο ότι η βρουκέλλωση είναι νόσημα που μπορεί να μεταδοθεί σεξουαλικά (Goosens H. 1983, Ruben B. et al 1991, Mantur B.G. et al 1996), όπως επίσης και κατά τη διάρκεια του μητρικού θηλασμού (Hagebusch O.E. & Frei C.F. 1941, Lubani M.M. et al 1988b). Πρέπει να σημειωθεί όμως ότι η βιβλιογραφική αναφορά τέτοιων περιπτώσεων είναι εξαιρετικά σπάνια.

Συνοψίζοντας και σε σχέση με τις οδούς μόλυνσης της νόσου, η επιδημιολογία της μετάδοσης της νόσου στον άνθρωπο περιλαμβάνει:

- Τη μετάδοση της νόσου μέσω μολυσμένων τροφίμων
- Τη μετάδοση της νόσου σε επαγγελματικές ομάδες υψηλού κινδύνου
- Τη μετάδοση της νόσου από μολυσμένο περιβάλλον
- Τη μετάδοση της νόσου από άτομο σε άτομο (εξαιρετικά σπάνια).

3.3.2.7 Άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν τη μετάδοση της νόσου

Εποχικοί παράγοντες: σε χώρες με ψυχρό ή εύκρατο κλίμα, εμφανίζεται μια εποχική αύξηση της επίπτωσης (καλοκαίρι και χειμώνας) που οφείλεται κυρίως στους ομαδικούς τοκετούς των ζώων (άνοιξη και φθινόπωρο) και στην αύξηση της παραγωγής γάλακτος και γαλακτοκομικών προϊόντων. Αντίθετα στις χώρες με υποτροπικό και τροπικό κλίμα, η επίπτωση της νόσου είναι σταθερή καθ' όλη τη διάρκεια του έτους, διότι δεν υπάρχει εποχικότητα στην αναπαραγωγή των ζώων.

Ηλικία και φύλο: στις μη ενδημικές περιοχές, όπου η νόσος θεωρείται επαγγελματική, η συχνότητα είναι πολύ μεγαλύτερη στους άνδρες ηλικίας 20-45 ετών. Αντίθετα στις ενδημικές περιοχές και πολύ περισσότερο στις αναπτυσσόμενες χώρες, η συχνότητα μεταξύ ανδρών και γυναικών είναι η ίδια. Επίσης η συχνότητα εμφάνισης στα παιδιά είναι πολύ υψηλή σχετιζόμενη με την κατανάλωση μολυσμένων τροφίμων και η βρουκέλλωση αποτελεί ένα σημαντικό παιδιατρικό νόσημα.

Βιοτρομοκρατία: η *B. melitensis* και η *B. suis* έχουν χρησιμοποιηθεί για την πειραματική παρασκευή βιολογικών όπλων, ειδικά στις ΗΠΑ, επειδή πρόκειται για βακτήρια με μεγάλη σταθερότητα στη μορφή αερολύματος και η λοιμογόνος δόση τους είναι πολύ μικρή. Θα μπορούσαν, λοιπόν, να χρησιμοποιηθούν για τη μόλυνση μεγάλων πληθυσμών ανθρώπων ή ζώων, γι' αυτό και οι υγειονομικές αρχές των

προηγμένων χωρών οφείλουν να επαγρυπνούν για την προστασία από μια τέτοια πηγή μόλυνσης. Ένα θεωρητικό μοντέλο μιας τέτοιας τρομοκρατικής ενέργειας, αναφέρει ότι ενδεχόμενη επίθεση σε πληθυσμό 100.000 ατόμων, θα είχε ως αποτέλεσμα 82.500 κρούσματα με 413 θανάτους, ενώ το κόστος μόνο για τη θεραπευτική αντιμετώπιση των νοσούντων θα ανερχόταν σε 477,7 εκατομμύρια δολάρια (Guihot A. et al 2004, Godfroid J. et al 2005, Pappas G. et al 2006a).

3.3.3 Πρόληψη της νόσου

Ο συχνότερος τρόπος μετάδοσης της βρουκέλλωσης στον άνθρωπο είναι η άμεση ή έμμεση επαφή του με μολυσμένα ζώα ή τα προϊόντα τους. Σε πολλές αναπτυσσόμενες χώρες, όπου η βρουκέλλωση αποτελεί σημαντική νοσολογική οντότητα, η πρόληψη της νόσου με την εξάλειψη-εκρίζωσή της από τα ζώα είναι πέρα από τις σημερινές οικονομικές και ανθρώπινες δυνατότητες. Το ίδιο θα μπορούσε κάποιος να υποστηρίξει και για τις αναπτυσσόμενες χώρες. Όταν το κόστος του προγράμματος εκρίζωσης της νόσου κόστισε 866.524.579 δολάρια για 20 χρόνια εφαρμογής στις Η.Π.Α. (Wise R.I. 1980) και στην Ελλάδα μόνο για το 1996 δαπανήθηκαν περίπου 3.300.000.000 δρχ (Χατζηχριστοδούλου Χ. 1997), γίνεται εύκολα κατανοητό, ότι η πρόληψη της νόσου πρέπει να βασίζεται πρωτίστως στην αποφυγή της έκθεσης του ανθρώπου στο μολυσματικό παράγοντα και δευτερευόντως στον έλεγχο της νόσου στα ζώα. Ο συνδυασμός των δύο αυτών κατευθύνσεων είναι η χρυσή τομή μιας επιτυχημένης πολιτικής πρόληψης της νόσου.

3.3.3.1 Αποφυγή της έκθεσης του ανθρώπου στη βρουκέλλωση

Περιλαμβάνει βασικά και σύνθετα μέτρα πρόληψης σε διάφορα επίπεδα:

α) Πρόληψη της νόσου στις επαγγελματικές ομάδες υψηλού κινδύνου: τα βασικά μέτρα πρόληψης βασίζονται στην προσωπική υγιεινή των επαγγελματιών που έρχονται σε επαφή με μολυσμένα ζώα (κτηνοτρόφοι, κτηνίατροι, εργαστηριακοί κλπ) και είναι η χρήση προστατευτικών γαντιών, ολόσωμων φορμών και μποτών, ειδικών масκών για την προστασία του επιπεφυκότα και του αναπνευστικού, καθώς και η σχολαστική απολύμανση των χεριών μετά από κάθε ύποπτη επαφή. Τα σύνθετα μέτρα είναι η απολύμανση των ρούχων και των εργαλείων με συγκεκριμένες μεθόδους και απολυμαντικά, καθώς επίσης και οι τακτικοί ορολογικοί έλεγχοι των επαγγελματιών ώστε να υπάρχει σωστή ιατρική επιτήρηση (WHO Guidance 2003).

β) Πρόληψη της νόσου με εφαρμογή μέτρων υγιεινής στις μονάδες: πέρα από τη χρήση των προστατευτικών μέσων (γάντια, μάσκες κλπ) επιβάλλεται η άμεση απομάκρυνση των αποβληθέντων εμβρύων και πλακούντων από το δάπεδο του στάβλου, η καθημερινή απομάκρυνση της κόπρου και η αλλαγή της στρωμνής, η απολύμανση των οχημάτων που εισέρχονται και εξέρχονται από τη μονάδα, η

αντικατάσταση των μολυσμένων ζώων που απομακρύνονται να μη γίνεται πριν από την απολύμανση της μονάδας και την πάροδο τουλάχιστον 4 εβδομάδων και η τακτική απολύμανση κτιρίων, εργαλείων και εξοπλισμού (WHO Guidance 2003).

γ) Πρόληψη της νόσου κατά τη σφαγή και το χειρισμό του κρέατος: από τη στιγμή που ο κίνδυνος μόλυνσης του προσωπικού κατά τη διάρκεια της σφαγής και του χειρισμού των σφαγίων είναι πολύ μεγάλος (Karimi A. et al 2003), επιβάλλεται η λήψη προστατευτικών μέσων κατά τη διάρκεια της σφαγής, όπως η χρήση όλων των δυνατών προληπτικών μέσων (γάντια, μάσκες, φόρμες, μπότες κλπ) και η απαγόρευση του καπνίσματος και του φαγητού στους χώρους εργασίας. Ιδανικό μέτρο είναι η ύπαρξη ειδικού σφαγείου, σε αντίθετη περίπτωση όμως επιβάλλεται η σφαγή των βρουκελλικών ζώων μετά το πέρας της καθημερινής προγραμματισμένης εργασίας και η απολύμανση όλων των χώρων μετά το τέλος της σφαγής. Εννοείται ότι είναι επιτακτική η ανάγκη του τακτικού ορολογικού ελέγχου των εργαζομένων (Jamieson J.A. et al 1981) και η άμεση θεραπευτική αντιμετώπιση των ασθενών, καθώς και η προληπτική χορήγηση αντιβιοτικών σε περίπτωση υποψίας μόλυνσης.

δ) Πρόληψη της νόσου σε επίπεδο εργαστηρίου: η βρουκέλλα ανήκει στην κατηγορία κινδύνου (Risk Group) III, επομένως πρέπει ως τέτοιος μικροοργανισμός να αντιμετωπίζεται στο εργαστήριο. Η μόλυνση των εργαστηριακών που έρχονται σε επαφή με μολυσμένα υλικά είναι πολύ συχνή (Yagupsky P. et al 2000, Bouza E. et al 2005, Yagupsky P. & Baron J.E. 2005), επομένως μια σειρά μέτρων προστασίας κατά τη διάρκεια της εργασίας είναι απαραίτητη. Όλες οι εργασίες θα πρέπει να γίνονται με τη χρήση θαλάμου νηματικής ροής τάξης III (WHO Guidance 2003) και με το προσωπικό να χρησιμοποιεί όλα τα ενδεδειγμένα μέσα προστασίας, που έχουν αναφερθεί παραπάνω. Η απολύμανση όλων των χώρων, υλικών, εξοπλισμού, πάγκων εργασίας κλπ πρέπει να είναι καθημερινή, μετά το τέλος της εργασίας. Οι ορολογικοί έλεγχοι πρέπει να είναι τακτικοί και η χορήγηση θεραπευτικών ή προληπτικών σχημάτων αντιβίωσης άμεση, σε περίπτωση υποψίας έκθεσης στο μολυσματικό παράγοντα (Robichaud S. et al 2004).

ε) Πρόληψη της τροφιμογενούς μετάδοσης της νόσου: όσον αφορά στο γάλα και στα γαλακτοκομικά προϊόντα το κύριο μέτρο πρόληψης είναι η παστερίωση του και η παραγωγή κρέμας, φέτας, γιαουρτιού και βουτύρου από παστεριωμένο γάλα. Ειδικά για το μαλακό τυρί (φέτα), όταν δε χρησιμοποιείται παστεριωμένο γάλα, πρέπει να παραμένει για ωρίμανση τουλάχιστον επί 3 μήνες και το ιδανικότερο επί 6 μήνες, έτσι ώστε το pH του να κατέλθει στο 3,5. Τα σκληρά τυριά αποτελούν μικρότερο κίνδυνο, επειδή η διαδικασία παρασκευής τους είναι διαφορετική. Σε περίπτωση που είναι αδύνατη η παστερίωση του γάλακτος, θα πρέπει πριν την κατανάλωση να θερμανθεί για αρκετά λεπτά στους 80-85°C ή να βράσει στους 100°C. Το κρέας, καθώς και όλα

τα εδώδιμα παραπροϊόντα των σφαγίων (νεφροί, ήπαρ, σπλήνας κλπ), δεν αποτελούν κίνδυνο εφ' όσον μαγειρεύονται με το σωστό τρόπο και στη σωστή θερμοκρασία. Η επεξεργασία του κρέατος με τις μεθόδους της κάπνισης, της αλάτισης, της αποξηράνσης ή της κατάψυξης, δεν καταστρέφει τις βρουκέλλες, επομένως δεν αποτελεί μέθοδο εξουγίανσης του (WHO Guidance 2003).

στ) Ειδικά μέτρα πρόληψης – εμβολιασμός με ανθρώπινα εμβόλια : εδώ και αρκετές δεκαετίες έχουν γίνει πολλές προσπάθειες για την παραγωγή ενός ασφαλούς εμβολίου κατά της βρουκέλλωσης, που θα προκαλεί ικανοποιητική και μακροχρόνια ανοσία στον άνθρωπο. Με το δεδομένο ότι η εκρίζωση της νόσου είναι πάρα πολύ δύσκολη, αν όχι αδύνατη, ένα τέτοιο εμβόλιο θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί σε μη ενδημικές περιοχές για την ανοσοποίηση και προστασία των ομάδων υψηλού κινδύνου, όπως οι σφαγείς, οι κτηνοτρόφοι και οι κτηνίατροι (Roux J. 1972, 1979). Αντίθετα στις ενδημικές περιοχές όπως η χώρα μας, όπου όλος ο πληθυσμός διατρέχει τον κίνδυνο να μολυνθεί, είτε λόγω καθημερινής επαφής με μολυσμένα ζώα, είτε λόγω κατανάλωσης μη παστεριωμένου γάλακτος και μολυσμένων γαλακτοκομικών προϊόντων, ο μαζικός εμβολιασμός του πληθυσμού θα μπορούσε να αποτελέσει ένα προληπτικό μέτρο πρώτης γραμμής έως ότου αποδώσουν τα προγράμματα πρόληψης και εκρίζωσης της νόσου στα ζώα (Χατζηχριστοδούλου Χ. 1997).

Ο εμβολιασμός με εμβόλια που περιέχουν ζωντανούς μικροοργανισμούς ελαττωμένης λοιμογόνου δύναμης αποδείχθηκε αποτελεσματικός και τέτοια εμβόλια έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως (Sumarokov A.A. et al 1984). Όμως η μικρή έστω πιθανότητα πρόκλησης οξείας βρουκέλλωσης σε ένα ποσοστό του εμβολιαζόμενου πληθυσμού, καθιστά τη χρήση των εμβολίων αυτών από προβληματική έως απαγορευτική (Spink W. et al 1962).

Τα εμβόλια που έχουν χρησιμοποιηθεί μέχρι σήμερα είναι τα παρακάτω:

α) Στέλεχος B. abortus 19-BA : χρησιμοποιήθηκε από το 1952 στην πρώην Σοβιετική Ένωση. Χορηγούνταν με σκαριφισμό και έδινε το μέγιστο της ανοσίας περίπου 5-6 μήνες μετά τη χορήγηση. Εμφάνιζε ήπια τοπική αντίδραση σε ποσοστό 75%, ενώ σοβαρότερες παρενέργειες παρουσιαζόταν στο 3-7% των εμβολιασθέντων. Μετά από επιδημιολογικές μελέτες αποδείχθηκε ότι το εμβόλιο ήταν αποτελεσματικό ιδιαίτερα στις περιοχές υψηλού κινδύνου, όπου η μείωση των αναφερθέντων περιστατικών ήταν ιδιαίτερα υψηλή. Στην πράξη όμως η χρήση του εγκαταλείφθηκε γιατί προκαλούσε υπερευαισθησία, ιδιαίτερα μετά από επανειλημμένες δόσεις, και γιατί υπήρχαν πολλές αντενδείξεις στη χορήγηση του (Elberg S.S. 1981, WHO Guidance 2003). Εδώ πρέπει να τονιστεί ότι εμβόλιο με το

παραπάνω στέλεχος χρησιμοποιήθηκε και στη χώρα μας για ερευνητικούς σκοπούς (Χατζηχριστοδούλου Χ. 1997).

β) Στέλεχος B. abortus 104M : χρησιμοποιείται στην Κίνα με ενδείξεις περίπου παρόμοιες με αυτές του προηγούμενου εμβολίου, αλλά το στέλεχος αυτό αποδείχθηκε πολύ πιο λοιμογόνο, με μεγάλα ποσοστά γενικευμένων παρενεργειών, ενώ ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δοθεί στην αποφυγή του εμβολιασμού ατόμων που έχουν ευαισθητοποιηθεί ύστερα από προηγούμενη έκθεση στο εμβόλιο ή σε φυσική νόσο (Elberg S.S. 1981, WHO Guidance 2003).

γ) Στέλεχος B. melitensis M15 : παρασκευάστηκε στη Γαλλία από τον Roux και τους συνεργάτες του το 1967 και το αντιγόνο αποτελείται από τμήμα του κυτταρικού τοιχώματος (πεπτιδογλυκάνη). Ακολούθως το ίδιο πεπτιδογλυκανικό τμήμα παρασκευάστηκε και από το στέλεχος B. abortus B19. Το τελευταίο δοκιμάστηκε κυρίως σε ομάδες υψηλού κινδύνου, όπου αποδείχθηκε ότι οι παρενέργειες του ήταν πολύ ήπιες, δεν προκαλούσε υπερευαισθησία και δεν ήταν τοξικό. Προήγαγε όμως κυρίως τη χυμική ανοσία, με αποτέλεσμα η ανοσοποίηση να διαρκεί μικρό χρονικό διάστημα. Σήμερα η παραγωγή του εμβολίου αυτού έχει σταματήσει (Elberg S.S. 1981, WHO Guidance 2003).

δ) Brucella Chemical Vaccine (BCV) : παρασκευάστηκε στη Ρωσία, αποτελείται από σύμπλοκο πρωτεΐνης-πολυσακχαρίτη του κυτταρικού τοιχώματος στελέχους B. abortus 19-BA. Δεν εμφανίζει επιπλοκές και παρενέργειες, ειδικά σε άτομα που έχουν ευαισθητοποιηθεί από προηγούμενη έκθεση. Εμφανίζει περίπου την ίδια αποτελεσματικότητα με το αντίστοιχο ζωντανό εμβόλιο και πολύ λιγότερες τοπικές αντιδράσεις, ενώ μπορεί να χρησιμοποιηθεί χωρίς προβλήματα για αναμνηστικούς εμβολιασμούς. Παρ' όλα αυτά τα πλεονεκτήματα, η χρήση του δε διαδόθηκε και χρειάζεται παραπέρα έρευνα και εκτίμηση (WHO Guidance 2003).

Την τελευταία δεκαετία οι προσπάθειες παρασκευής εμβολίων κατά της βρουκέλλωσης έχουν στραφεί κυρίως στη μοριακή βιολογία. Δοκιμάστηκαν διάφορα ανοσοδιεγερτικά αντιγόνα σε πειραματόζωα: ένα σύμπλοκο πρωτεΐνης-πολυσακχαρίτη από το στέλεχος B. melitensis B115 (Zygmunt M.S. 1994) και η πρωτεΐνη BCSP από το στέλεχος B. abortus B19 που χρησιμοποιήθηκε από τον Pugh G.W. και τους συνεργάτες του το 1994. Οπωσδήποτε όμως θα περάσουν πολλά χρόνια μέχρι να δοκιμαστούν τα εμβόλια αυτά σε ανθρώπινο πληθυσμό, με δεδομένη και την έλλειψη ενδιαφέροντος από τις φαρμακευτικές εταιρείες για την παρασκευή εμβολίου κατά της βρουκέλλωσης.

4. ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ

Η είσοδος των βρουκελλών στον οργανισμό, όπως προαναφέρθηκε, μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσω διαφόρων οδών (αναπνευστικό σύστημα, πεπτικό σύστημα, δέρμα κλπ). Αμέσως μετά την είσοδο και ανεξάρτητα από την οδό, στο σημείο εισόδου διαπιστώνεται κινητοποίηση μονοπύρηνων και πολυμορφοπύρηνων λευκοκυττάρων, τα οποία φαγοκυτταρώνουν τις βρουκέλλες, αποτελώντας την πρώτη γραμμή άμυνας του οργανισμού, όπως συμβαίνει και με κάθε άλλη λοίμωξη. Το παράδοξο όμως είναι ότι οι βρουκέλλες, όχι απλώς επιβιώνουν με διάφορους μηχανισμούς μέσα στα φαγοκύτταρα, αλλά και πολλαπλασιάζονται σε μεγάλους αριθμούς, οδηγώντας στο θάνατο των φαγοκυττάρων και την απελευθέρωση τους στο αίμα. Ακολουθεί μια σύντομη φάση βακτηριαιμίας και οι βρουκέλλες φθάνουν στους επιχώριους λεμφαδένες και σε διάφορα όργανα, κυρίως σ' αυτά που είναι πλούσια σε κύτταρα του δικτυοενδοθηλιακού συστήματος (ήπαρ, σπλήνας). Μπορούν επίσης να προσβληθούν και άλλα όργανα, όπως η καρδιά, οι πνεύμονες, οι νεφροί, το Κ.Ν.Σ., τα γεννητικά όργανα, οι αρθρώσεις κλπ. (Corbel M.J. & MacMillan A.P. 1998).

4.1 Χρόνος επώασης

Είναι αρκετά δύσκολο να καθοριστεί ο ακριβής χρόνος επώασης της νόσου ειδικά στις ενδημικές περιοχές, όπου ο πληθυσμός είναι εκτεθειμένος στο μικροοργανισμό συνεχώς. Διάφοροι συγγραφείς εκτιμούν ότι ο χρόνος επώασης κυμαίνεται από 1 εβδομάδα μέχρι 6 μήνες (Madkour M. 1989, Young E.J. & Corbel M.J. 1989, Tumbay E. et al 1991, Young E.J. 1995, Corbel M.J. & MacMillan A.P. 1998). Ο Morales-Otero υπολόγισε το χρόνο επώασης, σε εθελοντές μετά την είσοδο του μικροοργανισμού από το δέρμα, σε 29 έως 35 ημέρες.

4.2 Κλινική εικόνα

Η κλινική εικόνα της βρουκέλλωσης δεν είναι χαρακτηριστική και μπορεί να μοιάζει με πολλά λοιμώδη και μη λοιμώδη νοσήματα. Ο χρόνος επώασης, η ένταση των κλινικών συμπτωμάτων και η μορφή της νόσου εξαρτώνται από πολλούς παράγοντες, οι σπουδαιότεροι των οποίων είναι:

α) το είδος της βρουκέλλας: η *B. melitensis* έχει την ισχυρότερη λοιμογόνο δύναμη και προκαλεί νόσο οξεία και γενικευμένη με σοβαρές επιπλοκές, η *B. abortus* συνήθως συνδέεται με σποραδική νόσο με χαρακτηριστικό το σχηματισμό κοκκιωμάτων και αυτοϋφιέμενη πορεία εντός έτους, ενώ η *B. suis* συνήθως προκαλεί εστιακή νόσο με χρόνια πορεία και σχηματισμό αποστημάτων (Αντωνιάδου Α. 2002).

- β) η λοιμογόνος δύναμη του στελέχους
- γ) το μέγεθος του ενοφθαλμίσματος
- δ) η οδός μόλυνσης
- ε) η ανθεκτικότητα του ατόμου – ξενιστή.

Τα συμπτώματα είναι πολλά και ποικίλα και η νόσος μπορεί να έχει οξεία έναρξη με υψηλό πυρετό μέσα σε 1-2 μέρες ή αμβληχρή με χαμηλό πυρετό μέσα σε 1-2 εβδομάδες. Η συνήθης κλινική εικόνα περιλαμβάνει διαλείποντα πυρετό 38-41°C, συνήθως απογευματινό που συνοδεύεται από έντονο ρίγος, ναυτία και μυϊκό τρόμο. Αφού ο πυρετός φτάσει στο μέγιστο, γρήγορα υποχωρεί στα φυσιολογικά επίπεδα, ενώ η πτώση αυτή συνοδεύεται από έντονη εφίδρωση. Ο χαρακτηριστικός κυματοειδής πυρετός συνήθως συναντάται στις χρόνιες μορφές της νόσου που παρέμειναν χωρίς θεραπεία (Corbel M.J. & MacMillan A.P. 1998).

Εκτός από τα παραπάνω συμπτώματα, η βρουκέλλωση μπορεί να εμφανίσει πλήθος εκδηλώσεων και επιπλοκών, σχεδόν από όλα τα συστήματα.

4.2.1 Κλινικές εκδηλώσεις βρουκέλλωσης από τα διάφορα συστήματα

Μυοσκελετικό σύστημα: ιερολαγονίτιδα, περιφερικές αρθρίτιδες, σπονδυλίτιδα, περιαρθρική φλεγμονή, θυλακίτιδα, οστεομυελίτιδα, τενοντοελυτρίτιδα.

Αναπνευστικό σύστημα: βρογχίτιδα, δύσπνοια, βήχας, διάμεση πνευμονίτιδα, πνευμονία, πλευριτική συλλογή, εμπύημα.

Κυκλοφορικό σύστημα: ενδοκαρδίτιδα, περικαρδίτιδα, βαλβιδοπάθειες, θρόμβωση περιφερικών αγγείων, ανεύρυσμα αορτής και εγκεφαλικών αγγείων, λεμφαδενίτιδα.

Κ.Ν.Σ. και Π.Ν.Σ.: εγκεφαλίτιδα, μηνιγγίτιδα, οξεία και χρόνια μηνιγγοεγκεφαλίτιδα, αγγειίτιδα των εγκεφαλικών αγγείων, εγκεφαλικά και επισκληρίδια αποστήματα έμφρακτα και εγκεφαλική αιμορραγία, νευρίτιδα και ριζίτιδα, περιφερική πολυνευροπάθεια, σύνδρομο Guillain-Barré, poliomyelitis-like syndrome.

Γαστρεντερικό σύστημα: ανορεξία, απώλεια βάρους, ναυτία, έμετοι, επιγαστρική δυσφορία και άλγος, ειλεΐτιδα, κολίτιδα, παγκρεατίτιδα, ηπατίτιδα, σπληνομεγαλία, ασκίτης.

Ουρογεννητικό σύστημα: ορχεοεπιδιδυμίτιδα, ουρολοιμώξεις, νεφρίτιδα, χρόνια πυελονεφρίτιδα, ουρηθρίτιδα, αποβολή.

Αιμοποιητικό σύστημα: παγκυτταροπενία, θρομβοκυτταροπενία, αιμολυτική αναιμία.

Δέρμα: γενικευμένο ερυθηματώδες εξάνθημα, πορφύρα, κηλιδοβλατιδώδες εξάνθημα.

(Young E.J. 1994, Χατζηχριστοδούλου Χ. 1997, WHO Guidance 2003, Gür A. et al 2003).

4.2.2 Σπάνιες κλινικές εκδηλώσεις

α) από τον **οφθαλμό:** διπλωπία και ιριδοκυκλίτιδα (Hatiroglou C.A. et al 2004) και εκτεταμένη ή ολική αμφοτερόπλευρη τύφλωση (Karapinar B. et al 2005, Tunc M. & Durukan H. 2004),

β) από τα **ώτα:** απώλεια ακοής (Kaygusuz T.O. et al 2005),

γ) από το **θυροειδή:** υποξεία θυροειδίτιδα (Sirmatel F. & Akarsu E. 2004),

δ) από το **Κ.Ν.Σ.:** υποσκληρίδια αιμορραγία (Tuncer E.G. et al 2004), υδροκέφαλος (Colmenero J.D. et al 1996) και εγκεφαλικό κοκκίωμα (Sohn A.H. et al 2003),

ε) από το **μυϊκό σύστημα:** αμφοτερόπλευρα αποστήματα των λαγονοψοϊτών μυών (Romero O.J. et al 2005, Gundes S.G. et al 2005, Colmenero J.D. et al 1996) και αποστήματα των γλουπιαίων μυών (Dakdouk G.K. et al 2002),

στ) από το **πεπτικό σύστημα:** υποξεία χολοκυστίτιδα, ηπατικά αποστήματα (Colmenero J.D. et al 1996), αυτοάνοση ηπατίτιδα (Colakoglu O. et al 2005) και παρωτίτιδα (Dokuzoguz B. et al 2005)

ζ) από το **ουροποιητικό σύστημα:** ακράτεια ούρων (Hatiroglou C.A. et al 2004),

η) έχει αναφερθεί επίσης **οίδημα των κάτω άκρων** (Hatiroglou C.A. et al 2004) και **επίσταξη** (Dokuzoguz B. et al 2005).

4.2.3 Συμπτώματα - Συχνότητα εμφάνισης (%)

Τη συχνότητα εμφάνισης των διαφόρων συμπτωμάτων και κλινικών σημείων της βρουκέλλωσης μελέτησε ο Madkour το 2001, με στοιχεία που συγκέντρωσε από 500 ασθενείς.

Απώλεια ενεργητικότητας	95
Πυρετός	93
Μυαλγίες	91
Εφίδρωση	87
Αρθραλγίες – Οσφραλγία	86
Ρίγος	82
Κεφαλαλγία	81
Ανορεξία	78
Απώλεια βάρους	65
Ραχιαία ευαισθησία	48
Δυσκοιλιότητα	47
Κοιλιακό άλγος	45

Αρθρίτιδα	40
Διαταραχές ύπνου	37
Λεμφαδενοπάθεια	32
Σπληνομεγαλία	25
Όψη πάσχοντος	25
Βήχας	24
Ωχρότητα	22
Ορχίτιδα – Επιδιδυμορχίτιδα	21
Συμπτώματα από το Κ.Ν.Σ.	20
Ηπατομεγαλία	19
Εξάνθημα	14
Διάρροια	7
Καρδιακό φύσημα	3
Ίκτερος	1
Πνευμονία	1

(Madkour M.M. 2001).

Η κλινική εκδήλωση της βρουκέλλωσης συνοδεύεται και από εργαστηριακά ευρήματα που τα σημαντικότερα και συχνότερα είναι: αναιμία (37-48%), λευκοπενία (9-11,5%), λευκοκυττάρωση (5%), λεμφοκυττάρωση (34-41%), θρομβοπενία (3-4%), αύξηση της ταχύτητας καθίζησης ερυθρών (60%), αύξηση της CRP (80%), αύξηση της ALT (30-40%), της AST (45%) και της CK (18%), ενώ στο 20-25% των ασθενών διαπιστώνεται η ύπαρξη του ρευματοειδούς παράγοντα (Gur A. et al 2003, Namiduru M. et al 2003, Bosilkovski M. et al 2007).

Αρκετοί συγγραφείς προσπάθησαν να κατηγοριοποιήσουν τις μορφές της συστηματικής βρουκέλλωσης. Έτσι, ο Spink το 1956 πρότεινε το διαχωρισμό σε οξεία, υποξεία και χρόνια μορφή, ο Martin το 1961 σε βακτηριαμική, ορολογική και εντοπισμένη – μικτή μορφή, ο Young το 1983 σε υποκλινική, βακτηριαμική, ορολογική, εντοπισμένη και χρόνια και ο Madkour το 1989 σε ενεργό που συνοδεύεται ή όχι από εντοπισμένη, χρόνια και υποκλινική μορφή (Araj G.F. 1999).

Ο διαχωρισμός αυτός έχει περισσότερο πρακτική σημασία και η κλινική μορφή της νόσου τίθεται μετά από τα εργαστηριακά ευρήματα (καλλιέργειες αίματος, μυελού των οστών και άλλων ιστών ανάλογα με τα συμπτώματα, ορολογικός έλεγχος).

4.2.4 Κλινικές μορφές βρουκέλλωσης και εργαστηριακός έλεγχος

Κλινική μορφή	Καλλιέργεια	Ορολογικός έλεγχος
Υποκλινική	Αρνητικές	Θετικός
Βακτηριαμική	Θετικές (αίμα - μυελός οστών)	Θετικός
Ορολογική	Αρνητικές	Θετικός
Εντοπισμένη «Χρόνια»	Θετικές (συγκεκριμένοι ιστοί) Αρνητικές	Θετικός ή Αρνητικός Αρνητικός

Υποκλινική μορφή : υπάρχει θετική ορολογική ένδειξη προηγηθείσας βρουκέλλωσης, σε άτομο χωρίς ιστορικό οξείας ή χρόνιας νόσου.

Βακτηριαμική μορφή : συνδέεται με εμφανή συμπτωματολογία και απομόνωση του παθογόνου παράγοντα από το αίμα ή/και από το μυελό των οστών.

Ορολογική μορφή : συνδέεται με την παρουσία υψηλών ή αυξανόμενων τίτλων αντισωμάτων, σε άτομα με πιθανή έκθεση και συμπτώματα συμβατά με τη νόσο.

Εντοπισμένη μορφή : ο παθογόνος παράγοντας απομονώνεται μόνο από συγκεκριμένους ιστούς ή όργανα, από τα οποία προέρχονται και τα συμπτώματα (ιερολαγονίτιδα, ενδοκαρδίτιδα κλπ). Μπορεί να είναι επιπλοκή της βακτηριαμικής μορφής ή κύρια και μόνη εκδήλωση της χρόνιας μορφής.

Χρόνια μορφή : αφορά σε ασθενείς που αναφέρουν συμπτώματα για χρονικό διάστημα μεγαλύτερο των 12 μηνών μετά από τη διάγνωση της νόσου. Με εξαίρεση την υποτροπή ή την ατελή θεραπεία, αναφέρεται ότι ποσοστό 20% των ασθενών, εξακολουθούν να παρουσιάζουν ενοχλήματα που θυμίζουν σύνδρομο χρόνιας κόπωσης χωρίς άλλα κλινικά ευρήματα. Οι ασθενείς αυτοί τις περισσότερες φορές έχουν ψυχονευρωσικό υπόβαθρο που θέτει σε αμφιβολία την ύπαρξη της χρόνιας βρουκέλλωσης ως παθολογική οντότητα (Αντωνιάδου Α. 2002).

4.3 Διάγνωση

Η διάγνωση της βρουκέλλωσης λόγω των μη ειδικών συμπτωμάτων πρέπει να βασιστεί κατ' αρχάς στη λήψη ενός λεπτομερούς ιστορικού, στο οποίο θα αναζητηθούν όλοι οι πιθανοί παράγοντες κινδύνου (επάγγελμα, τυχαία επαφή με ζώα, κατανάλωση γαλακτοκομικών προϊόντων άγνωστης προέλευσης, ταξίδι σε χώρες όπου το νόσημα ενδημεί και κατανάλωση τοπικών εδεσμάτων ζωικής προέλευσης κλπ), έτσι ώστε να τεθεί η κλινική υποψία της νόσου. Στη συνέχεια είναι απαραίτητη η συνδρομή του εργαστηρίου, όπου θα πρέπει να πραγματοποιηθεί σειρά βακτηριολογικών και ορολογικών εξετάσεων για την επιβεβαίωση της νόσου (WHO Guidance 2003).

Η διάγνωση θεωρείται σίγουρη, μόνο όταν απομονώνεται ο παθογόνος παράγοντας από αιμοκαλλιέργειες ή καλλιέργειες άλλων βιολογικών υλικών.

Η εμφάνιση υψηλού τίτλου αντισωμάτων είναι ενδεικτική, αλλά όχι ασφαλής. Ισχυρότερη ένδειξη αποτελεί ο αυξανόμενος τίτλος αντισωμάτων σε επαναλαμβανόμενες ορολογικές εξετάσεις (Young E.J. 1995).

Στις ενδημικές περιοχές, όπου ο πληθυσμός έρχεται σε καθημερινή επαφή με τον παθογόνο παράγοντα, υπάρχει πρόβλημα ερμηνείας και αξιολόγησης των εργαστηριακών ευρημάτων. Για παράδειγμα, στη διεθνή βιβλιογραφία αναφέρεται ως θετικός στη δοκιμή Wright ο τίτλος που είναι $\geq 1:160$. Παρ' όλα αυτά σε περιοχές όπως η Σ. Αραβία και άλλες χώρες της Μ. Ανατολής, όπου η βρουκέλλωση ενδημεί, ο τίτλος αυτός μπορεί να συναντάται σε μεγάλο ποσοστό του πληθυσμού που δε νοσεί. Έτσι στις περιοχές αυτές θετικός πρέπει να θεωρείται τίτλος υψηλότερος του 1:160, δηλαδή $\geq 1:320$ ή $\geq 1:640$ (Madkour M. 1989, Allballa S.R. 1995).

Σε οροεπιδημιολογική μελέτη που έκανε ο Herrero (Herrero H. et al 1989), μελετώντας το Μεσογειακό κηλιδοβλατιδώδη πυρετό, κατέληξε στο συμπέρασμα ότι ο τίτλος αντισωμάτων που θεωρείται ενδεικτικός νόσου, πρέπει να είναι αυτός, στον οποίο το 98% του πληθυσμού είναι αρνητικό.

Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO) και το Κέντρο Ελέγχου Νοσημάτων των ΗΠΑ (CDC), ο ορισμός μιας περίπτωσης ως βρουκέλλωση περιλαμβάνει τα παρακάτω:

Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (WHO)

Κλινική εικόνα: νόσος που χαρακτηρίζεται από οξεία ή σταδιακή έναρξη, και συνοδεύεται από συνεχή, διαλείποντα ή ακανόνιστο πυρετό ποικίλης διάρκειας, υπερβολική εφίδρωση ιδιαίτερα τη νύχτα, κόπωση, ανορεξία, απώλεια βάρους, κεφαλαλγία, αρθραλγία και γενικευμένο άλγος. Μπορεί να παρατηρηθεί εντοπισμένη λοίμωξη διαφόρων οργάνων.

Εργαστηριακά κριτήρια για την διάγνωση:

- Απομόνωση της βρουκέλλας από κλινικό δείγμα, ή
- Τίτλος συγκόλλησης (πχ SAT $> 1:160$) σε ένα ή περισσότερα δείγματα αίματος, που λήφθηκαν μετά την έναρξη των συμπτωμάτων, ή
- Θετικός τίτλος σε μία από τις παρακάτω μεθόδους: ELISA (IgA, IgG, IgM), 2-mercaptoethanol test, αντίδραση σύνδεσης συμπληρώματος, αντίδραση Coombs, ραδιοανοσολογική μέθοδος (RIA), αντίθετη ανοσοηλεκτροφόρηση (Counterimmunoelectrophoresis - CIEP) και fluorescent antibody test (FAT).

Χαρακτηρισμός περίπτωσης

- **Ύποπτη:** περίπτωση, η οποία έχει συμβατή κλινική εικόνα και συνδέεται επιδημιολογικά, με ύποπτη ή επιβεβαιωμένη περίπτωση βρουκέλλωσης σε ζώο ή με μολυσμένα ζωικά προϊόντα
- **Πιθανή:** μια ύποπτη περίπτωση, η οποία εμφανίζει θετική αντίδραση στη μέθοδο Rose Bengal
- **Επιβεβαιωμένη:** μια ύποπτη ή πιθανή περίπτωση η οποία επιβεβαιώνεται εργαστηριακά (WHO, online).

Κέντρο Ελέγχου Νοσημάτων ΗΠΑ (CDC)

Κλινική εικόνα: νόσος που χαρακτηρίζεται από οξεία ή σταδιακή εμφάνιση πυρετού, νυκτερινών εφιδρώσεων, εύκολης κόπωσης, ανορεξίας, απώλειας βάρους, κεφαλαλγίας και αρθραλγίας.

Εργαστηριακά κριτήρια για την διάγνωση:

- Απομόνωση της βρουκέλλας από κλινικό δείγμα, ή
- Τετραπλάσιος ή μεγαλύτερος τίτλος συγκόλλησης μεταξύ της οξείας φάσης και της φάσης ανάρρωσης σε δύο δείγματα αίματος, που λαμβάνονται σε χρονικό διάστημα ίσο ή μεγαλύτερο των δύο εβδομάδων και εξετάζονται στο ίδιο εργαστήριο, ή
- Θετικό αποτέλεσμα σε κλινικό δείγμα που εξετάζεται με τη μέθοδο του ανοσοφθορισμού.

Χαρακτηρισμός περίπτωσης:

- **Πιθανή :** περίπτωση η οποία εμφανίζει κλινική εικόνα συμβατή με αυτή της βρουκέλλωσης και συνδέεται επιδημιολογικά με επιβεβαιωμένη περίπτωση ή εμφανίζει θετικό ορολογικό έλεγχο (πχ SAT >1:160), σε ένα ή περισσότερα δείγματα, που λαμβάνονται μετά την έναρξη των συμπτωμάτων
- **Επιβεβαιωμένη :** περίπτωση, η οποία έχει συμβατή κλινική εικόνα και θετικό ορολογικό έλεγχο (CDC 1997, online).

Στις χώρες όπου η νόσος ενδημεί, οι επιβεβαιωμένες περιπτώσεις βρουκέλλωσης στον άνθρωπο βασίζονται στην κλινική εικόνα και στο θετικό ορολογικό έλεγχο, χωρίς προσπάθεια να απομονωθεί η βρουκέλλα από το αίμα ή άλλους ιστούς. Αντίθετα στις χώρες όπου η βρουκέλλωση έχει εκριζωθεί από το ζωικό κεφάλαιο, για κάθε ύποπτη περίπτωση βρουκέλλωσης στον άνθρωπο, ειδικά όταν επιβεβαιώνεται ορολογικά, είναι απαραίτητη η επιδημιολογική διερεύνηση, για να επιβεβαιωθεί. Και αυτό γιατί είναι γνωστό ότι καμία ορολογική μέθοδος διάγνωσης της βρουκέλλωσης δεν έχει ευαισθησία και ειδικότητα που να ανέρχονται στο 100%. Έτσι σε χώρες μη ενδημικές, εφ' όσον δεν υπάρχει επιδημιολογική συσχέτιση με τη

νόσο, η βρουκέλλωση δεν πρέπει να περιλαμβάνεται στη διαφορική διάγνωση και ο θετικός ορολογικός έλεγχος πρέπει να θεωρείται ψευδώς θετικός (Godfroid J. et al 2005).

4.4 Θεραπευτική αγωγή

Τα κριτήρια για την επιτυχή θεραπευτική αντιμετώπιση της βρουκέλλωσης στον άνθρωπο είναι τα εξής:

- Χρήση αποτελεσματικών στην κλινική πράξη αντιβιοτικών που να διαπερνούν τους διάφορους ιστούς και να εισέρχονται στα κύτταρα, γιατί η βρουκέλλα είναι ενδοκυττάριος μικροοργανισμός
- Η προσπάθεια θεραπευτικής αντιμετώπισης είναι καλύτερα να συνοδεύεται από τη νοσηλεία στο νοσοκομείο, τουλάχιστον στα αρχικά στάδια
- Η χορήγηση του θεραπευτικού σχήματος επιλογής είναι καλύτερα να ξεκινά όσο το δυνατό νωρίτερα και να χορηγείται για αρκετό διάστημα μετά την κλινική ίαση
- Να υπάρχουν εναλλακτικά θεραπευτικά σχήματα (όχι μόνο φαρμακευτικά), ιδιαίτερα στους ασθενείς με επιπλοκές.

Παρά το γεγονός ότι τα πρώτα θεραπευτικά σχήματα για την αντιμετώπιση της βρουκέλλωσης έχουν προταθεί εδώ και αρκετές δεκαετίες και πολλά νέα αντιβιοτικά έχουν ανακαλυφθεί, τα δεδομένα δεν έχουν αλλάξει πολύ.

Πολλά αντιβιοτικά έχουν προταθεί, είτε ως μονοθεραπεία, είτε ως συνδυασμός περισσότερων του ενός, λίγα όμως από αυτά έχουν αποδειχθεί ότι μπορούν να αντιμετωπίσουν με επιτυχία *in vivo* τη βρουκέλλα.

Οι πενικιλίνες, οι κεφαλοσπορίνες και από τα μακρολίδια η ερυθρομυκίνη και η σπειραμυκίνη (Geyik M.F. et al 2003), έχουν πολύ καλά αποτελέσματα *in vitro*, στην κλινική πράξη όμως εμφανίζουν απρόσμενα υψηλά ποσοστά υποτροπών. Ακόμη και τα νεώτερα μακρολίδια αζιθρομυκίνη και κλαριθρομυκίνη, παρά το γεγονός ότι *in vitro* έχουν καλύτερα αποτελέσματα από την ερυθρομυκίνη, στην πράξη εμφανίζουν και αυτά υψηλά ποσοστά υποτροπών (El-Miedany Y.M. et al 2003, WHO Guidance 2003).

4.4.1 Θεραπεία της μη επιπλεγμένης βρουκέλλωσης στους ενήλικες και σε παιδιά ηλικίας μεγαλύτερης των 8 ετών.

Τετρακυκλίνες

Υδροχλωρική τετρακυκλίνη: είναι από τα αντιβιοτικά που πρώτα προτάθηκαν για τη θεραπεία της βρουκέλλωσης είτε ως μονοθεραπεία, είτε σε συνδυασμό με άλλα. Χορηγείται σε δόση 500 mg/ 6ωρο *per os* για 6 εβδομάδες.

Δοξυκυκλίνη: είναι μακράς δράσης συνθετικό ανάλογο της τετρακυκλίνης, μπορεί να χορηγηθεί άπαξ ημερησίως και εμφανίζει λιγότερες ανεπιθύμητες ενέργειες από το γαστρεντερικό σε σχέση με την τετρακυκλίνη. Χορηγείται σε δόση 200 mg/24ωρο ή 100 mg/12ωρο per os για 6 εβδομάδες

Αμινογλυκοσίδες

Στρεπτομυκίνη: έχει αποδειχθεί ότι εμφανίζει μεγάλη αποτελεσματικότητα και περιλαμβάνεται σχεδόν πάντα στα θεραπευτικά σχήματα, παρά τις πολλές ανεπιθύμητες ενέργειες. Χορηγείται σε δόση 1 gr/24ωρο im για 2-3 εβδομάδες πάντα σε συνδυασμό με τετρακυκλίνη ή δοξυκυκλίνη.

Γενταμικίνη: είναι περισσότερο δραστική από τη στρεπτομυκίνη και όταν χορηγείται άπαξ ημερησίως, δεν εμφανίζει τόσες ανεπιθύμητες ενέργειες. Η δόση είναι 5 mg/24ωρο im ή iv για 7-10 μέρες, πάντα σε συνδυασμό με τετρακυκλίνη ή δοξυκυκλίνη.

4.4.2 Κύρια εναλλακτική θεραπεία

Ριφαμπικίνη: εμφανίζει μεγάλη αποτελεσματικότητα in vitro και διαπερνά σε μεγάλο βαθμό την κυτταρική μεμβράνη των ευκαρυωτικών κυττάρων. Είναι από τις πρώτες εναλλακτικές αγωγές που προτάθηκαν, χορηγείται πάντα σε συνδυασμό με δοξυκυκλίνη ή μινοκυκλίνη (Cascio A. et al 2003) και η δόση της είναι 600-900 mg/24ωρο per os για 6 εβδομάδες.

4.4.3 Δευτερεύουσα εναλλακτική θεραπεία

Φλουοροκινολόνες: εμφανίζουν μεγάλη in vitro αποτελεσματικότητα, έχουν καλή απορροφητικότητα μετά από την per os χορήγηση και διεισδύουν σε μεγάλο βαθμό στα φαγοκύτταρα. Ως μονοθεραπεία εμφανίζουν μεγάλα ποσοστά υποτροπών και χορηγούνται πάντα σε συνδυασμό με δοξυκυκλίνη ή ριφαμπικίνη. Από την ομάδα αυτή η οφλοξασίνη είναι εκείνη που χρησιμοποιείται περισσότερο σε δόση 400 mg/24ωρο για 6 εβδομάδες.

Τριμεθοπρίμη / σουλφαμεθοξαζόλη (TMP/SMZ, co-trimoxazole): χρησιμοποιείται σε σταθερή αναλογία 1:5 δηλαδή 80 mg TMP / 400 mg SMZ ή 160 mg TMP / 800 mg SMZ και η δόση της είναι 160/800 mg/ 8ωρο per os για 2 εβδομάδες, και στη συνέχεια ανά 12ωρο για άλλες 4 εβδομάδες. Η in vitro δραστηριότητα της είναι καλύτερη από οποιοδήποτε άλλο φάρμακο, παρ' όλα αυτά ως μονοθεραπεία εμφανίζει και αυτή μεγάλα ποσοστά υποτροπών. Χορηγείται πάντα σε συνδυασμό με δοξυκυκλίνη, ριφαμπικίνη ή στρεπτομυκίνη. (Joint FAO/WHO 1986, Young E.J. 1995, WHO Guidance 2003).

Ο Turkmani A. και οι συνεργάτες του διερεύνησαν την in vitro ευαισθησία της βρουκέλλας και τα αποτελέσματα στα οποία κατέληξαν, συμφωνούν πλήρως με τα μέχρι τώρα αποτελέσματα προηγούμενων συγγραφέων. Στη μελέτη αυτή

διερευνήθηκαν 11 αντιβιοτικά διαφόρων κατηγοριών. Τη μεγαλύτερη *in vitro* ευαισθησία φαίνεται να εμφανίζει η βρουκέλλα στην τετρακυκλίνη και στη στρεπτομυκίνη και αμέσως μετά στη ριφαμπικίνη. Επίσης, μεγάλη φαίνεται να είναι η ευαισθησία της βρουκέλλας στις κινολόνες και στην TMP/SMZ, ενώ καμία *in vitro* ευαισθησία δεν εμφάνισε στην αμοξικιλίνη, αμπικιλίνη και στο συνδυασμό αμοξικιλίνης-κλαβουλανικού οξέος (Turkmani A. et al 2006).

4.4.4 Προτεινόμενα θεραπευτικά σχήματα

Από τις παραπάνω δραστικές ουσίες, ο FAO/WHO το 1986 πρότεινε τα εξής θεραπευτικά σχήματα τα οποία χρησιμοποιούνται με μικρές διαφορές ακόμη και σήμερα:

- **Τετρακυκλίνη 500 mg/ 6ωρο x 6 εβδομάδες + Στρεπτομυκίνη 1 gr/ 24ωρο x 20 ημέρες**

Με καλή συμμόρφωση του ασθενούς είναι το σχήμα με το χαμηλότερο ποσοστό υποτροπών < 5%. Στο σχήμα αυτό η τετρακυκλίνη μπορεί να αντικατασταθεί με τη δοξυκυκλίνη στη δόση που προαναφέρθηκε (Young E.J. 1995). Το ποσοστό αποτυχίας του σχήματος είναι τότε περίπου 2% (Hurtado R. 2001).

- **Δοξυκυκλίνη 200 mg/ 24ωρο x 6 εβδομάδες + Ριφαμπικίνη 600-900 mg/ 24ωρο x 6 εβδομάδες**

Έχει αποτελέσματα συγκρίσιμα με το προηγούμενο σχήμα και με το δεδομένο ότι και τα δύο φάρμακα χορηγούνται *per os* σε μια ημερήσια πρωινή δόση, επιτυγχάνεται πολύ καλύτερη συμμόρφωση του ασθενούς. Το ποσοστό υποτροπών είναι και εδώ 5-7%, όταν χορηγείται για 6 εβδομάδες, ενώ αυξάνεται στο 35-40%, αν η χορήγηση διακοπεί στις 4 εβδομάδες (Ariza J. et al 1992). Κατά άλλους συγγραφείς αναφέρεται ότι το σχήμα αυτό όταν χορηγείται στη βρουκέλλωση από *B. melitensis*, εμφανίζει ποσοστό υποτροπών περίπου 16%, ενώ το ποσοστό αποτυχίας του σχήματος ανέρχεται σε 8-10% (Hurtado R. 2001, Solera J. et al 2004).

- **TMP/SMZ 160/800 mg/ 8ωρο x 2 εβδομάδες και μετά /12ωρο x 4 εβδομάδες + Δοξυκυκλίνη 200 mg/ 24ωρο x 6 εβδομάδες**

Θεωρείται αποτελεσματικό σχήμα με ποσοστό αποτυχίας περίπου 7% και ποσοστό υποτροπών περίπου 8,5%. Αντί της δοξυκυκλίνης μπορεί να χορηγηθεί ριφαμπικίνη στο γνωστό σχήμα. Τότε τα ποσοστά είναι αντίστοιχα 16,5% και 10% αντίστοιχα (Rousban M.R.H. et al 2004).

4.4.5 Θεραπεία των επιπλεγμένων μορφών βρουκέλλωσης

Σπονδυλίτιδα: χρησιμοποιείται το κλασικό σχήμα Δοξυκυκλίνη + Στρεπτομυκίνη, όπως προαναφέρθηκε με τη διαφορά ότι η διάρκεια της θεραπευτικής αγωγής ανέρχεται σε 8 ή και περισσότερες εβδομάδες. Εφ' όσον χορηγηθεί σωστά, σπάνια χρειάζεται χειρουργική αντιμετώπιση με την τοποθέτηση παροχέτευσης (WHO Guidance 2003).

Νευροβρουκέλλωση: η θεραπεία των επιπλοκών από το Κ.Ν.Σ. παρουσιάζει μια ιδιαιτερότητα λόγω του ότι πρέπει να επιτευχθούν μεγάλες συγκεντρώσεις στο Ε.Ν.Υ. Έτσι χορηγείται το κλασικό σχήμα Δοξυκυκλίνη + Στρεπτομυκίνη, στο οποίο προστίθεται και η ριφαμπικίνη ή η TMP/SMZ στις γνωστές δόσεις ενώ η διάρκεια αυξάνεται κατά πολύ και το σχήμα μπορεί να κριθεί απαραίτητο να χορηγηθεί από 3 - 4 μήνες (Kizilkilic O. et al 2005), μέχρι και 6 - 9 μήνες (Young E.J. 1995).

Ενδοκαρδίτιδα: είναι η επιπλοκή με τα υψηλότερα ποσοστά θνητότητας. Απαιτεί σχεδόν πάντοτε χειρουργική αντικατάσταση των βαλβίδων. Η θεραπευτική αγωγή ξεκινά με το κλασικό σχήμα Δοξυκυκλίνη + Στρεπτομυκίνη, στο οποίο προστίθεται και η ριφαμπικίνη ή η TMP/SMZ στις γνωστές δόσεις και η διάρκεια του σχήματος είναι τουλάχιστον 8 εβδομάδες. Στη συνέχεια πραγματοποιείται η αντικατάσταση των βαλβίδων και χορηγείται εκ νέου το θεραπευτικό σχήμα για αρκετές εβδομάδες ή και μήνες (WHO Guidance 2003).

4.4.6 Θεραπεία της βρουκέλλωσης κατά την διάρκεια της εγκυμοσύνης

Η χορήγηση τετρακυκλινών αντενδείκνυται λόγω της πρόκλησης μόνιμης χρώσης των δοντιών στο έμβryo και λόγω της λιπώδους νέκρωσης του ήπατος ή της παγκρεατίτιδας που μπορούν να προκαλέσουν στη μητέρα. Επίσης η χορήγηση στρεπτομυκίνης αντενδείκνυται λόγω της τοξικής δράσης που έχει στο έμβryo.

Έτσι το μόνο θεραπευτικό σχήμα που μπορεί να δοθεί με σχετική ασφάλεια στη μητέρα είναι η μονοθεραπεία με ριφαμπικίνη στην δόση των 900 mg/ 24ωρο x 6 εβδομάδες, παρά το γεγονός ότι δεν είναι γνωστό αν σχετίζεται με τερατογόνο δράση (Solera J. 2000).

4.4.7 Θεραπεία της βρουκέλλωσης σε παιδιά ηλικίας μικρότερης των 8 ετών

Το αποτελεσματικότερο σχήμα που μπορεί να χρησιμοποιηθεί χωρίς σοβαρές ανεπιθύμητες ενέργειες είναι το εξής: TMP/SMZ 8/40 mg/Kg Σ.Β. ημερησίως διαιρεμένο σε δύο δόσεις για 6 εβδομάδες + Στρεπτομυκίνη 30 mg/Kg Σ.Β. im ημερησίως για 3 εβδομάδες ή Γενταμικίνη 5 mg/Kg Σ.Β. im, iv ημερησίως για 7-10 ημέρες (WHO Guidance 2003) και εναλλακτικά TMP/SMZ 8/40 mg/Kg Σ.Β. ημερησίως διαιρεμένο σε δύο δόσεις για 6 εβδομάδες + Ριφαμπικίνη 15 mg/Kg Σ.Β. για 6 εβδομάδες (Solera J. 2000, Tsofia M. et al 2002).

4.4.8 Προληπτική θεραπευτική αγωγή μετά από έκθεση στον παθογόνο παράγοντα

Η χορήγηση προφυλακτικού σχήματος εξαρτάται από την οδό μόλυνσης. Έτσι, μετά από νύξη με βελόνα κατά τη χρήση εμβολίων REV-1 ή RB-51 η χορήγηση δοξυκυκλίνης στη δόση των 200 mg ημερησίως για 6 εβδομάδες είναι αρκετή. Αν η μόλυνση γίνει μέσω του επιπεφυκότα, τότε χορηγείται ένας από τους γνωστούς συνδυασμούς που προαναφέρθηκαν, σα να έχει ήδη εκδηλωθεί η νόσος (WHO Guidance 2003).

4.5 Παράγοντες κινδύνου για την υποτροπή της νόσου

Ο Ariza J. το 1995 προσπάθησε μελετώντας περισσότερους από 500 ενήλικους ασθενείς να εντοπίσει τυχόν παράγοντες κινδύνου, που θα μπορούσαν να προδιαθέσουν σε υποτροπή της νόσου. Βρέθηκε ότι η χορήγηση «λιγότερο» δραστικών αντιβιοτικών, η θετική αιμοκαλλιέργεια στην έναρξη της νόσου, το άρρεν φύλο, αριθμός αιμοπεταλίων μικρότερος των $150.000/\text{mm}^3$ και διάρκεια νόσου μικρότερη των 10 ημερών πριν τη θεραπευτική αγωγή, είναι παράγοντες κινδύνου που μπορεί να οδηγήσουν σε υποτροπή της νόσου (Ariza J. et al 1995).

5. ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ

Η μόλυνση του ανθρώπινου οργανισμού από είδη του γένους *Brucella* οδηγεί σε σύνθετη ανοσολογική ανταπόκριση, η οποία περιλαμβάνει τόσο την κυτταρική, όσο και τη χυμική ανοσία. Το μέγεθος, το είδος και η διάρκεια της ανταπόκρισης αυτής εξαρτώνται από πολλούς παράγοντες, οι σπουδαιότεροι από τους οποίους είναι: η λοιμογόνος δύναμη του μολύνοντος στελέχους, το μέγεθος του ενοφθαλμίσματος, η ηλικία, το φύλο, η εγκυμοσύνη και η ανοσολογική κατάσταση του πάσχοντος (Joint FAO/WHO 1986).

5.1 Κυτταρική ανοσία

Η κυτταρική ανοσία αρχίζει με την είσοδο των βρουκελλών στον οργανισμό. Τα πρώτα κύτταρα που φθάνουν στην πύλη εισόδου είναι τα μονοπύρηνια και τα πολυμορφοπύρηνια λευκοκύτταρα. Τα λοιμογόνα όμως στελέχη του βακτηρίου μπορούν να αναστείλουν τη χημειοταξία και τη φαγοκυττάρωση, ειδικά από τα πολυμορφοπύρηνια (Ocon P. et al, 1994).

Και στα δύο παραπάνω είδη κυττάρων, οι βρουκέλλες έχουν την ικανότητα να επιζούν. Αυτό συμβαίνει με τρεις βασικούς μηχανισμούς. Ο πρώτος είναι η απελευθέρωση υδατοδιαλυτών παραγόντων που παρεμποδίζουν τη συγχώνευση των φαγοσωματίων με τα λυσοσωμάτια. Ο δεύτερος είναι η αναστολή των ενδοκυτταρικών συστημάτων μυελοπεροξειδάσης-υδρογονοπεροξειδάσης-αλίδης με την απελευθέρωση μονοφωσφορικής αδενίνης και γουανοσίνης, οι οποίες παρεμποδίζουν την αποκοκκίωση. Οι πουρίνες αυτές ή και άλλοι παρόμοιοι παράγοντες παρεμποδίζουν επίσης τις ενδοκυτταρικές οξειδωτικές αντιδράσεις, ενώ εμπλέκονται και στην αναστολή της σύνθεσης και παραγωγής του α-παράγοντα νέκρωσης του όγκου (TNF- α). Τέλος ο τρίτος μηχανισμός είναι η παραγωγή των ενζύμων καταλάσης και copper-zinc superoxide dismutase που προστατεύουν τα βακτήρια από τα συστήματα μυελοπεροξειδάσης-υδρογονοπεροξειδάσης-αλίδης. (Corbel M.J. & MacMillan A.P. 1998, Pappas G. et al 2005).

Η παρουσία των βακτηριδιακών αντιγόνων ενεργοποιεί την παραγωγή των T-λεμφοκυττάρων, που με τη σειρά τους παράγουν ιντερλευκίνες, οι οποίες ενεργοποιούν τα μακροφάγα κύτταρα. Η απελευθέρωση των ιντερλευκινών εξαρτάται από την αναγνώριση των κατάλληλων αντιγόνων από τα T-λεμφοκύτταρα. Ζωντανά βακτήρια που είναι ικανά να προκαλούν επίμονες ενδοκυτταρικές λοιμώξεις, και συγκεκριμένα αντιγόνα, είναι οι πιο αποτελεσματικοί παράγοντες της έναρξης της κυτταρικής ανοσίας.

Η κυτταρική ανοσία σχετίζεται και με την υπερευαισθησία καθυστερημένου τύπου, η οποία εμφανίζεται συνήθως ταυτόχρονα με την αύξηση της βακτηριοκτόνου δράσης των μακροφάγων. Η καθυστερημένου τύπου όμως υπερευαισθησία μπορεί

να εμφανιστεί ακόμη και σε απουσία ικανοποιητικής ανοσολογικής αντίδρασης (Joint FAO/WHO 1986).

Σημαντικό ρόλο στην κυτταρική ανοσία έναντι της βρουκέλλας έχει και η γ-ιντερφερόνη με πολλαπλή δράση: ενεργοποίηση των μακροφάγων, παραγωγή ενεργών ιόντων οξυγόνου και αζωτούχων μορίων, προαγωγή και ενίσχυση της διαφοροποίησης των Τ-λεμφοκυττάρων, παραγωγή ιντερλευκινών και μετατροπή των ανοσοσφαιρινών G σε ανοσοσφαιρίνες G2a. Σε ασθενείς με βρουκέλλωση συνήθως η γ-ιντερφερόνη εμφανίζει αυξημένα επίπεδα στον ορό του αίματος (Dornand J. et al 2002, Pappas G. et al 2005).

5.2 Χυμική ανοσία

Οι ανοσοσφαιρίνες IgM είναι οι πρώτες ανοσοσφαιρίνες που εμφανίζονται είτε μετά από φυσική, είτε μετά από πειραματική μόλυνση με χορήγηση του εμβολίου REV-1. Ανιχνεύονται συνήθως στο τέλος της πρώτης εβδομάδας και ο υψηλότερος τίτλος τους εμφανίζεται την τέταρτη εβδομάδα. Στη συνέχεια, ο τίτλος τους μειώνεται σταδιακά και εξαφανίζονται κατ' άλλους συγγραφείς γρήγορα, ενώ κατ' άλλους παραμένουν σε υψηλά επίπεδα για μεγάλο χρονικό διάστημα (Gazaro E. et al 1989, Ariza J. et al 1992, Pappas G. et al 2005). Τη δεύτερη εβδομάδα εμφανίζονται οι ανοσοσφαιρίνες IgG και σε μερικές περιπτώσεις οι IgA. Οι IgG γρήγορα αυξάνονται και εμφανίζουν τίτλο υψηλότερο από αυτό των IgM, μετά δε τη θεραπευτική αγωγή διατηρούνται για μεγάλο χρονικό διάστημα, ίσως και πέραν του έτους (Lopez-Merino A. & Lopez-Santiago R. 1989, Araj G.F. & Azzam R.A. 1996, Cassataro J. et al 2004, Pappas G. et al 2005).

Στην υποξεία και χρόνια βρουκέλλωση συνήθως δε συναντάται η εικόνα αυτή. Η ανοσολογική αντίδραση περιλαμβάνει την συνεχή παραγωγή σε μικρές ποσότητες ανοσοσφαιρινών IgG και λιγότερο IgA (Corbel M.J. & MacMillan A.P. 1998).

Οι ανοσοσφαιρίνες IgA εμφανίζουν την ίδια δραστηριότητα με τις IgG σε χαμηλότερους όμως τίτλους, έχουν δε μεγαλύτερη σημασία στις εντοπισμένες μορφές βρουκέλλωσης (Ariza J. et al 1992). Σε μερικούς ασθενείς εμφανίζονται και ανιχνεύονται σε χαμηλούς τίτλους και οι ανοσοσφαιρίνες IgE, οι οποίες όμως δεν έχουν καμία διαγνωστική σημασία (Corbel M.J. & MacMillan A.P. 1998).

Στον Πίνακα 9 φαίνεται η δραστηριότητα των ειδικών έναντι της βρουκέλλας κλάσεων ανοσοσφαιρινών ανάλογα με τη μορφή της νόσου.

Πίνακας 9: Δραστηριότητα των ειδικών ανοσοσφαιρινών στις διάφορες μορφές βρουκέλλωσης (Al Dahouk S. et al 2003b).

Μορφή νόσου	IgM	IgG	IgA
Οξεία	↑↑↑↑	↑↑↑ (IgG1 & IgG3)	↑
Χρόνια	∅	↑↑ (IgG1 & IgG4)	↑↑
Υποτροπή	∅	↑↑	↑

Η πρακτική σημασία της παρουσίας των διαφόρων κλάσεων ανοσοσφαιρινών και της ποιοτικής ή ποσοτικής ανίχνευσής τους στο αίμα είναι : α) η διάγνωση της νόσου, β) η εκτίμηση της πορείας της θεραπευτικής αγωγής και γ) η διάγνωση των συχνών υποτροπών της νόσου και των εντοπισμένων μορφών βρουκέλλωσης (Χατζηχριστοδούλου Χ. 1997).

5.3 Εργαστηριακή διάγνωση της βρουκέλλωσης στον άνθρωπο

Η κλινική διάγνωση της βρουκέλλωσης είναι πολύ δύσκολη, αν όχι αδύνατη. Έτσι, σχεδόν πάντοτε, όπως προαναφέρθηκε, είναι απαραίτητη η συνδρομή του εργαστηρίου. Για την εργαστηριακή διάγνωση της βρουκέλλωσης έχουν αναπτυχθεί και χρησιμοποιούνται πολλές διαφορετικές, είτε τεχνικές για την απ' ευθείας ανίχνευση και ταυτοποίηση του βακτηρίου, είτε μέθοδοι ανίχνευσης και τιτλοποίησης των ειδικών έναντι της βρουκέλλας αντισωμάτων.

5.3.1 Τεχνικές απ' ευθείας ανίχνευσης και ταυτοποίησης του βακτηρίου

5.3.1.1 Καλλιέργεια και απομόνωση του βακτηρίου

Η εργαστηριακή διάγνωση τίθεται με ασφάλεια, μόνο όταν οι καλλιέργειες από βιολογικό υλικό (αίμα, ΕΝΥ, μυελός των οστών ή δείγματα ιστών στις εντοπισμένες μορφές της νόσου) είναι θετικές. Η απομόνωση όμως του βακτηρίου είναι πολύ δύσκολη και διάφοροι συγγραφείς αναφέρουν διαφορετικά ποσοστά θετικής καλλιέργειας: 22% (Dokuzoguz B. et al 2005), 38% (Memish Z. et al 2000), 50% (Kiel F.W. & Khan M.Y. 1987), ενώ ο Yagupsky P. (1999) αναφέρει ποσοστά που κυμαίνονται από 53,4 - 90%. Τα ποσοστά αυτά βελτιώνονται πολύ και μπορούν να φτάσουν το 94 έως 95% όταν χρησιμοποιείται η μέθοδος της λύσης μετά από φυγοκέντρηση των κυττάρων του αίματος (centrifugation lysis) (Mantur B.G. & Mangalgi S.S. 2004) ή όταν χρησιμοποιούνται τα αυτόματα συστήματα ελέγχου ανάπτυξης βακτηρίων (Solomon H.M. & Jackson D. 1992, Ruiz J. et al 1997). Επίσης

βελτιώνονται, όταν αντί μιας αιμοκαλλιέργειας γίνονται πολλές ή όταν αντί των αιμοκαλλιεργειών, χρησιμοποιούνται καλλιέργειες μυελού των οστών (Al Dahouk et al 2003a).

5.3.1.2 Τεχνικές μοριακής βιολογίας

Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR – Polymerase chain reaction) είναι μια μέθοδος μοριακής βιολογίας που χρησιμοποιείται ευρέως την τελευταία δεκαπενταετία, και η οποία με συγκεκριμένη τεχνική για κάθε βακτήριο ανιχνεύει, πολλαπλασιάζει και στο τέλος αναγνωρίζει εκείνο το τμήμα του DNA του βακτηρίου που είναι υπεύθυνο για την παραγωγή των ανοσοσφαιρινών.

Πρώτος ο Baily με τους συνεργάτες του ανέπτυξε τη μέθοδο στη διάγνωση της βρουκέλλωσης χρησιμοποιώντας το γονίδιο BCSP31 και με κατώτερο όριο ανίχνευσης τα 10 – 100 fg DNA που αντιστοιχούν σε 2 – 20 βακτηριακά κύτταρα (Baily G. G. et al 1992). Στη συνέχεια η μέθοδος έτυχε ευρείας εφαρμογής στη διάγνωση της νόσου (Fekete A. et al 1990, Matar G.M. et al 1996, Morata P. et al 1998, 1999, 2001, 2003, Navarro E. et al 1999, 2004, Al-Attas R.A. et al 2000, Bricker B.J. 2002, Nimri L.F. 2003).

Από την πρώτη εφαρμογή της και μέχρι σήμερα έχουν αναπτυχθεί διάφορες παραλλαγές της PCR, όπως η rRNA-PCR (Herman L. & De Ridder H. 1992, Romero C. et al 1995, Rijpens N. P. et al 1996, Fox K. F. et al 1998), η RFLP-PCR (Restriction Fragment Length Polymorphism – PCR) που ανέπτυξε ο Cloeckaert με τους συνεργάτες του (Cloeckaert A. et al 1996, Cloeckaert A. et al 2002), η AP-PCR (Arbitarily primed – PCR) που αναπτύχθηκε από τον Fekete (Fekete A. et al 1992), οι REP-PCR (Repetitive Extragenic Palindromic sequences – PCR) και ERIC-PCR (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus sequences – PCR) που αναπτύχθηκαν από τον Mercier και την Tscherneva (Mercier E. et al 1996, Tscherneva E. et al 1996), η RAPD-PCR (Random Amplified Polymorphic DNA – PCR) που ανέπτυξε η Tscherneva (Tscherneva E. et al 2000), η real-time PCR (Redkar R. et al 2001, Probert W.S. et al 2004), η mPCR (multiplexing PCR) που ανέπτυξαν ο McDonald (McDonald R. et al 2001) και ο Richtzenhain (Richtzenhain L. J. et al 2002) και η AMOS-PCR (Abortus-Melitensis-Ovis-Suis PCR) την οποία ανέπτυξαν οι Halling και Bricker (Halling S.M. et al 1993).

Το υλικό που χρησιμοποιείται είναι συνήθως πλήρες αίμα που λαμβάνεται με αντιπηκτικό (EDTA), υπάρχουν όμως και μελέτες που χρησιμοποίησαν ορό αίματος με την ίδια επιτυχία (Queiro-Ortuno M.I. et al 1997, Zerva L. et al 2001, Vrioni G. et al 2004).

Παρά το γεγονός ότι η PCR και όλες οι παραλλαγές της έχουν μεγαλύτερη ευαισθησία από την απ' ευθείας καλλιέργεια του βακτηρίου, όπως φαίνεται παρακάτω στον Πίνακα 10, χρησιμοποιούνται μόνο για επιβεβαίωση των άλλων

εργαστηριακών εξετάσεων λόγω του υψηλού κόστους και του εξειδικευμένου προσωπικού που απαιτείται για την εκτέλεση τους.

Πίνακας 10: Σύγκριση ευαισθησίας και ειδικότητας της PCR και της καλλιέργειας αίματος και βιολογικού υλικού σε ασθενείς με βρουκέλλωση (Al Dahouk S. et al 2003b).

	Δείγμα αίματος		Άλλο βιολογικό υλικό	
	PCR	Καλλιέργεια	PCR	Καλλιέργεια
Ευαισθησία	97 – 100	70	97,1	29,4
Ειδικότητα	98,3 – 100	100	94,1	100

5.3.2 Ορολογικές δοκιμές ανίχνευσης των ειδικών έναντι της βρουκέλλας αντισωμάτων.

Τα κυριότερα βρουκελλικά αντιγόνα που έχουν ιδιαίτερη αξία στην εργαστηριακή διάγνωση της βρουκέλλωσης είναι τα S-LPS, δηλαδή τα αντιγόνα της εξωτερικής επιφανείας του βακτηριακού κυττάρου και τα ενδοκυτταρικά αντιγόνα.

Το σύμπλεγμα LPS είναι αυτό που έρχεται σε άμεση επαφή με το περιβάλλον του ξενιστή, είναι το κυρίαρχο αντιγόνο, αλλά και αυτό που φέρει τους κοινούς με άλλα Gram αρνητικά βακτήρια επιτόπους, με συνέπεια τις διασταυρούμενες αντιδράσεις (WHO Guidance 2003). Τέτοιες διασταυρούμενες αντιδράσεις δίνουν η *Yersinia enterocolitica* O:9, η *Escherichia coli* O:157, η *Francisella tularensis*, διάφοροι ορότυποι της *Salmonella* ομάδα Kaufmann-White group N και το *Vibrio cholerae* (Corbel M. J. & MacMillan A. P. 1998).

Σε αντίθεση με τα αντιγόνα εξωτερικής επιφανείας, τα ενδοκυτταρικά αντιγόνα δε δίνουν ποτέ διασταυρούμενες αντιδράσεις με τα προαναφερθέντα βακτήρια, εκτός της περίπτωσης του *Ochrobactrum* που είναι γενετικά συγγενές με τη βρουκέλλα (WHO Guidance 2003, Delpino M.V. et al 2004). Όμως οι διασταυρούμενες αυτές αντιδράσεις δεν έχουν μεγάλη σημασία, γιατί οι λοιμώξεις από *Ochrobactrum* spp είναι πολύ σπάνιες ενδονοσοκομειακές λοιμώξεις και εμφανίζονται δευτερογενώς σε ανοσοκατασταλμένους ασθενείς (Casanas M. C. et al 2001).

Για την εργαστηριακή διάγνωση της βρουκέλλωσης στον άνθρωπο πολλές ορολογικές μέθοδοι έχουν αναπτυχθεί και χρησιμοποιούνται περισσότερο ή λιγότερο, ανάλογα με το κόστος και το εξειδικευμένο προσωπικό που υπάρχει σε κάθε εργαστήριο (Heizmann W. et al 1985, Moreno M.S. et al 1992, Gandara B. et al 1994, Laudat P. et al 1995, Al Dahouk S. et al 2003b).

5.3.2.1 Συγκολλητινοαντιδράσεις

5.3.2.1.1 Βραδεία οροσυγκόλληση σε σωληνάρια ή μέθοδος Wright (Serum Agglutination Test – SAT)

Είναι η σημαντικότερη μέθοδος από την ομάδα των συγκολλητινοαντιδράσεων, η οποία θεωρείται ακόμη και σήμερα ως «χρυσό πρότυπο» (gold standard), με την οποία συγκρίνονται όλες οι νέες διαγνωστικές μέθοδοι (Spink W. W. et al 1954, Moyer N. P. et al 1987). Εμφανίζει ψευδώς θετικά αποτελέσματα λόγω διασταυρούμενων αντιδράσεων με τα προαναφερθέντα βακτήρια, ενώ έχουν παρατηρηθεί και ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα που οφείλονται στην ύπαρξη ατελών ή δεσμευτικών αντισωμάτων (incomplete or blocking antibodies) (Baldi P.C. et al 1996). Ένα άλλο μειονέκτημα της μεθόδου είναι η εμφάνιση του φαινομένου της προζώνης (Cho H.J. & Ingram D.G. 1972). Μπορεί να χρησιμοποιηθεί μετά από προσθήκη 2-mercaptoethanol (2-ME) (Buchanan T.M. et al 1980, Marrodan T. et al 2001) ή dithiothreitol (DTT) ή EDTA βελτιώνοντας τα αποτελέσματα κατά περίπτωση (Al Dahouk S. et al 2003b). Παραλλαγές της μεθόδου είναι και τα: Slide/ Plate Agglutination test, Card Agglutination test και Microagglutination test (Russell A.O. et al 1978, Baum M. et al 1995, Al Dahouk S. et al 2003b, Mert A. et al 2003).

5.3.2.1.2 Μέθοδος Ερυθρού της Βεγγάλης - Rose Bengal Test (RBT)

Είναι μέθοδος που χρησιμοποιείται ως screening test σε επιδημιολογικές μελέτες με υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα, μεγάλη ευκολία στην εκτέλεσή της, χαμηλό κόστος και αποτελέσματα συμβατά με τις άλλες συγκολλητινοαντιδράσεις (Rose J.E. & Roepke M.H. 1957, Morgan W.J.B. et al 1969, Diaz R. et al 1976, Patterson J.M & Deyoe B.L. 1976, Blasco J.M. et al 1994, Ruiz-Mesa J.D. et al 2005). Παραλλαγή της RBT θεωρείται και η μέθοδος Buffered Plate Agglutination Test (BPAT) (Lucero N.E. & Bolpe J.E. 1998, Rubio Vallejo M. et al 2002, Al Dahouk S. et al 2003b).

5.3.2.1.3 Coomb's Test ή Δοκιμή της Αντιανθρώπινης Σφαιρίνης (Anti-human globulin test – CT / AHG)

Θεωρείται συνέχεια της βραδείας οροσυγκόλλησης σε σωληνάρια και πραγματοποιείται μόνο εφ' όσον αυτή δώσει αρνητικό αποτέλεσμα. Με την προσθήκη αντιανθρώπινης σφαιρίνης αντιμετωπίζεται με επιτυχία η ύπαρξη ατελών ή δεσμευτικών αντισωμάτων, ενώ βελτιώνεται η ευαισθησία της μεθόδου Wright (Wilson M.M. & Merrifield E.V.O. 1951, Hall W.H. & Manion R.E 1953, Colak H. et al 1992). Παραλλαγή της μεθόδου θεωρείται και η νεότερη μέθοδος Immunocapture-Agglutination Test (Brucellacapt) (Orduna A. et al 2000, Casao M.A. et al 2004).

5.3.2.1.4 Δοκιμή της Σύνδεσης του Συμπληρώματος (Complement Fixation Test – CFT)

Θεωρείται η μέθοδος με την υψηλότερη ευαισθησία και ειδικότητα (Alton G.G. et al 1975, Stemshorn B.W. et al 1985). Μπορεί να εμφανίσει το φαινόμενο της προζώνης, όταν χρησιμοποιείται θερμή σύνδεση (warm fixation), ενώ αυτό αποφεύγεται, όταν η σύνδεση είναι ψυχρή (cold fixation). Επίσης μπορεί να εμφανιστεί αντισυμπληρωματική δράση που να επηρεάσει την ευαισθησία και την ειδικότητα της μεθόδου (Nielsen K.H. et al 1996). Είναι η μέθοδος εκλογής για τη διάγνωση της νόσου κατά την περίοδο επώασης, στις χρόνιες μορφές, όπως επίσης και μετά από εμβολιασμό (Jones L.M. et al 1963, Nicoletti P. & Muraschi T.F. 1966), ενώ μπορεί και ανιχνεύει τα ατελή ή δεσμευτικά αντισώματα (Kerr W.R. et al 1966).

Στον πίνακα 11 παρουσιάζονται οι κλάσεις ανοσοσφαιρινών που ανιχνεύονται από τις συγκολλητινοαντιδράσεις και τη μέθοδο της σύνδεσης του συμπληρώματος.

Πίνακας 11: Κλάσεις ανοσοσφαιρινών που ανιχνεύονται από τις συγκολλητινοαντιδράσεις και την σύνδεση του συμπληρώματος (Al Dahouk S. 2003b).

Ορολογικές μέθοδοι	Κλάσεις ανοσοσφαιρινών			
	IgM	IgG ₁	IgG ₂	IgA
SAT	+	-	+	+
RBT	+	+	-	-
Coomb's Test	+	+	+	+
CFT	+	+	-	-

5.3.2.2 Βασικές δεσμευτικές ορολογικές μέθοδοι

5.3.2.2.1 Ανοσοενζυμική μέθοδος - Enzyme linked Immunosorbent Assay – ELISA

Είναι μέθοδος που χαρακτηρίζεται από πολύ υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα και μπορεί να ανιχνεύσει την ύπαρξη των ειδικών αντιβρουκελλικών αντισωμάτων, αυτούσιων των βρουκελλών, των υδατοδιαλυτών αντιγόνων του βακτηρίου, όπως επίσης και διαφόρων κυτταρικών εκχυλισμάτων (εξωτερική μεμβράνη ή κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες) (Cloeckert A. et al 1998, Osoba A.O. et al 2001). Το γεγονός ότι ανιχνεύει όλες τις κλάσεις ανοσοσφαιρινών (IgM, IgG και IgA) και τις υποκλάσεις τους την κάνει εξαιρετικά χρήσιμη στην εργαστηριακή διάγνωση όλων των σταδίων και των μορφών της νόσου (Marmonier A. et al 1981, Hunter S.B. et al 1986, Lago L.F. & Diaz R. 1986, Araj G.F. & Kaufmann A.F. 1989, WHO 1993).

Είναι επίσης η πλέον κατάλληλη για την ανίχνευση αντισωμάτων στο E.N.Y. (Baldi P.C. et al 1999). Η έμμεση ELISA (indirect ELISA – iELISA) μπορεί να εμφανίσει

ψευδώς θετικά αποτελέσματα είτε λόγω διασταυρούμενων αντιδράσεων με άλλα βακτήρια, είτε μετά από εμβολιασμό, είτε λόγω της ύπαρξης του ρευματοειδούς παράγοντα (RF) στον ορό του ασθενούς (De Klerk E. & Anderson R. 1985). Αντίθετα η ανταγωνιστική ELISA (competitive ELISA – cELISA) δε δίνει διασταυρούμενες αντιδράσεις και μπορεί να διαχωρίσει τα μετεμβολιακά από τα αντισώματα που αναπτύσσονται μετά από μόλυνση από φυσικό στέλεχος (Araraj G.F. et al 1986, Nielsen K.H. et al 1996, Al-Shamahy H.A. & Wright S.G. 1998, Gad El Rab M.O. & Kambal A.M. 1998, Lucero N.E. et al 1999, Samartino L. et al 1999, Erdenebaatar J. et al 2004) αυξάνοντας έτσι την ειδικότητα της μεθόδου.

5.3.2.2.2 Ανοσοφθορισμός (Immunofluorescent Test – IFT)

Ο ανοσοφθορισμός ως μέθοδος δεν εμφανίζει ιδιαίτερα πλεονεκτήματα σε σχέση με τις συμβατικές ορολογικές μεθόδους. Η ερμηνεία των αποτελεσμάτων είναι αρκετά υποκειμενική και πολλές φορές αυτά δε συμβαδίζουν με τα κλινικά ευρήματα (Henderson R.J. et al 1976, Dhar R. et al 1988, Dabdoob W.A. & Abdulla Z.A. 2000).

5.3.2.2.3 Ραδιοανοσολογική μέθοδος (Radioimmunoassay - RIA)

Η δυσκολία που εμφανίζεται στην ερμηνεία των εργαστηριακών αποτελεσμάτων λόγω της ύπαρξης των δεσμευτικών ή ατελών αντισωμάτων αποφεύγεται με την RIA. Ως μέθοδος εμφανίζει υψηλή ευαισθησία, αλλά δε χρησιμοποιείται στην καθημερινή ρουτίνα του εργαστηρίου, εκτός της υποψίας υποτροπής της νόσου, όπου οι άλλες συμβατικές μέθοδοι έχουν χαμηλή ευαισθησία (Hewitt W.G. & Payne D.J.H. 1984).

5.3.2.2.4 Μέθοδος της φθορίζουσας πόλωσης του φωτός (Fluorescence Polarization Assay - FPA)

Είναι μέθοδος που αξιολογήθηκε εδώ και λίγα χρόνια στη διάγνωση της βρουκέλλωσης των ζώων και ευρίσκεται στο στάδιο της διερεύνησης, η χρησιμότητά της στην ορολογική διάγνωση τόσο της οξείας, όσο και της χρόνιας βρουκέλλωσης του ανθρώπου.

5.3.2.3 Αντιδράσεις ανοσοκαθίζησης

Οι παραπάνω μέθοδοι έχουν υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα, η μεγάλη όμως δυσκολία στην εκτέλεσή τους, το υψηλό κόστος και η αναγκαιότητα ύπαρξης εξειδικευμένων εργαστηρίων και προσωπικού, τις αποκλείει από την καθημερινή πράξη.

- Διπλή ανοσοδιάχυση σε άγαρ (Double agar gel immunodiffusion – DAGID)
- Αντίστροφη ακτινωτή ανοσοδιάχυση (Reverse Radial Immunodiffusion – RRID)
- Αντίθετη ανοσοηλεκτροφόρηση (Counter Immunoelectrophoresis – CIEP)
- Western Blotting.

Παρά τον μεγάλο αριθμό ορολογικών δοκιμών που έχουν αξιολογηθεί στην εργαστηριακή διάγνωση της βρουκέλλωσης στον άνθρωπο, λίγες από αυτές χρησιμοποιούνται στην καθημερινή ρουτίνα των εργαστηρίων.

Στον Πίνακα 12 φαίνεται η καταλληλότητα των πιο συχνών από αυτές στα διάφορα στάδια της νόσου.

Πίνακας 12: Καταλληλότητα των συχνότερων ορολογικών εξετάσεων ανάλογα με το στάδιο της νόσου. (Jones L.M. et al 1963, Nicoletti P. & Muraschi T.F. 1966, Morgan W.J.B. et al 1969, Buchanan T.M. et al 1974, Buchanan T.M. & Faber L.C. 1980, Stemshorn B.W. et al 1985, Ariza J. et al 1992).

Ορολογικές μέθοδοι	Περίοδος επώασης	Οξεία μορφή	Υποξεία μορφή	Χρόνια μορφή	Υποτροπή	Αρνητικά αποτελέσματα μετά από την μόλυνση
Βραδεία Οροσυγκόλληση	-	++	+	-	±	6 – 24 μήνες
Σύνδεση Συμπληρώματος Coomb's Test	+++	+	++	+++	++	> 24 μήνες
ELISA IgM	±	+++	+	-	-	6 – 24 μήνες
ELISA IgG	±	++	+++	+++	+++	> 24 μήνες
ELISA IgA	-	+	++	+++	+++	> 24 μήνες

Στη διεθνή βιβλιογραφία υπάρχουν πολλές μελέτες ερευνητών που ασχολήθηκαν με την αξιολόγηση των πιο συχνών ορολογικών δοκιμών στη διάγνωση της βρουκέλλωσης.

Στον Πίνακα 13 παρουσιάζονται συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα των μελετών που αφορούν στην ευαισθησία (Sn) και ειδικότητα (Sp) των μεθόδων που χρησιμοποιούνται συχνότερα στην εργαστηριακή διάγνωση της βρουκέλλωσης στον άνθρωπο.

Πίνακας 13: Ευαισθησία και ειδικότητα των πιο συχνά χρησιμοποιούμενων μεθόδων στην ορολογική διάγνωση της βρουκέλλωσης του ανθρώπου, που αναφέρονται στη διεθνή βιβλιογραφία.

Ορολογικές μέθοδοι	Ευαισθησία (%)	Ειδικότητα (%)	Βιβλιογραφική αναφορά
	92	100	De Klerk E. & Anderson R. 1985
Βραδεία οροσυγκόλληση	66	100	Orduna A. et al 2001
	51 – 80	Δεν αναφέρεται	Smits H.L. et al 1999
	96	100	Memish Z.A. et al 2002
Σύνδεση συμπληρώματος	77	87	De Klerk E. & Anderson R. 1985
	92	96 – 100	Orduna A. et al 2001
Coomb's test	40 – 92	Δεν αναφέρεται	Smits H.L. et al 1999
	96	100	Osoba A.O. et al 2001
Indirect ELISA	100	97	De Klerk E. & Anderson R. 1985
	94	97	Memish Z.A. et al 2002
Competitive ELISA	98	100	Lucero N.E. et al 1999

5.3.3 Ενδοδερμική έγχυση αντιγόνου

Η εμφάνιση καθυστερημένου τύπου αντίδρασης υπερευαισθησίας μετά από ενδοδερμική έγχυση (IDR) ειδικού βρουκελλικού αντιγόνου, είναι ένδειξη προηγούμενης έκθεσης στον παθογόνο παράγοντα. Παρά το γεγονός ότι η μέθοδος χρησιμοποιείται σε μερικές χώρες, η χρήση της ενδοδερμικής αντίδρασης δε συνιστάται για τη διάγνωση της νόσου. Η χρήση επίσης μη τυποποιημένων διεθνώς παρασκευασμάτων αντιγόνου μπορεί να προκαλέσει την παραγωγή αντισωμάτων, τα οποία αλλοιώνουν τα αποτελέσματα των ορολογικών μεθόδων (WHO Guidance 2003).

5.4 Εργαστηριακή διάγνωση της βρουκέλλωσης στα ζώα

Οι περισσότερες από τις προαναφερθείσες εργαστηριακές μεθόδους χρησιμοποιούνται και για την εργαστηριακή διάγνωση της βρουκέλλωσης στα ζώα. Ανάλογα με το είδος του ζώου κάποιες από αυτές χρησιμοποιούνται ευρέως και κάποιες στην πράξη έχουν καταργηθεί, όπως π.χ η βραδεία οροσυγκόλληση σε σωληνάρια. Η μέθοδος αυτή βρίσκει εφαρμογή στα αιγοπρόβατα, αλλά έχει καταργηθεί στα βοοειδή (ΟΙΕ 2004, ΟΙΕ 2000), ενώ κάποιες άλλες έχουν διαφορετική ευαισθησία και ειδικότητα σε διαφορετικά είδη ζώων.

Συνοπτικά οι μέθοδοι εργαστηριακής διάγνωσης της βρουκέλλωσης στα ζώα είναι οι παρακάτω (Nielsen K. 2002):

5.4.1 Τεχνικές απ' ευθείας ανίχνευσης και ταυτοποίησης του βακτηρίου

- Καλλιέργεια και απομόνωση του βακτηρίου
- Τεχνικές μοριακής βιολογίας (PCR)

5.4.2 Ορολογικές δοκιμές ανίχνευσης των ειδικών έναντι της βρουκέλλας αντισωμάτων.

5.4.2.1 Συγκολλητινοαντιδράσεις

- Βραδεία οροσυγκόλληση σε σωληνάρια ή μέθοδος Wright (Serum Agglutination Test – SAT) – 2ME SAT – DTT SAT – EDTA SAT – RIV SAT (Rivanol SAT)
- Rose Bengal – BPAT
- Milk Ring Test (MRT)
- Δοκιμή της Σύνδεσης του Συμπληρώματος (Complement Fixation Test – CFT)

5.4.2.2 Βασικές δεσμευτικές ορολογικές μέθοδοι

- Enzyme linked Immunosorbent Assay – ELISA
Indirect ELISA (iELISA)
Competitive ELISA (cELISA)
- Ραδιοανοσολογική μέθοδος (RIA)
- Particle Concentration Fluorescence Immunoassay (PCFIA)
- Μέθοδος της φθορίζουσας πόλωσης του φωτός (Fluorescence Polarization Assay – FPA)

5.4.3 Αντιδράσεις ανοσοκαθίζησης

- Ανοσοδιάχυση σε άγαρ (Agar Gel Immunodiffusion test – AGID)
- Απλή ακτινωτή ανοσοδιάχυση (Single Radial Immunodiffusion test – SRID).

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. Επιλογή συμμετεχόντων στη μελέτη

Για την εκπόνηση της παρούσας διδακτορικής διατριβής, αποφασίστηκε η προς διερεύνηση μέθοδος της φθορίζουσας πόλωσης του φωτός (Fluorescence Polarization Assay – FPA) να αξιολογηθεί σε τέσσερις διαφορετικές ομάδες συμμετεχόντων.

1.1 Κριτήρια επιλογής συμμετεχόντων

Ως κριτήρια επιλογής των συμμετεχόντων στη μελέτη τέθηκαν τα εξής:

- **Επιδημιολογική σύνδεση (Epidemiological link)** : όλοι οι παράγοντες κινδύνου, όπως το επάγγελμα (εργαζόμενοι σε σφαγεία, κτηνοτρόφοι, κτηνίατροι, προσωπικό εργαζόμενο σε εργαστήρια το οποίο έρχεται σε επαφή με τον παθογόνο παράγοντα, εργαζόμενοι σε μονάδες παραγωγής γαλακτοκομικών προϊόντων), η τυχαία ή τακτική επαφή με ζώα, ιδιαίτερα με βοοειδή και αιγοπρόβατα (οικογενειακό περιβάλλον κτηνοτρόφων, εργάτες στάβλων και ποιμνιοστασίων) και η ευκαιριακή ή συχνή κατανάλωση μη παστεριωμένου γάλακτος και νωπού τυριού ή γαλακτοκομικών προϊόντων αγνώστου υγειονομικού καθεστώτος και προέλευσης, που ευνοούν την αυξημένη εμφάνιση της νόσου
- **Κλινική εικόνα:** συμβατή με αυτή της βρουκέλλωσης, συνήθως εμπύρετο νόσημα με καταβολή, κόπωση, εφίδρωση, κεφαλαλγία, αρθραλγίες και οσφυαλγία.

Με βάση τα παραπάνω κριτήρια επιλογής, επιλέχθηκαν:

- 1) 313 **ύποπτοι ασθενείς** που προσήλθαν με (α) κλινική εικόνα συμβατή με αυτή της οξείας ή χρόνιας βρουκέλλωσης, (β) επιδημιολογική σύνδεση με τη νόσο και (γ) ιστορικό νόσησης από βρουκέλλωση – συμπτώματα ενδεικτικά υποτροπής
- 2) 317 **υγιείς αιμοδότες**, οι οποίοι, (α) δεν εμφάνιζαν κλινική εικόνα που να εγείρει έστω και υποψία της νόσου και (γ) δεν υπήρχε επιδημιολογική σύνδεση που να παραπέμπει σε πιθανότητα υποκλινικής μορφής βρουκέλλωσης στην παρούσα φάση ή στο παρελθόν, (γ) δεν είχαν ιστορικό νόσησης από βρουκέλλωση στο παρελθόν.

Από όλους τους ύποπτους ασθενείς και τους υγιείς αιμοδότες συλλέχθηκαν δείγματα αίματος, τα οποία εξετάστηκαν με τις τρεις επιλεγείσες, ευρέως χρησιμοποιούμενες ορολογικές μεθόδους: (α) τη **βραδεία οροσυγκόλληση σε σωληνάρια** (μέθοδος Wright – SAT), (β) τη **μέθοδο Rose-Bengal (RBT)** και (γ) τη **μέθοδο ELISA (IgM & IgG)**.

Όσοι από τους ύποπτους ασθενείς, παρά την επιδημιολογική σύνδεση, τη συμβατή κλινική εικόνα και το ιστορικό, δεν έδωσαν σε καμία από τις προαναφερόμενες

ορολογικές εξετάσεις θετικό αποτέλεσμα, εξαιρέθηκαν από την παρούσα μελέτη. Επίσης εξαιρέθηκαν όλοι οι υγιείς αιμοδότες, οι οποίοι παρά την απουσία επιδημιολογικής σύνδεσης, ιστορικού και κλινικής εικόνας έδωσαν θετικό αποτέλεσμα έστω και σε μία από τις προαναφερθείσες ορολογικές εξετάσεις που εφαρμόστηκαν.

1.2 Ομάδες συμμετεχόντων

Με βάση τα κριτήρια επιλογής και τα αποτελέσματα των SAT, RBT και ELISA, οι συμμετέχοντες χωρίστηκαν σε τέσσερις διαφορετικές ομάδες:

- **Ομάδα Α – Θετικοί στην βρουκέλλωση (BP - Brucellosis Positive):** στην ομάδα αυτή συμμετείχαν όλοι οι ύποπτοι ασθενείς, οι οποίοι εμφάνισαν θετικό αποτέλεσμα και στις τρεις από τις εφαρμοσθείσες ορολογικές μεθόδους. Επομένως η ομάδα Α περιλάμβανε ασθενείς με: (α) επιδημιολογική σύνδεση, (β) κλινική εικόνα συμβατή με αυτή της βρουκέλλωσης και (γ) θετικό αποτέλεσμα και στις τρεις ορολογικές μεθόδους SAT, RBT και ELISA (είτε IgM, είτε IgG, είτε και οι δύο ταυτόχρονα). Οι συμμετέχοντες στην ομάδα αυτή χαρακτηρίστηκαν και σαν θετικοί στη βρουκέλλωση γιατί τα κριτήρια επιλογής τους προσεγγίζουν με τη μεγαλύτερη πιθανότητα το «status disease» της νόσου, δηλαδή οι ασθενείς να πάσχουν πραγματικά από βρουκέλλωση
- **Ομάδα Β:** στην ομάδα αυτή συμμετείχαν όλοι οι ύποπτοι ασθενείς οι οποίοι εμφάνισαν θετικό αποτέλεσμα τουλάχιστον σε δύο από τις εφαρμοσθείσες ορολογικές μεθόδους. Επομένως στην ομάδα Β συμμετείχαν όλοι οι ασθενείς με: (α) επιδημιολογική σύνδεση, (β) κλινική εικόνα συμβατή με αυτή της βρουκέλλωσης και (γ) θετικό αποτέλεσμα τουλάχιστον σε δύο εκ των τριών ορολογικών μεθόδων SAT, RBT και ELISA (είτε IgM, είτε IgG, είτε και οι δύο ταυτόχρονα). Η ομάδα αυτή επιλέχθηκε με βάση όλες τις βιβλιογραφικές αναφορές, σύμφωνα με τις οποίες καμία ορολογική μέθοδος από μόνη της δεν εξασφαλίζει τη διάγνωση της νόσου, αλλά τουλάχιστον δύο ορολογικές μέθοδοι πρέπει να εφαρμόζονται είτε παράλληλα (in parallel – είτε η μία, είτε η άλλη), είτε σε συνδυασμό (combined – και η μία και η άλλη), έτσι ώστε να αποφευχθούν τα ψευδώς αρνητικά και τα ψευδώς θετικά αποτελέσματα αντίστοιχα. Επειδή η Ελλάδα είναι χώρα ενδημική στη νόσο, η ομάδα Β είναι περισσότερο ρεαλιστική για την αξιολόγηση της μεθόδου FPA στη χώρα μας, ενώ ταυτόχρονα τα κριτήρια της ομάδας αυτής είναι πιο αυστηρά από αυτά του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας
- **Ομάδα Γ:** στην ομάδα αυτή συμμετείχαν όλοι οι ύποπτοι ασθενείς οι οποίοι εμφάνισαν θετικό αποτέλεσμα τουλάχιστον σε μία από τις εφαρμοσθείσες ορολογικές

μεθόδους. Επομένως στην ομάδα Γ συμμετείχαν όλοι οι ασθενείς με: (α) επιδημιολογική σύνδεση, (β) κλινική εικόνα συμβατή με αυτή της βρουκέλλωσης και (γ) θετικό αποτέλεσμα τουλάχιστον σε μία εκ των τριών ορολογικών μεθόδων SAT, RBT και ELISA (είτε IgM, είτε IgG, είτε και οι δύο ταυτόχρονα). Η ομάδα αυτή επιλέχθηκε με βάση τον ορισμό του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας για την περίπτωση βρουκέλλωσης, δηλαδή την ύπαρξη θετικού αποτελέσματος σε μία τουλάχιστον από τις αξιολογημένες ορολογικές μεθόδους

- **Ομάδα Μ (μάρτυρες) – Αρνητικοί στην βρουκέλλωση (BN – Brucellosis negative):** στην ομάδα Μ των μαρτύρων συμμετείχαν όλοι οι υγιείς αιμοδότες, οι οποίοι έδωσαν αρνητικό αποτέλεσμα σε όλες τις εφαρμοσθείσες ορολογικές μεθόδους. Άρα η ομάδα Μ απαρτίζονταν από υγιή άτομα-αιμοδότες, οι οποίοι (α) δεν είχαν ιστορικό νόσησης από βρουκέλλωση, (β) δεν εμφάνιζαν κλινική εικόνα που να εγείρει έστω και υποψία της νόσου, (γ) δεν υπήρχε επιδημιολογική σύνδεση που να παραπέμπει σε πιθανότητα υποκλινικής μορφής βρουκέλλωσης στην παρούσα φάση ή στο παρελθόν και (δ) εμφάνιζαν αρνητικό αποτέλεσμα σε όλες τις ορολογικές μεθόδους SAT, RBT και ELISA (και στην IgM, και στην IgG). Οι μάρτυρες αυτοί χαρακτηρίστηκαν και ως αρνητικοί στη βρουκέλλωση (BN – Brucellosis Negative) γιατί τα κριτήρια επιλογής ήταν τέτοια ώστε να προσεγγίζουν με τη μεγαλύτερη πιθανότητα το «no disease status», δηλαδή ότι οι αιμοδότες αυτοί πραγματικά δεν πάσχουν από βρουκέλλωση.

Στη συνέχεια, όλα τα δείγματα των ομάδων Α, Β, Γ, και Μ, εξετάστηκαν με τη μέθοδο FPA. Η μέθοδος αρχικά εφαρμόστηκε στα δείγματα της ομάδας Α (BP) και της ομάδας Μ (BN), έτσι ώστε να εκτιμηθεί αν η συγκεκριμένη μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ορολογική διάγνωση της βρουκέλλωσης στον άνθρωπο. Ο σχεδιασμός αυτός επιλέχθηκε, για να διαπιστωθεί αρχικά αν η προς διερεύνηση μέθοδος θα παρουσίαζε αποτελέσματα παρόμοια με αυτά που εμφανίζει όταν εφαρμόζεται στα ζώα, δηλαδή πολύ υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα.

Ακολούθως η μέθοδος εφαρμόστηκε στα δείγματα των ομάδων Β και Γ, έτσι ώστε πέρα από την αξιολόγηση, να γίνει και σύγκριση της FPA με τις άλλες αξιολογημένες ορολογικές μεθόδους που επιλέχθηκαν.

2. Συλλογή δειγμάτων αίματος

2.1 Προέλευση των δειγμάτων

Για τη συλλογή των δειγμάτων αίματος τόσο από τους αιμοδότες, όσο και από τους ύποπτους για βρουκέλλωση ασθενείς, δημιουργήθηκε δίκτυο μεταξύ του Γενικού Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας και του Νοσοκομείου Ειδικών Παθήσεων Θεσσαλονίκης. Η επιλογή των συμμετεχόντων στην παρούσα μελέτη, από δύο διαφορετικές περιοχές, δεν επηρέασε τα αποτελέσματα των ορολογικών εξετάσεων και την τελική αξιολόγηση της μεθόδου, επειδή η επιδημιολογία της νόσου στις δύο συγκεκριμένες γεωγραφικές περιοχές, δηλαδή στους νομούς Λάρισας και Θεσσαλονίκης, είναι παρόμοια και δεν εμφανίζει αξιολογες διαφορές.

Αιμοληψία - Χειρισμός των δειγμάτων

Σε όλους τους ύποπτους ασθενείς και τους υγιείς αιμοδότες, πραγματοποιήθηκε αιμοληψία και συλλογή ποσότητας 6-7 ml αίματος σε ξηρά φιαλίδια χωρίς αντιπηκτικό. Τα δείγματα πλήρους αίματος παρέμεναν για 2 περίπου ώρες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και στη συνέχεια φυγοκεντρώνταν στις 3.000 στροφές / λεπτό για 15 λεπτά. Η ποσότητα του ορού που προέκυπτε μετά τη φυγοκέντρηση ανέρχονταν σε 2 – 3 ml περίπου.

Εφ' όσον επρόκειτο το δείγμα να υποβληθεί αμέσως σε ορολογική εξέταση, ποσότητα 1 – 1,5 ml ορού διατηρούνταν σε ψύξη, σε θερμοκρασία 2 – 4 °C. Η υπόλοιπη ποσότητα του ορού ή όλη η ποσότητα από τα δείγματα που δεν επρόκειτο να εξεταστούν αμέσως, χωριζόταν σε ποσότητες 200 – 500 μl, τοποθετούνταν σε φιαλίδια του 1,5 ml (Erporentorf) και διατηρούνταν στην κατάψυξη στους – 70 έως – 80 °C μέχρι να εξεταστούν.

3. Εκτέλεση πειραματικού μέρους

Το πειραματικό μέρος της παρούσας διδακτορικής διατριβής πραγματοποιήθηκε από το Δεκέμβριο 2003 έως τον Οκτώβριο 2005.

Οι μέθοδοι RBT και FPA πραγματοποιήθηκαν στο Κτηνιατρικό Εργαστήριο Λάρισας, το οποίο είναι το Εθνικό Εργαστήριο Αναφοράς Βρουκέλλωσης των ζώων.

Οι μέθοδοι SAT και ELISA (IgM και IgG) πραγματοποιήθηκαν στο Ανοσολογικό Τμήμα του Μικροβιολογικού Εργαστηρίου του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας.

3.1 Ορολογικές μέθοδοι

3.1.1 Βραδεία οροσυγκόλληση σε σωληνάρια – Μέθοδος Wright (SAT)

Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος βασίζεται στη διαπίστωση με γυμνό οφθαλμό του σχηματισμού συμπλόκων των αντισωμάτων έναντι της βρουκέλλας, που τυχόν υπάρχουν στον ορό με αντιγόνο από *B. abortus* στέλεχος 1119 – 3 (συνήθως σωματικό αντιγόνο), ύστερα από επώαση σε σταθερή θερμοκρασία 37°C για 24 ώρες. Τα σύμπλοκα γίνονται αντιληπτά ως ίζημα στον πυθμένα του φιαλιδίου με ταυτόχρονη διαύγαση του υπερκείμενου υγρού. Η σύνδεση του αντιγόνου γίνεται τόσο με τις ειδικές έναντι της βρουκέλλας, όσο και με τις μη ειδικές ανοσοσφαιρίνες. Η μέθοδος ανιχνεύει κυρίως τις IgM ανοσοσφαιρίνες και πολύ λιγότερο τις IgG και πιο συγκεκριμένα μόνο την υποκλάση IgG₂. Για το λόγο αυτό η μέθοδος είναι χρήσιμη συνήθως στην οξεία φάση της νόσου, φάση στην οποία κυριαρχούν οι IgM ανοσοσφαιρίνες. Αντίθετα στη χρόνια βρουκέλλωση, όπου τα IgM αντισώματα έχουν εξαφανιστεί ή βρίσκονται σε ελάχιστες ποσότητες, η μέθοδος εμφανίζει πολύ χαμηλή ευαισθησία.

Εκτέλεση της μεθόδου

Η μέθοδος πραγματοποιήθηκε με βάση το πρωτόκολλο που ακολουθείται στο ανοσολογικό τμήμα του Μικροβιολογικού εργαστηρίου του Π.Γ.Ν.Α. Η διαδικασία εκτέλεσης της μεθόδου ήταν η εξής:

- 1) Πριν από κάθε εξέταση, τόσο οι υπό εξέταση οροί όσο και το αντιγόνο, αφήνονταν ώστε να επανέλθουν σε θερμοκρασία δωματίου ($22 \pm 4^\circ\text{C}$)
- 2) Για κάθε δείγμα ορού, προετοιμάστηκε σειρά 10 σωληναρίων. Στο πρώτο σωληνάριο της κάθε σειράς τοποθετήθηκε 1,9 ml, ενώ στα υπόλοιπα εννέα ποσότητα 1 ml φυσιολογικού ορού (NaCl 0,9 %)
- 3) Στη συνέχεια στο πρώτο φιαλίδιο κάθε σειράς προστέθηκαν 100 μl του προς εξέταση ορού και ακολούθησε ήπια ανάδευση σε μηχανικό αναδευτήρα (Vortex)
- 4) Από το πρώτο σωληνάριο μεταφέρθηκε με πιπέτα ρυθμιζόμενου όγκου, 1 ml του μείγματος στο δεύτερο σωληνάριο κάθε σειράς και ακολούθησε ήπια ανάδευση στο vortex
- 5) Από το δεύτερο σωληνάριο μεταφέρθηκε χωρίς αλλαγή ρύγχους με την πιπέτα, 1 ml του μείγματος στο τρίτο φιαλίδιο κάθε σειράς και ακολούθησε ήπια ανάδευση στο vortex
- 6) Η ίδια διαδικασία ακολούθηθηκε μέχρι και το δέκατο σωληνάριο κάθε σειράς, από το οποίο το 1 ml απομακρύνθηκε μαζί με το ρύγχος της πιπέτας

7) Με τη διαδικασία αυτή επιτεύχθηκαν για κάθε δείγμα ορού, υποδιπλάσιες αραιώσεις από το πρώτο μέχρι το δέκατο σωληνάριο, οι οποίες ήταν αντίστοιχα: 1/20, 1/40, 1/80, 1/160, 1/320, 1/640, 1/1.280, 1/2.560, 1/5.120 και 1/10.240. Η σειρά των αραιώσεων έφτανε σε τόσο μεγάλο βαθμό για να αποφευχθεί το φαινόμενο της προζώνης

8) Στη συνέχεια προστέθηκε σε όλα τα σωληνάρια αραιώσεων της κάθε σειράς, 50 µl αντιγόνου (κεχρωσμένο σωματικό αντιγόνο B. abortus – Cypress Diagnostics, Belgium), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, ύστερα από ανάδευση του περιέκτη του αντιγόνου για την ομογενοποίηση του περιεχομένου. Μετά την προσθήκη του αντιγόνου σε κάθε σωληνάριο ακολουθούσε ανάδευση στο vortex, έτσι ώστε το περιεχόμενο κάθε σωληναρίου να ομογενοποιηθεί

9) Κάθε ημέρα εξέτασης, μαζί με τους προς εξέταση ορούς προετοιμαζόταν επίσης:

α) ένας αρνητικός μάρτυρας (1 ml φυσιολογικός ορός 0,9 % NaCl + 50 µl αντιγόνου) και
β) ένας γνωστός θετικός μάρτυρας στις ίδιες αραιώσεις με τους προς εξέταση ορούς έτσι ώστε να ελέγχεται κάθε φορά η ποιότητα του αντιγόνου

10) Για την αντικειμενικότερη αξιολόγηση του βαθμού συγκόλλησης, κάθε ημέρα εξέτασης προετοιμαζόταν και μία σειρά μαρτύρων συγκόλλησης που αντιπροσώπευαν τους βαθμούς συγκόλλησης ως εξής:

Σε σειρά πέντε σωληναρίων τοποθετούνταν 1 ml φυσιολογικού ορού 0,9 % NaCl και στη συνέχεια στο πρώτο καθόλου αντιγόνο (συγκόλληση 100%, βαθμός συγκόλλησης 4 ή ++++), στο δεύτερο 12,5 µl αντιγόνου (συγκόλληση 75%, βαθμός συγκόλλησης 3 ή +++), στο τρίτο 25 µl αντιγόνου (συγκόλληση 50%, βαθμός συγκόλλησης 2 ή ++), στο τέταρτο 37,5 µl αντιγόνου (συγκόλληση 25%, βαθμός συγκόλλησης 1 ή +) και στο πέμπτο 50 µl αντιγόνου (συγκόλληση 0%, βαθμός συγκόλλησης 0 ή -)

11) Στη συνέχεια, όλοι οι προς εξέταση οροί, ο θετικός και ο αρνητικός μάρτυρας καθώς και οι μάρτυρες συγκόλλησης τοποθετούνταν σε επωαστικό κλίβανο ρυθμισμένο σε σταθερή θερμοκρασία 37°C για 20 έως 24 ώρες.

Ανάγνωση και ερμηνεία των αποτελεσμάτων

Η ανάγνωση των αποτελεσμάτων πραγματοποιούνταν μετά την ολοκλήρωση του χρόνου επώασης και την απομάκρυνση των σωληναρίων από τον επωαστικό κλίβανο. Για την καλύτερη ανάγνωση, κάθε σωληνάριο τοποθετούνταν μπροστά από λευκό φόντο, ενώ λαμβανόταν μέριμνα η φωτεινή πηγή να είναι πίσω και επάνω από το σημείο ανάγνωσης.

Για τον καθορισμό ενός ορού ως θετικού ή αρνητικού λαμβανόταν υπόψη η ύπαρξη ή μη συγκόλλησης, δηλαδή η ύπαρξη ιζήματος στον πυθμένα του σωληναρίου και η διαφόρου βαθμού διαύγαση του υπερκείμενου υγρού.

Μετά το χαρακτηρισμό ενός δείγματος ορού ως θετικού, ακολουθούσε η τιτλοποίησή του, η οποία γινόταν με σύγκριση του θετικού ορού με τους μάρτυρες συγκόλλησης. Ως τίτλος αντισωμάτων οριζόταν η μεγαλύτερη αραιώση ορού, στην οποία εμφανιζόταν συγκόλληση 50% (βαθμός συγκόλλησης 2 ή ++). Στην περίπτωση που δύο διαδοχικές αραιώσεις του ορού εμφάνιζαν το ίδιο αποτέλεσμα δηλαδή 50% συγκόλληση ή ++, τότε ως τίτλος οριζόταν η μικρότερη συγκέντρωση.

3.1.2 Μέθοδος Ερυθρού της Βεγγάλης (Rose Bengal Test, RBT)

Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος βασίζεται στη διαπίστωση του σχηματισμού κροκίδων, ορατών διά γυμνού οφθαλμού, όταν ορός που περιέχει αντισώματα έναντι της βρουκέλλας αναμιγνύεται με διάλυμα βρουκελλικού αντιγόνου (8%, pH 3,65±0,05), κεχρωσμένου με ερυθρό της βεγγάλης. Η πτώση του pH του ορού μετά την ανάμιξη του με το όξινο διάλυμα του αντιγόνου, αλλάζει το ηλεκτροστατικό δυναμικό, τόσο των ειδικών όσο και των μη ειδικών ανοσοσφαιρινών, από αρνητικό σε θετικό. Καθώς όμως το αντιγόνο συνδέεται περισσότερο σταθερά με τις ειδικές έναντι της βρουκέλλας ανοσοσφαιρίνες παρά με τις μη ειδικές, η αλλαγή του ηλεκτροστατικού δυναμικού, οδηγεί στην ευκολότερη λύση του δεσμού μεταξύ του αντιγόνου και των μη ειδικών ανοσοσφαιρινών. Έτσι το αντιγόνο παραμένει συνδεδεμένο μόνο με τις αντιβρουκελλικές ανοσοσφαιρίνες και οι κροκίδες που σχηματίζονται, γίνονται αντιληπτές αμέσως (μέσα σε λίγα λεπτά της ώρας) με γυμνό οφθαλμό.

Η μέθοδος Rose Bengal ανιχνεύει κυρίως τις IgG ανοσοσφαιρίνες και πιο συγκεκριμένα μόνο την υποκλάση IgG₁ και πολύ λιγότερο τις IgM ανοσοσφαιρίνες. Επομένως, η ευαισθησία της είναι πολύ υψηλότερη στην χρόνια βρουκέλλωση, παρά στην οξεία μορφή της νόσου και ιδιαίτερα στα αρχικά στάδια.

Εκτέλεση της μεθόδου

Η μέθοδος πραγματοποιήθηκε με βάση το πρωτόκολλο που εφαρμόζεται στο Κτηνιατρικό Εργαστήριο Λάρισας (Εθνικό Εργαστήριο Αναφοράς Βρουκέλλωσης). Η διαδικασία εκτέλεσης της μεθόδου ήταν η εξής:

1) Πριν από την εκτέλεση της μεθόδου, τόσο οι προς εξέταση οροί, όσο και το αντιγόνο, αφήνονταν να επανέλθουν σε θερμοκρασία δωματίου (22 ± 4°C)

- 2) Η μέθοδος εκτελούνταν σε επίπεδη γυάλινη πλάκα σαράντα τετράγωνων βοθρίων πλευράς 1,5 εκατοστομέτρων
- 3) Σε κάθε βοθρίο τοποθετούνταν με πιπέτα ρυθμιζόμενου όγκου 30 μl του προς εξέταση ορού, χρησιμοποιώντας διαφορετικό ρύγχος για κάθε ορό
- 4) Στη συνέχεια και αμέσως μετά την τοποθέτηση των σαράντα ορών, ακολουθούσε η προσθήκη του αντιγόνου (Synbiotics Corporation, Lyon, France) μετά από ήπια ανακίνηση του περιέκτη του. Η ποσότητα του αντιγόνου που προσετίθετο ήταν ίση με αυτή του ορού, δηλαδή 30 μl
- 5) Μετά την προσθήκη του αντιγόνου σε κάθε βοθρίο, ακολουθούσε η ανάμιξή του με τον ορό με γυάλινο στυλεό, ο οποίος ξεπλενόταν και στεγνωνόταν μετά από κάθε ανάμιξη
- 6) Μετά την ολοκλήρωση της προσθήκης και ανάμιξης του αντιγόνου σε όλα τα βοθρία, η πλάκα εξέτασης τοποθετούνταν σε μηχανικό ανακινήτη ρυθμιζόμενου χρόνου και σταθερής προσθιοπίσθιας κίνησης (30 κινήσεις/λεπτό, χρόνος ανακίνησης 4 λεπτά).

Ανάγνωση και ερμηνεία των αποτελεσμάτων

Η ανάγνωση των αποτελεσμάτων πραγματοποιούνταν μετά την ολοκλήρωση της ανακίνησης της πλάκας στον ανακινήτη. Για την καλύτερη ανάγνωση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιούνταν κατά την επισκόπηση του κάθε βοθρίου μεγεθυντικός φακός. Ανάλογα με το μέγεθος των σχηματιζόμενων κροκίδων και τη διαύγηση του εναιωρήματος, το αποτέλεσμα χαρακτηριζόταν ως εξής:

Αρνητικό ή 0 : απουσία κροκίδων, ομοιόμορφο ερυθρό χρώμα του εναιωρήματος,

Θετικό 1 ή + : παρουσία πολύ μικρού μεγέθους κροκίδων αντιληπτών με μεγεθυντικό φακό και ομοιόμορφο ερυθρό χρώμα εναιωρήματος,

Θετικό 2 ή ++ : παρουσία μεγαλύτερου μεγέθους κροκίδων διακριτών με γυμνό οφθαλμό και ομοιόμορφο ερυθρό χρώμα εναιωρήματος,

Θετικό 3 ή +++ : παρουσία ευμεγέθων κροκίδων και διαύγηση του εναιωρήματος,

Θετικό 4 ή ++++ : παρουσία πολύ μεγάλου μεγέθους κροκίδων (συσσωμάτωση) και πλήρους διαύγηση του εναιωρήματος.

3.1.3 Ανοσοενζυμική μέθοδος (Enzyme linked Immunosorbent Assay – ELISA)

Αρχή της μεθόδου

Η αρχή της ανοσοενζυμικής μεθόδου, βασίζεται α) στη σύνδεση των ειδικών έναντι της βρουκέλλας ανοσοσφαιρινών με αντιγόνο επιστρωμένο στον πυθμένα των φρεατίων της πλάκας εξέτασης, β) στην προσθήκη της ειδικής προς εξέταση αντιανθρώπινης ανοσοσφαιρίνης συνδεδεμένης με το ένζυμο υπεροξειδάση του χρένου

(Horseradish peroxidase – HRP), γ) στη σύνδεση ενός χρωμογόνου με το σύμπλοκο αντιγόνου – αντισώματος – αντι-ανθρώπινης ανοσοσφαιρίνης και δ) στη διαπίστωση της αλλαγής του χρώματος και στη μέτρηση με φασματοφωτόμετρο της απορρόφησης του διαλύματος, σε συγκεκριμένο μήκος κύματος, ανάλογα με το χρωμογόνο που χρησιμοποιείται. Όσο πιο υψηλή είναι η απορρόφηση του δείγματος, τόσο μεγαλύτερη ποσότητα συμπλόκων αντιγόνου – αντισώματος υπάρχει στον προς εξέταση ορό, άρα τόσο πιο θετικό είναι το δείγμα. Η μέθοδος χρησιμοποιείται ξεχωριστά για την ανίχνευση των IgM, των IgG και των IgA ανοσοσφαιρινών.

Εκτέλεση της μεθόδου

Η μέθοδος πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το εμπορικό kit indirect ELISA IgM και indirect ELISA IgG της Panbio Diagnostics, Brisbane, Queensland, Australia, ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η διαδικασία εκτέλεσης της μεθόδου ήταν η εξής:

3.1.3.1 ELISA IgG

- 1) Όλοι οι προς εξέταση οροί και τα αντιδραστήρια της μεθόδου, αφήνονταν να επανέλθουν σε θερμοκρασία δωματίου ($22 \pm 4^\circ\text{C}$)
- 2) Διαδικασία προαραίωσης: σε 10 μl των θετικού (positive control) και αρνητικού (negative control) μάρτυρα, του βαθμονομητή αποκοπής (cut – off) και του κάθε ενός προς εξέταση ορού προσετίθεντο 90 μl αραιωτικού ορού (serum diluent). Ακολούθως, σε 20 μl του αραιωμένου ορού προσετίθεντο και πάλι 180 μl αραιωτικού ορού και αναμιγνύονταν καλά το διάλυμα
- 3) Στο φρεάτιο A1 της μικροπλάκας τοποθετούνταν 100 μl του αρνητικού μάρτυρα, στο φρεάτιο B1 100 μl του θετικού μάρτυρα και στα φρεάτια C1, D1 και E1 100 μl του βαθμονομητή αποκοπής. Στα υπόλοιπα φρεάτια της μικροπλάκας τοποθετούνταν 100 μl από τον κάθε ορό προς εξέταση
- 4) Η μικροπλάκα καλυπτόταν με διαφανές αυτοκόλλητο πλαστικό φύλο και ακολουθούσε επώαση της για 30 λεπτά στους $37 \pm 1^\circ\text{C}$
- 5) Μετά την επώαση ακολουθούσε η πλύση της μικροπλάκας με αραιωμένο ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης (Wash Buffer), σε αναλογία 1 μέρος πυκνού ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης με 19 μέρη απεσταγμένου νερού. Απαιτούνταν έξι πλύσεις της πλάκας χρησιμοποιώντας 350 μl αραιωμένου διαλύματος την κάθε φορά
- 6) Μετά την τελευταία πλύση ακολουθούσε η μεταφορά 100 μl συζευγμένης με υπεροξειδάση του χρένου αντι-ανθρώπινης ανοσοσφαιρίνης IgG (HRP Conjugated Anti-

Human IgG) σε κάθε φρεάτιο και η κάλυψη και επώαση της πλάκας για 30 λεπτά στους $37 \pm 1^\circ\text{C}$

7) Στη συνέχεια επαναλαμβανόταν το στάδιο 5 δηλαδή η πλύση της μικροπλάκας έξι φορές με το αραιωμένο ρυθμιστικό διάλυμα

8) Ακολουθούσε η προσθήκη 100 μl τετραμεθυλβενζιδίνης (TMB – substrate/chromogen) σε κάθε φρεάτιο και η επώαση της πλάκας για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου ($20 - 25^\circ\text{C}$), αρχίζοντας την χρονομέτρηση από την πρώτη προσθήκη. Στο στάδιο αυτό αναπτύσσεται μπλέ χρώμα στο διάλυμα του κάθε φρεατίου

9) Στη συνέχεια σε κάθε φρεάτιο προσθέτονταν 100 μl διαλύματος παύσης (stop solution) με την ίδια σειρά και χρονομέτρηση που ίσχυε κατά τη μεταφορά της τετραμεθυλβενζιδίνης και η πλάκα ανακινούνταν ήπια σε ανακινητή για την καλή ανάμιξη του διαλύματος. Στο στάδιο αυτό το μπλε χρώμα του μείγματος του κάθε φρεατίου μετατρέπεται σε κίτρινο

10) Το τελευταίο στάδιο της διαδικασίας περιλάμβανε την ανάγνωση της απορρόφησης του διαλύματος κάθε φρεατίου σε φασματοφωτόμετρο ρυθμισμένο σε μήκος κύματος 450 nm με φίλτρο αναφοράς 600 – 650 nm.

Ανάγνωση και ερμηνεία των αποτελεσμάτων

Υπολογισμοί

α) Υπολογίστηκε η μέση τιμή απορρόφησης των τριών επαναλήψεων (C1 – E1) του βαθμονομητή αποκοπής (cut – off)

β) Η τιμή κάθε δείγματος υπολογίστηκε με βάση τον τύπο

$$\text{Τιμή δείγματος} = \text{Απορρόφηση δείγματος} / \text{Μέση Τιμή βαθμονομητή αποκοπής}$$

γ) Η τελική τιμή του κάθε δείγματος εκφραζόταν σε μονάδες Panbio και υπολογιζόταν ως εξής:

$$\text{Τιμή δείγματος} = (\text{Απορρόφηση δείγματος} / \text{Μέση Τιμή βαθμονομητή αποκοπής}) \times 10.$$

Ερμηνεία των αποτελεσμάτων

Αρνητικό δείγμα : Τιμή δείγματος < 0,9 ή Τιμή (Panbio) δείγματος < 9,

Υποπτο δείγμα : Τιμή δείγματος : 0,9 – 0,11 ή Τιμή (Panbio) δείγματος : 9 – 11,

Θετικό δείγμα : Τιμή δείγματος > 0,9 ή Τιμή (Panbio) δείγματος > 9.

3.1.3.2 ELISA IgM

1) Όλοι οι προς εξέταση οροί και τα αντιδραστήρια της μεθόδου, αφήνονταν να επανέλθουν σε θερμοκρασία δωματίου ($22 \pm 4^\circ\text{C}$)

2) Διαδικασία προαραίωσης: σε 10 μl των θετικού (positive control) και αρνητικού (negative control) μάρτυρα, του βαθμονομητή αποκοπής (cut – off) και του κάθε ενός

προς εξέταση ορού προσετίθεντο 90 μl αραιωτικού ορού (serum diluent). Ακολούθως, σε 20 μl του αραιωμένου ορού προσετίθεντο 180 μl απορροφητικού IgG ορού και το διάλυμα αναμιγνύονταν καλά. Η τελική αραιώση των απορροφημένων ορών προς εξέταση ήταν 1:100. Η αραιώση του κάθε δείγματος ορού σε απορροφητικό IgG ορό πραγματοποιούνταν: α) για να μειώσει τις μη ειδικές αντιδράσεις, δεσμεύοντας τις IgG ανοσοσφαιρίνες που μπορεί να δώσουν ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα και β) να εξαλείψει την επίδραση του ρευματοειδούς παράγοντα (Rheumatoid Factor – RF) που αποτελεί αιτία ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων

3) Στο φρεάτιο A1 της μικροπλάκας τοποθετούνταν 100 μl του αρνητικού μάρτυρα, στο φρεάτιο B1 100 μl του θετικού μάρτυρα και στα φρεάτια C1, D1 και E1 100 μl του βαθμονομητή αποκοπής. Στα υπόλοιπα φρεάτια της μικροπλάκας τοποθετούνταν 100 μl από τον κάθε ορό προς εξέταση

4) Η μικροπλάκα καλυπτόταν με διαφανές αυτοκόλλητο πλαστικό φύλο και ακολουθούσε επώαση της για 30 λεπτά στους $37 \pm 1^\circ\text{C}$

5) Μετά την επώαση ακολουθούσε η πλύση της μικροπλάκας με αραιωμένο ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης (Wash Buffer), σε αναλογία 1 μέρος πυκνού ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης με 19 μέρη απεσταγμένου νερού. Απαιτούνταν έξι πλύσεις της πλάκας χρησιμοποιώντας 350 μl αραιωμένου διαλύματος την κάθε φορά

6) Μετά την τελευταία πλύση ακολουθούσε η προσθήκη 100 μl συζευγμένης με υπεροξειδάση του χρένου αντι-ανθρώπινης ανοσοσφαιρίνης IgG (HRP Conjugated Anti-Human IgG) σε κάθε φρεάτιο και η κάλυψη και επώαση της πλάκας για 30 λεπτά στους $37 \pm 1^\circ\text{C}$

7) Στη συνέχεια επαναλαμβάνονταν το στάδιο 5, δηλαδή η πλύση της μικροπλάκας έξι φορές με το αραιωμένο ρυθμιστικό διάλυμα

8) Ακολουθούσε η προσθήκη 100 μl τετραμεθυλβενζιδίνης (TMB – substrate/chromogen) σε κάθε φρεάτιο και η επώαση της πλάκας για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου ($20 - 25^\circ\text{C}$), αρχίζοντας τη χρονομέτρηση από την πρώτη προσθήκη. Στο στάδιο αυτό αναπτύσσεται μπλε χρώμα στο διάλυμα του κάθε φρεατίου

9) Στη συνέχεια, σε κάθε φρεάτιο προσθέτονταν 100 μl διαλύματος παύσης (stop solution) με την ίδια σειρά και χρονομέτρηση που ίσχυε κατά τη μεταφορά της τετραμεθυλβενζιδίνης και η πλάκα ανακινούνταν ήπια σε ανακινητή για την καλή ανάμιξη του διαλύματος. Στο στάδιο αυτό το μπλε χρώμα του διαλύματος του κάθε φρεατίου μετατρέπεται σε κίτρινο

10) Το τελευταίο στάδιο της διαδικασίας περιλάμβανε την ανάγνωση της απορρόφησης του διαλύματος κάθε φρεατίου σε φασματοφωτόμετρο ρυθμισμένο σε μήκος κύματος 450 nm με φίλτρο αναφοράς 600 – 650 nm.

Ανάγνωση και ερμηνεία των αποτελεσμάτων

Υπολογισμοί

α) Υπολογίστηκε η μέση τιμή απορρόφησης των τριών επαναλήψεων (C1 – E1) του βαθμονομητή αποκοπής (cut – off)

β) Η τιμή κάθε δείγματος υπολογίστηκε με βάση τον τύπο

$$\text{Τιμή}_{\text{δείγματος}} = \text{Απορρόφηση}_{\text{δείγματος}} / \text{Μέση Τιμή βαθμονομητή αποκοπής}$$

γ) Η τελική τιμή του κάθε δείγματος εκφραζόταν σε μονάδες Panbio και υπολογιζόταν ως εξής:

$$\text{Τιμή}_{\text{δείγματος}} = (\text{Απορρόφηση}_{\text{δείγματος}} / \text{Μέση Τιμή βαθμονομητή αποκοπής}) \times 10.$$

Ερμηνεία των αποτελεσμάτων

Αρνητικό δείγμα : Τιμή $_{\text{δείγματος}} < 0,9$ ή Τιμή (Panbio) $_{\text{δείγματος}} < 9$,

Υποπτο δείγμα : Τιμή $_{\text{δείγματος}} : 0,9 - 0,11$ ή Τιμή (Panbio) $_{\text{δείγματος}} : 9 - 11$,

Θετικό δείγμα : Τιμή $_{\text{δείγματος}} > 0,9$ ή Τιμή (Panbio) $_{\text{δείγματος}} > 9$.

Τόσο η διαδικασία εκτέλεσης της μεθόδου (ELISA IgG και ELISA IgM), όσο και ο υπολογισμός της τιμής $_{\text{δείγματος}}$ σε μονάδες Panbio, πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση του αυτόματου αναλυτή ELISA (Triturus Grifols SA, Barcelona, Spain), και του λογισμικού Triturus (Triturus software, ver 3.00b) αντίστοιχα.

3.1.4 Μέθοδος της φθορίζουσας πόλωσης του φωτός (Fluorescence Polarization Assay – FPA)

Αρχή της μεθόδου

Ο Perrin (1926) περιέγραψε πρώτος τη μέθοδο της φθορίζουσας πόλωσης του φωτός.

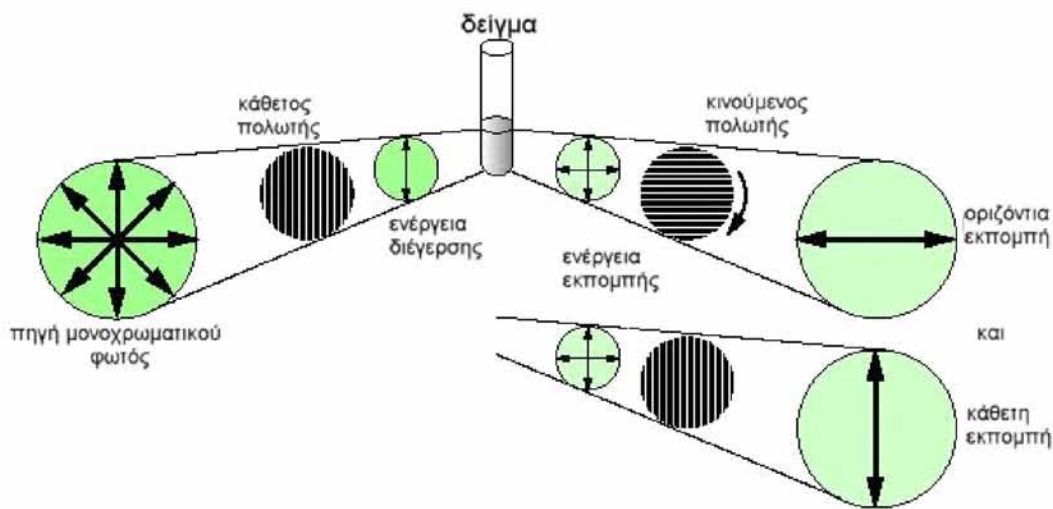
Η βασική αρχή, στην οποία στηρίζεται η μέθοδος της φθορίζουσας πόλωσης του φωτός είναι η εξής: όταν μια δέσμη μονοχρωματικού και επίπεδα πολωμένου φωτός από κάθετο επίπεδο πόλωσης, προσπίπτει σε ένα φθορίζον μόριο που βρίσκεται μέσα σε διάλυμα, τότε αυτό διεγείρεται. Η διέγερση, η οποία συμβαίνει σε ελάχιστο χρόνο (~ fsec), οδηγεί σε αύξηση της κινητικής ενέργειας του μορίου και σε περιστροφή του. Κατά την διάρκεια της περιστροφής του το μόριο εκπέμπει φωτόνια, τα οποία κινούνται τόσο στο παράλληλο, όσο και στο κάθετο επίπεδο του επιπέδου διέγερσης.

Μόνο όσα φθορίζοντα μόρια είναι προσανατολισμένα στο κάθετο επίπεδο πόλωσης απορροφούν το φως, διεγείρονται και στη συνέχεια εκπέμπουν φως δηλ

φθορίζουν. Το εκπεμπόμενο από αυτά φως μετράται τόσο στο οριζόντιο όσο και στο κάθετο επίπεδο.

Στο Σχήμα 1 περιγράφεται σχηματικά η θεωρητική βάση της φθορίζουσας πόλωσης του φωτός:

Σχήμα 2: Σχηματική απεικόνιση της θεωρητικής βάσης της φθορίζουσας πόλωσης του φωτός.



Η τιμή πόλωσης υπολογίζεται με βάση τον παρακάτω μαθηματικό τύπο:

$$\text{Πόλωση} = \frac{\text{Ένταση φθορισμού κάθετο επίπεδο} - \text{Ένταση φθορισμού οριζόντιο επίπεδο}}{\text{Ένταση φθορισμού κάθετο επίπεδο} + \text{Ένταση φθορισμού οριζόντιο επίπεδο}}$$

Το αποτέλεσμα, παρά το γεγονός ότι είναι απόλυτος αριθμός, συχνά εκφράζεται σε millipolarization units (1 Polarization unit = 1000 mP units).

Διάφοροι άλλοι παράγοντες όπως η γλοιότητα και η θερμοκρασία του διαλύματος, μπορούν να επηρεάσουν την τιμή πόλωσης. Ολοι αυτοί οι παράγοντες συνδέονται με τη σχέση:

$$\left(\frac{1}{P} - \frac{1}{3} \right) = \left(\frac{1}{P_0} - \frac{1}{3} \right) \times \left(1 + \frac{RTt}{nV} \right)$$

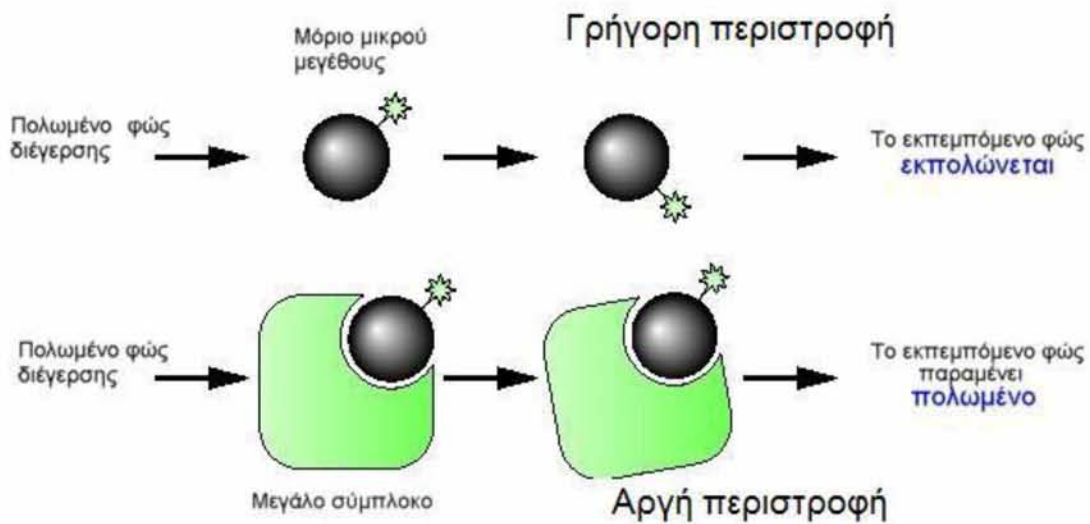
όπου: P η τιμή πόλωσης, P₀ η τιμή πόλωσης, εάν δεν υπήρχε καμία περιστροφική κίνηση, R η παγκόσμια σταθερά των αερίων, T η θερμοκρασία του διαλύματος, t η διάρκεια φθορισμού του μορίου, n η γλοιότητα του διαλύματος και V ο όγκος του διαλύματος.

Όσο πιο μικρό είναι το μέγεθος του φθορίζοντος μορίου, τόσο πιο γρήγορα αυτό περιστρέφεται (έχει οριστεί να υπολογίζεται η περιστροφή σε μια γωνία 68,5°) και τόσο

πιο γρήγορα επιστρέφει στην πριν τη διέγερση ενεργειακή κατάσταση. Η αύξηση της ταχύτητας περιστροφής οδηγεί σε εκπόλωση του εκπεμπόμενου από το μόριο φωτός. Η ταχύτητα περιστροφής παραμένει υψηλή καθ' όλη τη διάρκεια της φθορίζουσας ζωής του, δηλαδή του χρόνου που μεσολαβεί από τη διέγερση μέχρι την παύση του φθορισμού. Αν το φθορίζον μόριο συνδεθεί με ένα μεγαλύτερου μεγέθους μόριο, το δραστικό μοριακό μέγεθος αυξάνει. Η αύξηση του μεγέθους οδηγεί στην επιβράδυνση της ταχύτητας περιστροφής και στη διατήρηση του εκπεμπόμενου φωτός πολωμένου. Επομένως, το φθορίζον μόριο έχει δύο τιμές ενδογενούς πόλωσης: μια χαμηλή τιμή στην ελεύθερη του κατάσταση και μια υψηλή στην κατάσταση σύνδεσης.

Στο Σχήμα 2 γίνεται αντιληπτή η σχέση μοριακού όγκου, ταχύτητας περιστροφής και εκπομπής φθορίζοντος φωτός.

Σχήμα 3: Σχηματική απεικόνιση της σχέσης μοριακού όγκου, ταχύτητας περιστροφής και εκπομπής φθορίζοντος φωτός.



Η τιμή πόλωσης P είναι ανάλογη με το χρόνο εκτόνωσης t της ενέργειας κατά την περιστροφή, επομένως με τη διάρκεια του φθορισμού και με την πόλωση του εκπεμπόμενου φωτός και η μαθηματική έκφραση της σχέσης αυτής είναι:

$$\text{Πόλωση (P)} \propto t = \frac{3nV}{RT}$$

όπου η = γλοιότητα, T = απόλυτη θερμοκρασία, V = όγκος μορίου και R = σταθερά των αερίων.

Συμπερασματικά, όσο πιο μικρό είναι το μέγεθος του φθορίζοντος μορίου, τόσο πιο χαμηλή είναι η πόλωση του εκπεμπόμενου φωτός, ενώ αντίθετα, όσο το μέγεθος του μορίου αυξάνει, τόσο η πόλωση του φωτός είναι υψηλότερη (Dandliker W.B. & De Saussure V.A. 1970, Williams Rhys A.T. 1980, Nasir M.S., Jolley M.E. 1999, Nielsen K. & Gall D. 2001a).

Σύμφωνα, λοιπόν, με τη θεωρητική βάση της μεθόδου, στον προς εξέταση ορό προστίθεται αντιγόνο έναντι της βρουκέλλας, το οποίο είναι σημασμένο με φθορίζον μόριο. Εφ' όσον ο ορός είναι αρνητικός (δεν περιέχει αντισώματα έναντι της βρουκέλλας), το μέγεθος του διεγερθέντος μορίου δηλαδή του αντιγόνου θα παραμείνει μικρό, η ταχύτητα περιστροφής του κατά τη διέγερση θα είναι υψηλή και κατ' επέκταση η τιμή του πολωμένου φωτός θα παραμείνει χαμηλή. Αντίθετα, εάν ο προς εξέταση ορός είναι θετικός, το αντιγόνο θα δημιουργήσει σύμπλοκο με το αντίσωμα, το μέγεθος του διεγερθέντος μορίου θα αυξηθεί, η ταχύτητα περιστροφής του κατά τη διέγερση θα μειωθεί και επομένως η τιμή πόλωσης θα είναι υψηλή.

Εκτέλεση της μεθόδου

Η μέθοδος πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο που ακολουθείται στο Κτηνιατρικό Εργαστήριο Λάρισας (Εθνικό Εραστήριο Αναφοράς Βρουκέλλωσης) και η διαδικασία εκτέλεσης της μεθόδου ήταν η εξής:

- 1) Όλοι οι προς εξέταση οροί, καθώς και τα αντιδραστήρια της μεθόδου, αφήνονταν να επανέλθουν σε θερμοκρασία δωματίου ($22 \pm 4^\circ\text{C}$)
- 2) Για την εκτέλεση της μεθόδου χρησιμοποιήθηκε μικροπλάκα 96 φρεατίων, επίπεδου πυθμένα, τύπου COS96fb, από μαύρο πολυστυρένιο (Corning, USA)
- 3) Στα τρία πρώτα φρεάτια της πρώτης στήλης (A1, B1 και C1) τοποθετούνταν από 200 μl διαλύματος εργασίας buffer, ενώ σε όλα τα υπόλοιπα φρεάτια της μικροπλάκας από 180 μl του ίδιου διαλύματος. Το αρχικό διάλυμα βρισκόταν σε πυκνή συγκέντρωση 25X και η αραιώση εργασίας γινόταν κάθε φορά με την προσθήκη για κάθε μέρος διαλύματος, 24 μερών δισαππεσταγμένου και αποστειρωμένου ύδατος

4) Στη συνέχεια γινόταν η προσθήκη του θετικού και αρνητικού μάρτυρα και των προς εξέταση ορών ως εξής: στα φρεάτια A1, B1 και C1 δεν προσετίθετο ορός (buffer controls), στα φρεάτια D1 και E1 προσετίθεντο από 20 μl θετικού μάρτυρα (positive controls) και στα φρεάτια F1 και G1 από 20 μl αρνητικού μάρτυρα (negative controls). Ως θετικός και αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιούνταν οροί βόειας προέλευσης. Τέλος, σε όλα τα υπόλοιπα φρεάτια της μικροπλάκας, προσετίθεντο 20 μl από τον κάθε ένα προς εξέταση ορό

5) Η μικροπλάκα τοποθετούνταν σε κυκλικό ανακινητή μικροπλακών και γινόταν ήπια ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 2 λεπτά, προς καλύτερη ανάμιξη των ορών με το διάλυμα buffer

6) Μετά την αρχική ανάμιξη, η μικροπλάκα τοποθετούνταν στον αναλυτή πολλαπλών λειτουργιών (Tecan Genios Pro) ρυθμισμένο στη λειτουργία φθορίζουσας πόλωσης, ο οποίος ήταν συνδεδεμένος με φορητό ηλεκτρονικό υπολογιστή και λαμβανόταν η ανάγνωση του υπόβαθρου (background reading)

7) Αμέσως μετά την πρώτη ανάγνωση, σε κάθε φρεάτιο τοποθετούνταν 10 μl αντιγόνου (O – polysaccharide από *Br abortus* στέλεχος 1119.3, συνδεδεμένο με φθορίζον μόριο Fluoro-isothiocyanate – FITC) και επαναλαμβάνονταν το στάδιο της ήπιας ανάδευσης για 3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου

8) Μετά την ανάδευση, λαμβανόταν μια δεύτερη ανάγνωση στον αναλυτή, ο οποίος αυτόματα αφαιρούσε την τιμή του υπόβαθρου από την πρώτη ανάγνωση και υπολόγιζε μια τιμή για κάθε δείγμα εκφρασμένη σε millipolarization units (mP).

Όλα τα αντιδραστήρια (πυκνό διάλυμα buffer, θετικοί και αρνητικοί μάρτυρες και αντιγόνο συνδεδεμένο με το φθορίζον μόριο) που χρησιμοποιήθηκαν στη μέθοδο καθώς και το ειδικό λογισμικό για τον υπολογισμό των τιμών παρασκευάστηκαν από την Diachemix, Whitefish Bay, WI, USA και διατέθηκαν από την Prionics AG, Switzerland.

Βαθμονόμηση του αναλυτή

Για την βαθμονόμηση του αναλυτή, που γινόταν πριν από κάθε εξέταση, χρησιμοποιούνταν πρότυπα διαλύματα μηδενικής και χαμηλής πόλωσης (blank and low polarized standards), τα οποία συνόδευαν τα αντιδραστήρια της μεθόδου.

Η βαθμονόμηση γινόταν αυτόματα. Ο αναλυτής παίρνει την τιμή του διαλύματος χαμηλής πόλωσης που είναι ρυθμισμένο στα 25 mP και υπολογίζει έναν εσωτερικό αντισταθμιστικό παράγοντα (G – factor), ο οποίος χρησιμοποιείται στην εξίσωση υπολογισμού του τελικού αποτελέσματος.

Οι παράμετροι μέτρησης ρυθμίζονταν πριν από κάθε μέτρηση ως εξής: Gain – factor (ο οποίος χρησιμοποιείται από το λογισμικό του αναλυτή για τον υπολογισμό του G – factor) 55, χρόνος ολοκλήρωσης 40 μ s, 10 εκλύσεις το δευτερόλεπτο ανά φρεάτιο, μήκος κύματος φίλτρου διέγερσης 485 nm και μήκος κύματος φίλτρου εκπομπής 535 nm.

Τα αποτελέσματα κάθε μέτρησης γίνονταν αποδεκτά εφ' όσον οι τιμές ήταν:

- α) για το θετικό μάρτυρα: τιμή > 180 mP
- β) για τον αρνητικό μάρτυρα: 60 mP < τιμή < 85 mP
- γ) για το διάλυμα buffer: 70 mP < τιμή < 80 mP.

Ανάγνωση και ερμηνεία των αποτελεσμάτων

Σε πρώτη φάση και μετά από την ολοκλήρωση των μετρήσεων του συνόλου των δειγμάτων ορών, απλώς καταγράφηκαν οι τιμές τους χωρίς να αξιολογηθούν ως θετικά ή αρνητικά τα αποτελέσματα κάθε μέτρησης.

4. Μετρήσεις - Στατιστική ανάλυση

Όλα τα αποτελέσματα εισήχθησαν σε ειδική βάση δεδομένων που δημιουργήθηκε στο ιατρικό στατιστικό λογισμικό MedCalc (version 8.0). Με το λογισμικό αυτό έγινε περιγραφική ανάλυση των δεδομένων και για την αξιολόγηση και σύγκριση των αποτελεσμάτων όλων των μεθόδων χρησιμοποιήθηκαν:

(1) Η **ROC analysis** (Receiver-Operating Characteristic analysis). Η συγκεκριμένη μέθοδος ανάλυσης λαμβάνει το σύνολο των τιμών που υπάρχουν μεταξύ της χαμηλότερης και της υψηλότερης τιμής όλων των μετρήσεων και:

- Σχηματίζει μία **καμπύλη** (ROC Curve) με οριζόντιο άξονα την ειδικότητα και κάθετο την ευαισθησία με το σύνολο των τιμών αυτών, βάσει της οποίας υπολογίζεται η **περιοχή κάτω από την καμπύλη** (Area Under Curve – AUC)
- Δίνει για κάθε μια από τις τιμές αυτές την αντίστοιχη **ευαισθησία** (Sensitivity – Se) και **ειδικότητα** (Specificity – Sp), εφ' όσον η τιμή αυτή επιλεγεί ως τιμή cut-off
- Προτείνει ως ιδανική **τιμή cut-off** (cut-off value) την τιμή εκείνη, της οποίας η αντίστοιχη ευαισθησία και ειδικότητα δίνουν το μεγαλύτερο άθροισμα (maximum sum), όταν προστεθούν οι τιμές τους
- Υπολογίζει για κάθε τιμή cut-off, το **Λόγο πιθανοτήτων θετικού αποτελέσματος** (Positive Likelihood Ratio – LR+), και το **Λόγο πιθανοτήτων αρνητικού αποτελέσματος** (Negative Likelihood Ratio – LR-)

- Υπολογίζει τα **95% όρια αξιοπιστίας** (Confidence Interval - CI 95 %) όλων των παραπάνω παραμέτρων (Greiner M. et al 2000).

Με την ROC analysis υπολογίστηκαν η τιμή cut-off (cut-off value) και οι παράμετροι ευαισθησία, ειδικότητα, λόγος πιθανοτήτων θετικού και λόγος πιθανοτήτων αρνητικού αποτελέσματος. Επίσης υπολογίστηκε η περιοχή κάτω από την καμπύλη (AUC – Area Under the ROC Curve). Με την ROC analysis έγινε σύγκριση των καμπυλών όλων των μεθόδων (Comparison of ROC Curves) και υπολογίστηκε η διαφορά των περιοχών κάτω από την καμπύλη κάθε μεθόδου με όλες τις υπόλοιπες, συγκρινόμενες ανά ζεύγος (pairwise comparison of ROC curves). Για κάθε μια από τις παραπάνω παραμέτρους υπολογίστηκαν επίσης τα 95% όρια αξιοπιστίας.

(2) Η **K-statistic**. Η μέθοδος αυτή εκτιμά τη **συμφωνία των αποτελεσμάτων** (inter-rater agreement) μεταξύ των τιμών δύο ομοειδών συνόλων δεδομένων. Η K-statistic εκφράζεται με την **τιμή K** (K-value). Η ισχύς της συμφωνίας των αποτελεσμάτων σύμφωνα με τον Altman (Altman D.G. 1995) χαρακτηρίζεται ως:

- Πολύ καλή (very good - $0,81 \leq \text{τιμή K} \leq 1$)
- Καλή (good - $0,61 \leq \text{τιμή K} \leq 0,80$)
- Μέτρια (moderate - $0,41 \leq \text{τιμή K} \leq 0,60$)
- Κακή (fair - $0,21 \leq \text{τιμή K} \leq 0,40$)
- Πολύ κακή (poor - $0 \leq \text{τιμή K} \leq 0,20$).

Με την K-statistic υπολογίστηκε η τιμή K, δηλαδή η συμφωνία των αποτελεσμάτων της κάθε μεθόδου με το «status disease», όπως επίσης και της κάθε μεθόδου με όλες τις υπόλοιπες, συγκρινόμενες ανά ζεύγος. Επίσης υπολογίστηκαν για κάθε τιμή K τα 95% όρια αξιοπιστίας.

Διαγνωστικές παράμετροι

Για κάθε μια από τις μεθόδους που εφαρμόστηκαν, υπολογίστηκαν οι παρακάτω διαγνωστικές παράμετροι:

- 1. Τιμή cut-off (cut-off value):** η τιμή πάνω από την οποία το αποτέλεσμα μιας ορολογικής μεθόδου θεωρείται θετικό
- 2. Ευαισθησία (Sensitivity – Se):** η αναλογία των ασθενών με βρουκέλλωση που εμφανίζουν θετικό αποτέλεσμα στη μέθοδο ή αλλιώς η πιθανότητα της μεθόδου να διαγνώσει τη βρουκέλλωση στους ασθενείς με τη νόσο.

Ευαισθησία = ασθενείς / (ασθενείς + ψευδώς αρνητικοί ασθενείς)

3. Ειδικότητα (Specificity – Sp): η αναλογία των υγιών μαρτύρων που εμφανίζουν αρνητικό αποτέλεσμα στη μέθοδο ή αλλιώς η πιθανότητα της μεθόδου να μη διαγνώσει τη βρουκέλλωση στους υγιείς μάρτυρες.

Ειδικότητα = υγιείς μάρτυρες / (υγιείς μάρτυρες + ψευδώς θετικοί υγιείς μάρτυρες)

4. Λόγος πιθανοτήτων (Likelihood Ratio – LR): η πιθανότητα ένα συγκεκριμένο αποτέλεσμα στη μέθοδο να βρεθεί σε έναν ασθενή προς την πιθανότητα το ίδιο αποτέλεσμα να βρεθεί σε έναν υγιή μάρτυρα

4α. Λόγος πιθανοτήτων θετικού αποτελέσματος (Likelihood Ratio Positive – LR+): η πιθανότητα ένα θετικό αποτέλεσμα στη μέθοδο να βρεθεί σε έναν ασθενή προς την πιθανότητα το ίδιο αποτέλεσμα να βρεθεί σε έναν υγιή μάρτυρα.

Λόγος πιθανοτήτων θετικού αποτελέσματος = Ευαισθησία / (1 – Ειδικότητα)

4β. Λόγος πιθανοτήτων αρνητικού αποτελέσματος (Likelihood Ratio Negative – LR-): η πιθανότητα ένα αρνητικό αποτέλεσμα στη μέθοδο, να βρεθεί σε έναν ασθενή προς την πιθανότητα το ίδιο αποτέλεσμα να βρεθεί σε έναν υγιή μάρτυρα.

Λόγος πιθανοτήτων αρνητικού αποτελέσματος = (1 – Ευαισθησία) / Ειδικότητα

5. Περιοχή κάτω από την καμπύλη (Area Under the ROC Curve – AUC): η πιθανότητα ένα τυχαίο δείγμα που λαμβάνεται από το σύνολο των ασθενών να εμφανίζει μεγαλύτερη τιμή από ένα τυχαίο δείγμα που λαμβάνεται από το σύνολο των μαρτύρων, όταν εξετάζονται με μία συγκεκριμένη μέθοδο

6. Τιμή K (K-value): είναι η τιμή με την οποία εκφράζεται η ισχύς της συμφωνίας των αποτελεσμάτων μεταξύ των τιμών δύο ομοειδών συνόλων δεδομένων.

2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Συνολικά συλλέχθηκαν 313 οροί αίματος από ύποπτους ασθενείς και 317 οροί αίματος από αιμοδότες που πληρούσαν όλες τις προϋποθέσεις που προαναφέρθηκαν, για να χαρακτηριστούν οι μεν πρώτοι ως ύποπτοι για βρουκέλλωση, οι δε δεύτεροι ως υγιείς μάρτυρες.

2.1 Εξετασθέντα δείγματα

Ύποπτοι ασθενείς: από τους 313 ύποπτους ασθενείς:

- 147 έδωσαν δείγματα με θετικό αποτέλεσμα και στις τρεις ορολογικές δοκιμές με τις οποίες εξετάστηκαν δηλαδή και στην SAT και στην RBT και στην ELISA (είτε στην IgM, είτε στην IgG, είτε και στις δύο ταυτόχρονα). Οι ύποπτοι αυτοί ασθενείς αποτέλεσαν την **Ομάδα Α – Θετικοί στη βρουκέλλωση (Brucellosis Positive - BP)**
- 230 έδωσαν δείγματα που εμφάνισαν θετικό αποτέλεσμα σε δύο τουλάχιστον από τις τρεις ορολογικές δοκιμές με τις οποίες εξετάστηκαν και αποτέλεσαν την **Ομάδα Β**
- 271 έδωσαν δείγματα με θετικό αποτέλεσμα σε μία τουλάχιστον από τις τρεις ορολογικές εξετάσεις και αποτέλεσαν την **ομάδα Γ**
- 42 έδωσαν δείγματα τα οποία δεν εμφάνισαν θετική τιμή σε καμία από τις τρεις ορολογικές μεθόδους που εφαρμόστηκαν. Οι ύποπτοι αυτοί ασθενείς εξαιρέθηκαν από την παρούσα μελέτη.

Υγιείς αιμοδότες: από τους 317 υγιείς αιμοδότες:

- 305 έδωσαν δείγματα με αρνητικό αποτέλεσμα και στις τρεις ορολογικές δοκιμές με τις οποίες εξετάστηκαν δηλαδή και στην SAT και στην RBT και στην ELISA (και στην IgM και στην IgG). Οι υγιείς αυτοί αιμοδότες αποτέλεσαν την **Ομάδα Μ – Αρνητικοί στη βρουκέλλωση (Brucellosis Negative – BN)**
- 12 έδωσαν δείγματα με θετικό αποτέλεσμα τουλάχιστον σε μία εκ των τριών ορολογικών δοκιμών με τις οποίες εξετάστηκαν. Οι υγιείς αυτοί αιμοδότες εξαιρέθηκαν από την παρούσα μελέτη.

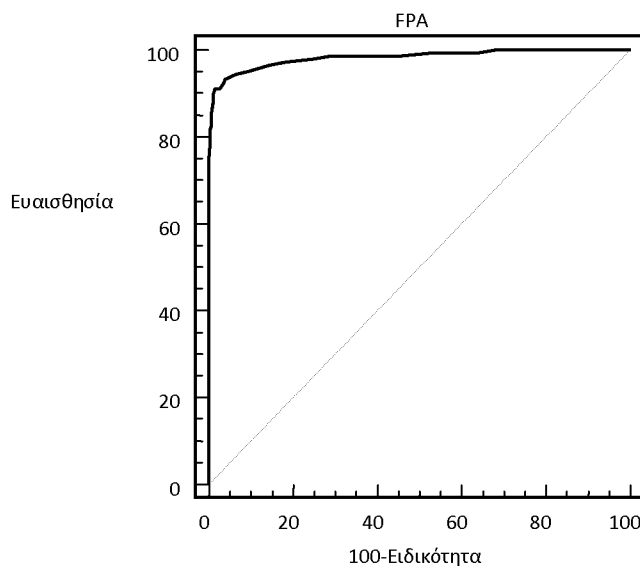
2.2 Αξιολόγηση της μεθόδου FPA και σύγκριση με τις άλλες μεθόδους

2.2.1 Αξιολόγηση σε θετικούς στη βρουκέλλωση ασθενείς (BP) και αρνητικούς στη βρουκέλλωση μάρτυρες (BN) – Ομάδα Α και Ομάδα Μ.

Τα αποτελέσματα των δειγμάτων των 147 θετικών ασθενών και των 305 αρνητικών μαρτύρων αναλύθηκαν, χρησιμοποιώντας την ROC analysis (Receiver Operating Characteristic analysis).

Τα αποτελέσματα της ROC analysis, παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 4:

Διάγραμμα 4: Η καμπύλη της ROC analysis και η περιοχή κάτω από την καμπύλη (AUC).



Η περιοχή κάτω από την καμπύλη (AUC – Area Under Curve) υπολογίστηκε ότι είναι 0,983 (95 % CI : 96,7 - 99,3).

Από την ROC analysis επιλέχθηκε η τιμή cut-off των 102 mP ως η ιδανικότερη, επειδή ήταν η τιμή που έδινε το μέγιστο άθροισμα (189,6) ευαισθησίας και ειδικότητας. Όλα τα δείγματα που έδωσαν τιμή 102 mP θεωρήθηκε ότι είναι αρνητικά.

Η μέθοδος FPA με το συγκεκριμένο cut-off (102 mP), ανίχνευσε ως θετικά τα 134 από τα 147 θετικά δείγματα με εύρος τιμών από 103 έως και 307 mP, ενώ έδωσε και 13 ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα με εύρος τιμών από 87 έως και 102 mP.

Επίσης με το συγκεκριμένο cut-off ανίχνευσε ως αρνητικά τα 300 από τα 305 αρνητικά δείγματα με εύρος τιμών από 57 έως και 102 mP, ενώ έδωσε και πέντε ψευδώς θετικά αποτελέσματα με εύρος τιμών από 103 έως και 118 mP.

Στον πίνακα 14 φαίνονται συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα της FPA για τη συγκεκριμένη τιμή cut-off, στη συγκεκριμένη ομάδα θετικών και αρνητικών δειγμάτων.

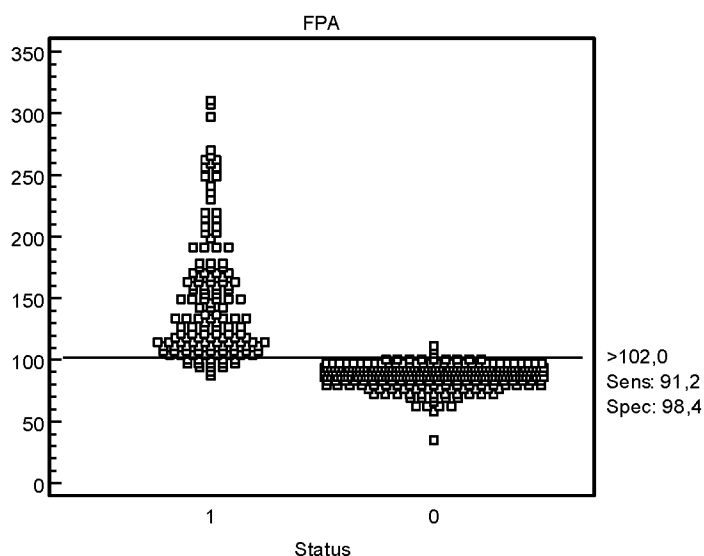
Πίνακας 14: Αποτελέσματα της FPA στο σύνολο των θετικών και των αρνητικών δειγμάτων

		Βρουκέλλωση	
		BP	BN
FPA	Θετική τιμή	134	5
	Αρνητική τιμή	13	300
		147	305

Για τη συγκεκριμένη τιμή cut-off, η ευαισθησία της μεθόδου υπολογίστηκε ότι είναι 91,2 % (95 % CI : 85,3 – 95,2) και η ειδικότητα 98,4 % (95 % CI : 96,2 – 99,5). Ο λόγος πιθανοτήτων θετικού αποτελέσματος (LR+) υπολογίστηκε ότι είναι 55,61, ενώ ο λόγος πιθανοτήτων αρνητικού αποτελέσματος (LR-) 0,09. Ο υπολογισμός της τιμής K (K value) που καθορίζει την συμφωνία των αποτελεσμάτων της μεθόδου με τις ομάδες των θετικών και αρνητικών δειγμάτων, πραγματοποιήθηκε με την Kappa analysis. Για την ίδια τιμή cut-off η τιμή K βρέθηκε ότι είναι 0,908 (95 % CI: 0,87 – 0,95).

Το διάγραμμα διασποράς των τιμών της FPA παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 5:

Διάγραμμα 5: Διάγραμμα διασποράς των τιμών της FPA



Στον Πίνακα 15 αναφέρονται οι μεταβολές της ευαισθησίας και της ειδικότητας της μεθόδου FPA ανάλογα με την αύξηση ή την ελάττωση της τιμής του cut-off.

Πίνακας 15: Ευαισθησία και ειδικότητα της μεθόδου FPA ανάλογα με την τιμή cut-off

Τιμή cut -off	Ευαισθησία (95% CI)	Ειδικότητα (95% CI)
86	100 (97,5 - 100)	31,8 (26,6 - 37,4)
87	99,3 (96,3 - 99,9)	36,1 (30,7 - 41,7)
88	99,3 (96,3 - 99,9)	40,7 (35,1 - 46,4)
89	99,3 (96,3 - 99,9)	46,9 (41,2 - 52,7)
90	98,6 (95,2 - 99,8)	54,4 (48,7 - 60,1)
91	98,6 (95,2 - 99,8)	60,0 (54,3 - 65,5)
92	98,6 (95,2 - 99,8)	65,2 (59,6 - 70,6)
93	98,6 (95,2 - 99,8)	70,8 (65,4 - 75,9)
94	98,0 (94,1 - 99,6)	75,1 (69,8 - 79,8)
95	97,3 (93,2 - 99,2)	81,6 (76,8 - 85,8)
96	96,6 (92,2 - 98,9)	85,6 (81,1 - 89,3)
97	95,2 (90,4 - 98,1)	90,5 (86,6 - 93,5)
98	94,6 (89,6 - 97,6)	93,4 (90,1 - 95,9)
99	93,2 (87,8 - 96,7)	96,1 (93,2 - 97,9)
100	92,5 (87,0 - 96,2)	96,4 (93,6 - 98,2)
101	91,2 (85,3 - 95,2)	97,4 (94,9 - 98,9)
102 *	91,2 (85,3 - 95,2)	98,4 (96,2 - 99,5)
103	89,8 (83,7 - 94,2)	99,0 (97,1 - 99,8)
104	87,8 (81,3 - 92,6)	99,0 (97,1 - 99,8)
105	85,0 (78,2 - 90,4)	99,3 (97,6 - 99,9)
106	84,4 (77,5 - 89,8)	99,3 (97,6 - 99,9)
107	82,3 (75,2 - 88,1)	99,3 (97,6 - 99,9)
108	81,6 (74,4 - 87,5)	99,7 (98,2 - 99,9)
109	80,3 (72,9 - 86,4)	99,7 (98,2 - 99,9)
110	78,2 (70,7 - 84,6)	99,7 (98,2 - 99,9)
111	75,5 (67,7 - 82,2)	100 (98,8 - 100,0)

2.2.2. Αξιολόγηση σε ύποπτους ασθενείς με δύο τουλάχιστον μεθόδους θετικές και αρνητικούς στη βρουκέλλωση μάρτυρες (BN) – Ομάδα Β και Ομάδα Μ.

Επειδή η βρουκέλλωση είναι νόσος ενδημική στην Ελλάδα, αποφασίστηκε η μέθοδος FPA να διερευνηθεί σε μία ομάδα ύποπτων ασθενών, χρησιμοποιώντας αυστηρότερα κριτήρια σε σχέση με τον ορισμό της περίπτωσης βρουκέλλωσης που δίνει ο Π.Ο.Υ. Έτσι, ως θετικά δείγματα χρησιμοποιήθηκαν οι οροί εκείνοι που έδωσαν θετικό αποτέλεσμα σε δύο τουλάχιστον ορολογικές μεθόδους αντί της μίας που ορίζει ο Π.Ο.Υ.

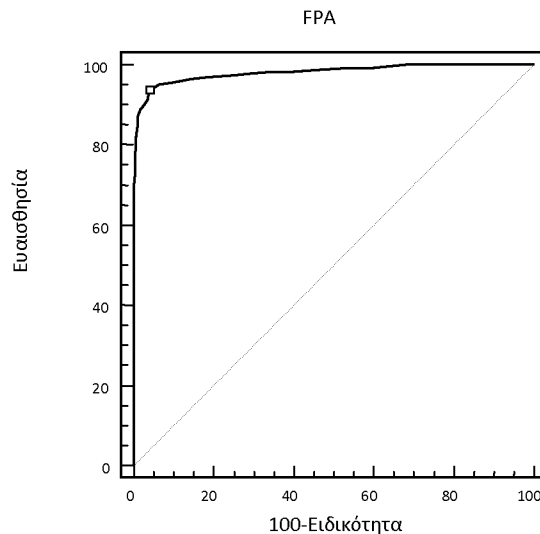
Τα αποτελέσματα των 230 θετικών (Ομάδα Β) και των 305 BN αναλύθηκαν και πάλι χρησιμοποιώντας την ROC analysis, τόσο για κάθε μία από τις μεθόδους ξεχωριστά, όσο και συγκριτικά για όλες τις μεθόδους μεταξύ τους.

2.2.2.1 Εκτίμηση της κάθε μεθόδου χωριστά.

2.2.2.1.1 FPA

Η ROC analysis έδωσε για την FPA την παρακάτω καμπύλη η οποία παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 6:

Διάγραμμα 6 : Η καμπύλη της ROC analysis για την FPA.



Η AUC υπολογίστηκε ότι είναι 0,956 (CI 95 % : 93,5 - 97,2). Ως τιμή cut-off ορίστηκε η τιμή των 99 mP, επειδή έδωσε το μεγαλύτερο άθροισμα (189,6) ευαισθησίας και ειδικότητας. Όλα τα δείγματα που έδωσαν τιμή 99 mP θεωρήθηκαν αρνητικά.

Η μέθοδος FPA με τιμή cut-off 99 ανίχνευσε ως θετικά τα 215 από τα 230 θετικά δείγματα με εύρος τιμών από 100 έως 310 mP, ενώ έδωσε και 15 ψευδώς αρνητικά

αποτελέσματα με εύρος τιμών από 87 έως 99 mP. Επίσης, για το ίδιο cut-off ανίχνευσε ως αρνητικά τα 293 από τα 305 αρνητικά δείγματα με εύρος τιμών από 35 έως 99 mP, ενώ έδωσε και 12 ψευδώς θετικά αποτελέσματα με εύρος τιμών από 100 έως 111 mP. Στον Πίνακα 16 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της FPA στο σύνολο των δειγμάτων.

Πίνακας 16 : Αποτελέσματα της FPA στο σύνολο των θετικών και των αρνητικών δειγμάτων.

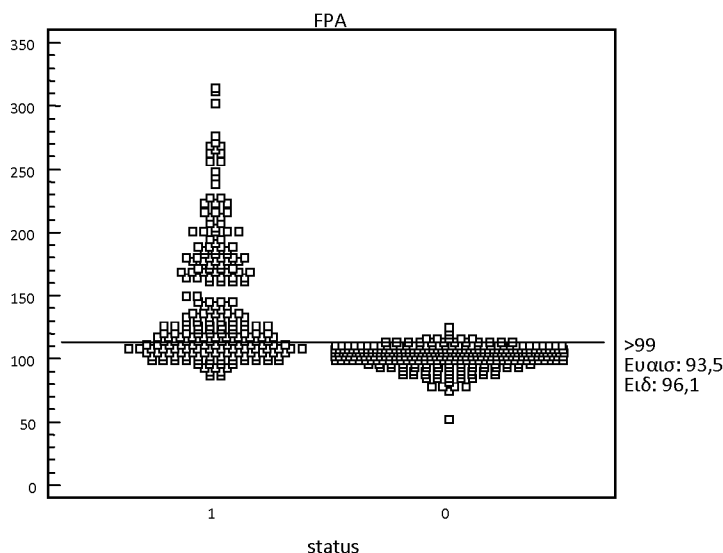
		Βρουκέλλωση	
		Ομάδα Β	ΒΝ
FPA	Θετική τιμή	215	12
	Αρνητική τιμή	15	293
		230	305

Για τη συγκεκριμένη τιμή cut-off η ευαισθησία της μεθόδου υπολογίστηκε ότι είναι 93,5 % (95 % CI : 89,5 % - 96,3) και η ειδικότητα 96,1 % (95 % CI : 93,2 – 97,9).

Για την ίδια τιμή cut-off επίσης ο λόγος πιθανοτήτων θετικού αποτελέσματος (LR+) υπολογίστηκε ότι είναι 23,76 και ο λόγος πιθανοτήτων αρνητικού αποτελέσματος (LR-) 0,07. Η τιμή K της FPA υπολογίστηκε ότι είναι 0,92 (95 % CI : 0,886 – 0,953).

Το διάγραμμα διασποράς τιμών της FPA (Interactive Dot Diagram) παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 7:

Διάγραμμα 7: Διάγραμμα διασποράς τιμών της FPA σε σχέση με το status disease.



Στον Πίνακα 17 αναφέρονται οι μεταβολές της ευαισθησίας και της ειδικότητας της μεθόδου FPA ανάλογα με την αύξηση ή την ελάττωση της τιμής του cut-off.

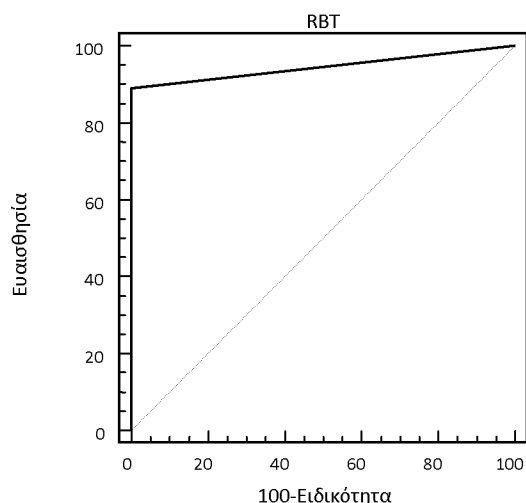
Πίνακας 17: Ευαισθησία και ειδικότητα της μεθόδου FPA ανάλογα με την τιμή cut-off.

Τιμή cut -off	Ευαισθησία (95% CI)	Ειδικότητα (95% CI)
86	100 (98,4 - 100)	31,8 (26,6 - 37,4)
87	99,6 (97,6 - 99,9)	36,1 (30,7 - 41,7)
88	99,1 (96,9 - 99,9)	40,7 (35,1 - 46,4)
89	99,1 (96,9 - 99,9)	46,9 (41,2 - 52,7)
90	98,7 (96,2 - 99,7)	54,4 (48,7 - 60,1)
91	98,3 (95,6 - 99,5)	60,0 (54,3 - 65,5)
92	98,3 (95,6 - 99,5)	65,2 (59,6 - 70,6)
93	97,8 (95,0 - 99,3)	70,8 (65,4 - 75,9)
94	97,4 (94,4 - 99,0)	75,1 (69,8 - 79,8)
95	97,0 (93,8 - 98,8)	81,6 (76,8 - 85,8)
96	96,5 (93,3 - 98,5)	85,6 (81,1 - 89,3)
97	95,7 (92,1 - 97,9)	90,5 (86,6 - 93,5)
98	95,2 (91,6 - 97,6)	93,4 (90,1 - 95,9)
99 *	93,5 (89,5 - 96,3)	96,1 (93,2 - 97,9)
100	91,3 (86,9 - 94,6)	96,4 (93,6 - 98,2)
101	90,0 (85,4 - 93,6)	97,4 (94,9 - 98,9)
102	88,7 (83,9 - 92,5)	98,4 (96,2 - 99,5)
103	87,0 (81,9 - 91,0)	99,0 (97,1 - 99,8)
104	84,8 (79,5 - 89,2)	99,0 (97,1 - 99,8)
105	81,3 (75,7 - 86,1)	99,3 (97,6 - 99,9)
106	80,9 (75,2 - 85,7)	99,3 (97,6 - 99,9)
107	79,1 (73,3 - 84,2)	99,3 (97,6 - 99,9)
108	77,0 (71,0 - 82,2)	99,7 (98,2 - 99,9)
109	74,8 (68,7 - 80,3)	99,7 (98,2 - 99,9)
110	72,2 (65,9 - 77,9)	99,7 (98,2 - 99,9)
111	70,0 (63,6 - 75,8)	100 (98,8 - 100)

2.2.2.1.2 RBT

Η ROC analysis για τη μέθοδο RBT έδωσε την παρακάτω καμπύλη η οποία παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 8:

Διάγραμμα 8 : Η καμπύλη της ROC analysis για την RBT.



Η AUC υπολογίστηκε ότι είναι 0,943 (CI 95 % : 92 - 96,1). Ως τιμή cut-off ορίστηκε η τιμή 0, επειδή οποιοδήποτε αποτέλεσμα (από 1+ έως και 4+) θεωρείται θετικό.

Η μέθοδος RBT ανίχνευσε ως θετικά τα 204 από τα 230 θετικά δείγματα με εύρος τιμών από 1+ έως 4+, ενώ έδωσε και 26 ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα.

Στον Πίνακα 18 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της RBT στο σύνολο των δειγμάτων.

Πίνακας 18: Αποτελέσματα της RBT στο σύνολο των θετικών και των αρνητικών δειγμάτων.

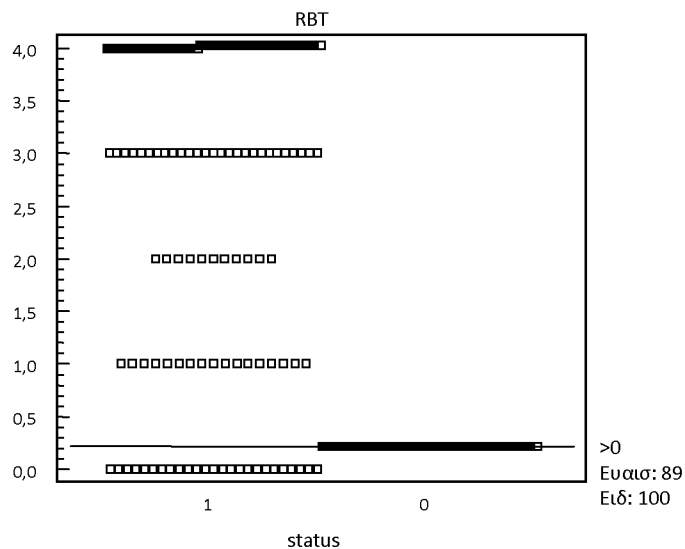
		Βρουκέλλωση	
		Ομάδα Β	BN
RBT	Θετική τιμή	204	0
	Αρνητική τιμή	26	305
		230	305

Η ευαισθησία της μεθόδου υπολογίστηκε ότι είναι 89 % (95 % CI : 84,2 - 92,8) και η ειδικότητα 100 % (95 % CI : 98,8 - 100), εφ' όσον η επιλογή των αρνητικών

δειγμάτων έγινε με τη συνθήκη ότι όλα τα δείγματα είναι αρνητικά σε όλες τις χρησιμοποιούμενες μεθόδους. Ο λόγος πιθανοτήτων θετικού αποτελέσματος (LR+) δεν κατέστη δυνατό να υπολογιστεί, ενώ ο λόγος πιθανοτήτων αρνητικού αποτελέσματος (LR-) υπολογίστηκε ότι είναι 0,11. Η τιμή K της RBT υπολογίστηκε ότι είναι 0,899 (95 % CI : 0,862 – 0,937).

Το διάγραμμα διασποράς τιμών της RBT (Interactive Dot Diagram) παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 9:

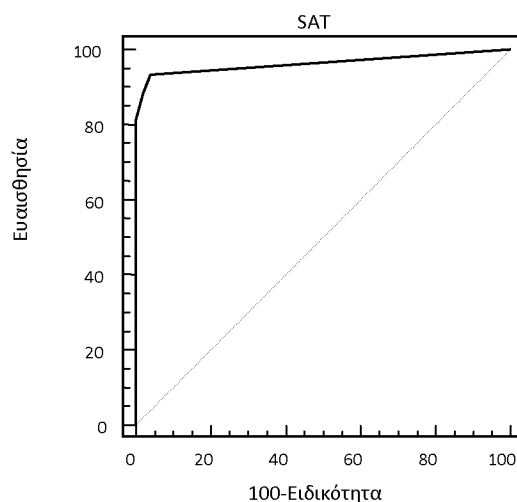
Διάγραμμα 9 : Διάγραμμα διασποράς τιμών της RBT σε σχέση με το status disease.



2.2.2.1.3 SAT

Η ROC analysis για τη μέθοδο SAT έδωσε την παρακάτω καμπύλη, η οποία παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 10:

Διάγραμμα 10 : Η καμπύλη της ROC analysis για την SAT.



Η AUC υπολογίστηκε ότι είναι 0,909 (CI 95 % : 88,1 - 93,2). Ως τιμή cut-off ορίστηκε ο τίτλος $\geq 1:160$, γιατί αυτός είναι παγκοσμίως ο ελάχιστος θετικό τίτλος που δηλώνει νόσο στις χώρες, όπου η βρουκέλλωση ενδημεί.

Η μέθοδος SAT ανίχνευσε ως θετικά τα 204 από τα 230 θετικά δείγματα με εύρος τιμών από 1:160 έως 1:2.560, ενώ έδωσε και 26 ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα με τιμές από 0 έως και 1:80.

Στον Πίνακα 19 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της SAT στο σύνολο των δειγμάτων.

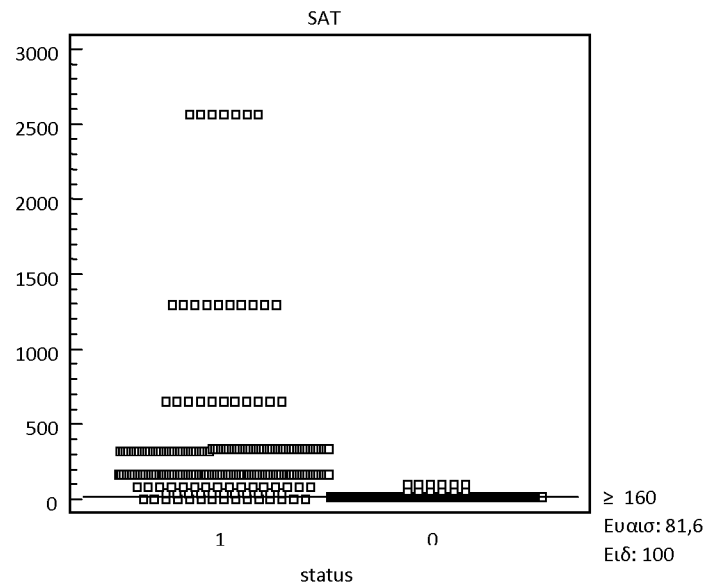
Πίνακας 19 : Αποτελέσματα της SAT στο σύνολο των θετικών και των αρνητικών δειγμάτων.

		Βρουκέλλωση	
		Ομάδα Β	BN
SAT	Θετική τιμή	188	0
	Αρνητική τιμή	42	305
		230	305

Η ευαισθησία της μεθόδου υπολογίστηκε ότι είναι 81,6 % (95 % CI : 75,9 - 86,4) και η ειδικότητα 100 % (95 % CI : 98,8 – 100), εφ' όσον η επιλογή των αρνητικών δειγμάτων έγινε με τη συνθήκη ότι όλα τα δείγματα είναι αρνητικά σε όλες τις χρησιμοποιούμενες μεθόδους. Ο λόγος πιθανοτήτων θετικού αποτελέσματος (LR+) δεν κατέστη δυνατό να υπολογιστεί, ενώ ο λόγος πιθανοτήτων αρνητικού αποτελέσματος (LR-) υπολογίστηκε ότι είναι 0,18. Η τιμή K της SAT υπολογίστηκε ότι είναι 0,836 (95 % CI : 0,789 – 0,884).

Το διάγραμμα διασποράς τιμών της SAT (Interactive Dot Diagram) παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 11:

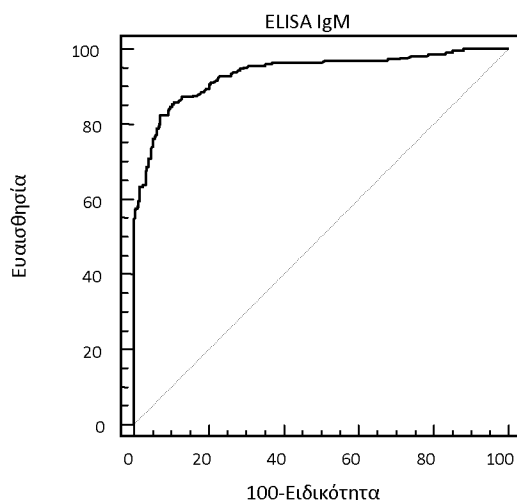
Διάγραμμα 11 : Διάγραμμα διασποράς τιμών της SAT σε σχέση με το status disease.



2.2.2.1.4 ELISA IgM

Η ROC analysis για τη μέθοδο ELISA IgM, έδωσε την παρακάτω καμπύλη, η οποία παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 12:

Διάγραμμα 12 : Η καμπύλη της ROC analysis για την ELISA IgM.



Η AUC υπολογίστηκε ότι είναι 0,767 (CI 95 % : 72,9 - 80,3). Ως τιμή cut-off ορίστηκε ο τίτλος > 11 μονάδων Panbio, αφού αυτός ο τίτλος ορίζεται από τον κατασκευαστή ως ο ελάχιστος τίτλος αντισωμάτων, για να θεωρηθεί ένα δείγμα θετικό.

Η μέθοδος ELISA IgM ανίχνευσε ως θετικά τα 123 από τα 230 θετικά δείγματα με εύρος τιμών από 11,2 έως 112, ενώ έδωσε και 107 ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα με τιμές από 0,96 έως και 10,2 μονάδες Panbio.

Στον Πίνακα 20 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ELISA IgM στο σύνολο των δειγμάτων.

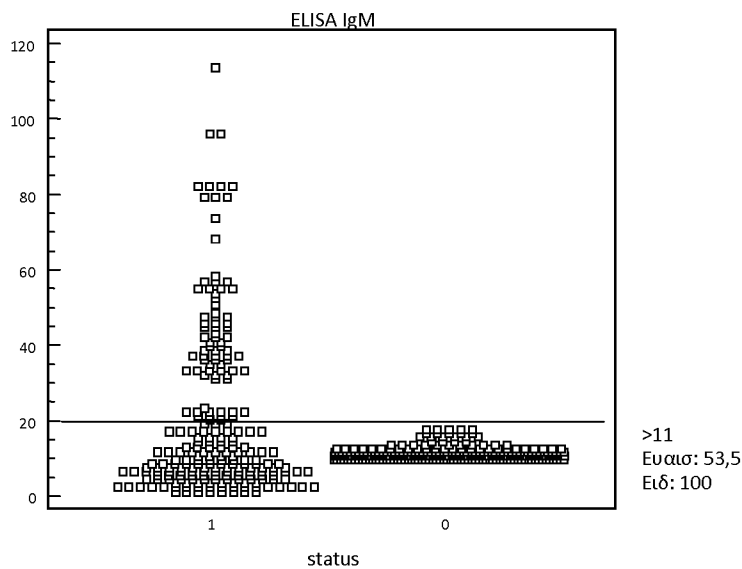
Πίνακας 20: Αποτελέσματα της ELISA IgM στο σύνολο των θετικών και των αρνητικών δειγμάτων.

		Βρουκέλλωση	
		Ομάδα Β	BN
ELISA IgM	Θετική τιμή	123	0
	Αρνητική τιμή	107	305
		230	305

Η ευαισθησία της μεθόδου υπολογίστηκε ότι είναι 51,5 % (95 % CI : 44,8 - 58,2) και η ειδικότητα 100 % (95 % CI : 98,8 – 100), εφ' όσον η επιλογή των αρνητικών δειγμάτων έγινε με τη συνθήκη ότι όλα τα δείγματα είναι αρνητικά σε όλες τις χρησιμοποιούμενες μεθόδους. Ο λόγος πιθανοτήτων θετικού αποτελέσματος (LR+) δεν κατέστη δυνατό να υπολογιστεί, ενώ ο λόγος πιθανοτήτων αρνητικού αποτελέσματος (LR-) υπολογίστηκε ότι είναι 0,48. Η τιμή K της IgM υπολογίστηκε ότι είναι 0,567 (95 % CI : 0,494 – 0,641).

Το διάγραμμα διασποράς τιμών της ELISA IgM παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 13:

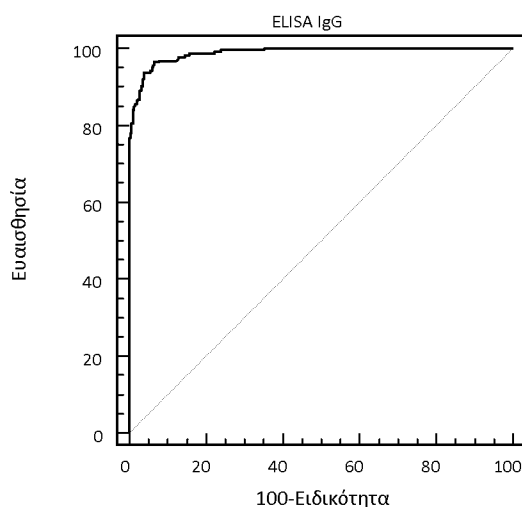
Διάγραμμα 13: Διάγραμμα διασποράς τιμών της ELISA IgM σε σχέση με το status disease.



2.2.2.1.5 ELISA IgG

Η ROC analysis για τη μέθοδο ELISA IgG έδωσε την παρακάτω καμπύλη, η οποία παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 14:

Διάγραμμα 14 : Η καμπύλη της ROC analysis για την ELISA IgG.



Η AUC υπολογίστηκε ότι είναι 0,883 (CI 95 % : 85,2 - 90,9). Ως τιμή cut-off ορίστηκε ο τίτλος > 11 μονάδων Panbio, αφού αυτός ο τίτλος ορίζεται από τον κατασκευαστή ως ο ελάχιστος τίτλος αντισωμάτων για να θεωρηθεί ένα δείγμα θετικό.

Η μέθοδος ELISA IgG ανίχνευσε ως θετικά τα 176 από τα 230 θετικά δείγματα με εύρος τιμών από 11,1 έως 194, ενώ έδωσε και 54 ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα με τιμές από 0,83 έως και 10,2 μονάδες Panbio.

Στον Πίνακα 21 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ELISA IgG στο σύνολο των δειγμάτων.

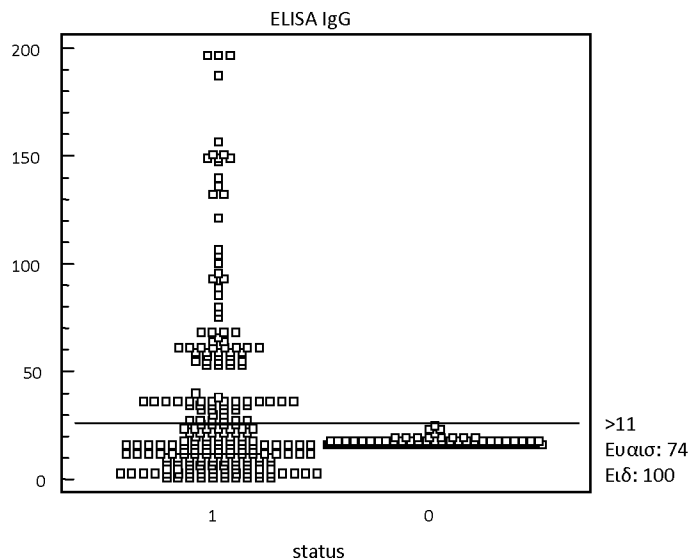
Πίνακας 21: Αποτελέσματα της ELISA IgG στο σύνολο των θετικών και των αρνητικών δειγμάτων.

		Βρουκέλλωση	
		Ομάδα Β	BN
ELISA IgG	Θετική τιμή	176	0
	Αρνητική τιμή	54	305
		230	305

Η ευαισθησία της μεθόδου υπολογίστηκε ότι είναι 74 % (95 % CI : 67,8 - 79,6) και η ειδικότητα 100 % (95 % CI : 98,8 – 100), εφ' όσον η επιλογή των αρνητικών δειγμάτων έγινε με τη συνθήκη ότι όλα τα δείγματα είναι αρνητικά σε όλες τις χρησιμοποιούμενες μεθόδους. Ο λόγος πιθανοτήτων θετικού αποτελέσματος (LR+) δεν κατέστη δυνατό να υπολογιστεί, ενώ ο λόγος πιθανοτήτων αρνητικού αποτελέσματος (LR-) υπολογίστηκε ότι είναι 0,26. Η τιμή K της IgM υπολογίστηκε ότι είναι 0,788 (95 % CI : 0,734 – 0,842).

Το διάγραμμα διασποράς τιμών της ELISA IgM παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 15:

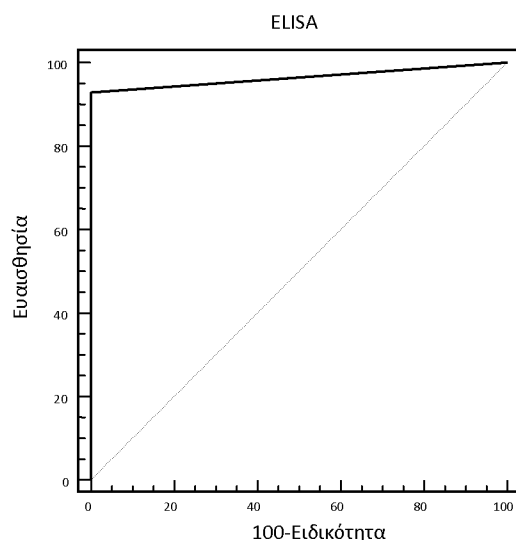
Διάγραμμα 15 : Διάγραμμα διασποράς τιμών της ELISA IgG σε σχέση με το status disease.



2.2.2.1.6 ELISA (IgM ή / και IgG)

Η ROC analysis για τη μέθοδο ELISA (IgM ή / και IgG) έδωσε την παρακάτω καμπύλη, η οποία παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 16:

Διάγραμμα 16 : Η καμπύλη της ROC analysis για την ELISA.



Η AUC υπολογίστηκε ότι είναι 0,965 (CI 95 % : 94,6 - 97,9). Δεν ορίστηκε καμία τιμή ως τιμή cut-off, αλλά η μέθοδος θεωρήθηκε ως θετική, εφ' όσον ήταν θετική είτε η IgM, είτε η IgG, είτε και οι δύο ταυτόχρονα.

Η μέθοδος ELISA ανίχνευσε ως θετικά τα 214 από τα 230 θετικά δείγματα με εύρος τιμών από 11,1 έως 194, ενώ έδωσε και 16 ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα με τιμές από 0,83 έως και 10,2 μονάδες Panbio.

Στον Πίνακα 22 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ELISA στο σύνολο των δειγμάτων.

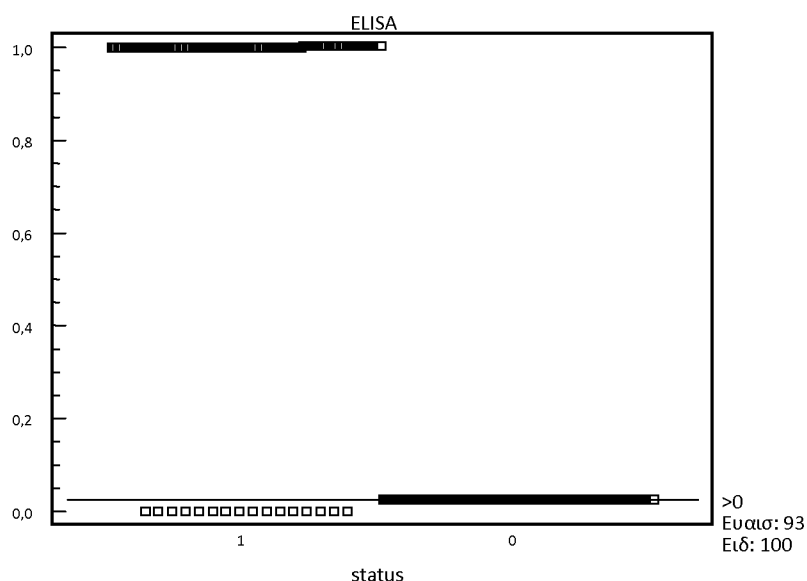
Πίνακας 22: Αποτελέσματα της ELISA στο σύνολο των θετικών και των αρνητικών δειγμάτων.

		Βρουκέλλωση	
		Ομάδα Β	BN
ELISA	Θετική τιμή	214	0
	Αρνητική τιμή	16	305

Η ευαισθησία της μεθόδου υπολογίστηκε ότι είναι 93 % (95 % CI : 88,9 - 96) και η ειδικότητα 100 % (95 % CI : 98,8 – 100), εφ' όσον η επιλογή των αρνητικών δειγμάτων έγινε με τη συνθήκη ότι όλα τα δείγματα είναι αρνητικά σε όλες τις χρησιμοποιούμενες μεθόδους. Ο λόγος πιθανοτήτων θετικού αποτελέσματος (LR+) δεν κατέστη δυνατό να υπολογιστεί, ενώ ο λόγος πιθανοτήτων αρνητικού αποτελέσματος (LR-) υπολογίστηκε ότι είναι 0,07. Η τιμή K της IgM υπολογίστηκε ότι είναι 0,938 (95 % CI : 0,909 – 0,968).

Το διάγραμμα διασποράς τιμών της ELISA IgM παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 17:

Διάγραμμα 17 : Διάγραμμα διασποράς τιμών της ELISA σε σχέση με το status disease.



Συνοπτικά οι σπουδαιότερες παράμετροι κάθε μεθόδου, δηλαδή η ευαισθησία, η ειδικότητα και η περιοχή κάτω από την καμπύλη (AUC) παρουσιάζονται στον Πίνακα 23:

Πίνακας 23: Ευαισθησία, ειδικότητα και AUC όλων των μεθόδων που εφαρμόστηκαν.

Μέθοδοι	Ευαισθησία (95% CI)	Ειδικότητα (95% CI)	AUC (95% CI)
FPA	93,5 (89,5 – 96,3)	96,1 (93,2 – 97,9)	0,956 (93,5 – 97,2)
RBT	89 (84,2 – 92,8)	100 (98,8 – 100)	0,943 (92 – 96,1)
SAT	81,6 (75,9 - 86,4)	100 (98,8 – 100)	0,909 (88,1 – 93,2)
IgM	51,5 (44,8 – 58,2)	100 (98,8 – 100)	0,767 (72,9 – 80,3)
IgG	74 (67,8 – 79,6)	100 (98,8 – 100)	0,883 (85,2 – 90,9)
ELISA	93 (88,9 – 96)	100 (98,8 – 100)	0,965 (94,6 – 97,9)

Τη μεγαλύτερη ευαισθησία και σ' αυτόν τον πληθυσμό εμφάνισαν η FPA και η ELISA, με διαφορά μη στατιστικώς σημαντική, ενώ την μικρότερη και πάλι η IgM.

2.2.2.2 Σύγκριση των μεθόδων μεταξύ τους

Τα αποτελέσματα της κάθε μιας από όλες τις μεθόδους που χρησιμοποιήθηκαν στη συνέχεια συγκρίθηκαν αφ' ενός με το status disease, έτσι όπως έχει περιγραφεί πρωτύτερα, δηλαδή θετικό status disease, όταν τουλάχιστον δύο από τις RBT, SAT και ELISA IgM και IgG έδωσαν θετικό αποτέλεσμα, και αρνητικό status disease, όταν καμία από τις παραπάνω ορολογικές μεθόδους δεν έδωσε θετικό αποτέλεσμα.

Για την καλύτερη σύγκριση των μεθόδων μεταξύ τους, οι αρνητικές και οι θετικές τιμές όλων των μεθόδων μετατράπηκαν σε 0 και 1 αντίστοιχα.

- 1) Για την FPA: τιμές ≤ 99 mP αντικαταστάθηκαν με 0, ενώ τιμές > 99 mP με 1
- 2) Για την RBT: τιμή 0 παρέμεινε ως 0, ενώ τιμές 1+ έως 4+ αντικαταστάθηκαν με 1
- 3) Για την SAT: τίτλοι $< 1:160$ αντικαταστάθηκαν με 0, ενώ τιμές $\geq 1:160$ με 1
- 4) Για τις ELISA IgM και IgG: τιμές < 11 μονάδων Panbio αντικαταστάθηκαν με 0, ενώ τιμές >11 μονάδων Panbio με 1
- 5) Για την ELISA συνολικά: το αποτέλεσμα θεωρήθηκε ως 0, όταν οι IgM και IgG ήταν και οι δύο αρνητικές, ενώ θεωρήθηκε ως 1, όταν μία εκ των δύο είχε θετικό αποτέλεσμα.

Ομοίως ως 0 και 1 χαρακτηρίστηκε και η κατάσταση των ασθενών και των μαρτύρων (status disease), δηλαδή ως 0 χαρακτηρίστηκαν οι υγιείς αιμοδότες, οι οποίοι σε όλες τις χρησιμοποιούμενες εξετάσεις έδωσαν αρνητικό αποτέλεσμα, ενώ ως 1 (ασθενείς) χαρακτηρίστηκαν οι ύποπτοι που εμφάνισαν θετικό αποτέλεσμα τουλάχιστον σε δύο από τις τρεις μεθόδους που εφαρμόστηκαν.

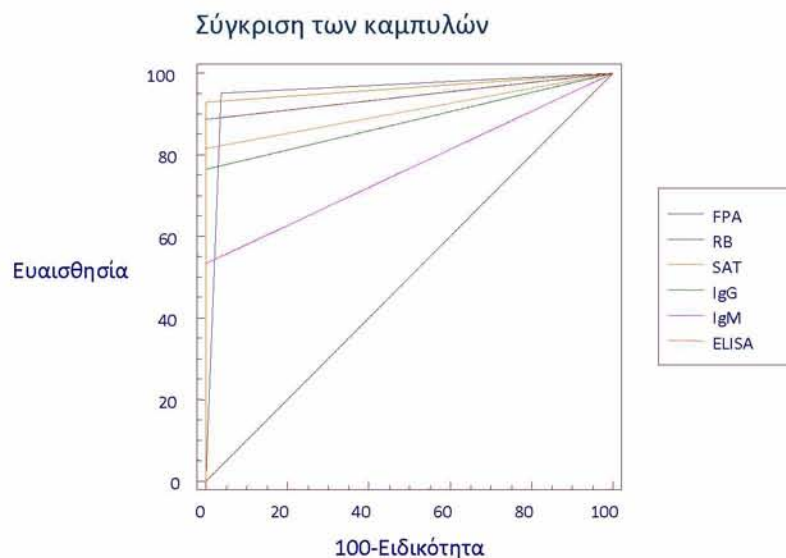
Για τη σύγκριση των αποτελεσμάτων των μεθόδων χρησιμοποιήθηκαν:

- 1) Η ROC analysis, με την οποία έγινε η σύγκριση των καμπυλών κάθε ορολογικής μεθόδου και υπολογίστηκε η διαφορά της περιοχής κάτω από την καμπύλη της κάθε μεθόδου με όλες τις υπόλοιπες, καθώς επίσης και αν η διαφορά αυτή ήταν στατιστικώς σημαντική ή όχι και
- 2) Η Kappa statistic, με την οποία υπολογίστηκε η τιμή K (kappa value) της κάθε μεθόδου συγκρινόμενης με το status disease και με κάθε μια από τις υπόλοιπες μεθόδους, έτσι ώστε να βρεθεί η συμφωνία των αποτελεσμάτων (Inter – rater agreement) τους.

2.2.2.1 Σύγκριση των περιοχών κάτω από την καμπύλη (Comparison of ROC Curves)

Η σύγκριση των καμπυλών και των περιοχών κάτω από την καμπύλη (AUC) όλων των ορολογικών μεθόδων, που πραγματοποιήθηκε με την ROC analysis, παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 18:

Διάγραμμα 18 : Σύγκριση των AUC όλων των ορολογικών μεθόδων.



Η κατά ζεύγος σύγκριση (pairwise comparison of ROC curves) των καμπυλών και των διαφορών των περιοχών κάτω από την καμπύλη (AUC) όλων των ορολογικών μεθόδων παρουσιάζεται στον Πίνακα 24:

Πίνακας 24: Διαφορές των AUC στην κατά ζεύγος σύγκριση όλων των μεθόδων.

Ζεύγη συγκρινόμενων ορολογικών μεθόδων	Διαφορά των περιοχών κάτω από την καμπύλη	Στατιστική διαφορά (τιμή <i>P</i>)
FPA vs RBT	0,013	0,379
FPA vs SAT	0,048	0,005*
FPA vs IgM	0,189	< 0,001*
FPA vs IgG	0,074	< 0,001*
FPA vs ELISA	0,009	0,497
RBT vs SAT	0,035	0,05*
RBT vs IgM	0,176	< 0,001*
RBT vs IgG	0,061	0,002*
RBT vs ELISA	0,022	0,120
SAT vs IgM	0,141	< 0,001*
SAT vs IgG	0,026	0,198
SAT vs ELISA	0,057	0,001*
IgM vs IgG	0,115	< 0,001*
IgM vs ELISA	0,198	< 0,001*
IgG vs ELISA	0,083	< 0,001*

* Στατιστικά σημαντική διαφορά ($P < 0,05$)

Τη μικρότερη και μη στατιστικώς σημαντική διαφορά στην περιοχή κάτω από την καμπύλη εμφάνισαν τα ζεύγη FPA – ELISA, FPA – RBT, RBT – ELISA και SAT – IgG.

2) Συμφωνία των αποτελεσμάτων (Inter – rater agreement)

Με την Kappa analysis υπολογίστηκε η τιμή K (K value) της κάθε μεθόδου ως προς το status disease και ως προς κάθε μια από τις άλλες μεθόδους.

Τα αποτελέσματα της Kappa analysis παρατίθενται στον Πίνακα 25:

Πίνακας 25: Οι τιμές K όλων των μεθόδων συγκρινόμενες με το status disease και μεταξύ τους.

Ζεύγη ορολογικών μεθόδων	Τιμή K
FPA vs status	0,91 (0,88 – 0,95)
FPA vs RBT	0,82 (0,77 – 0,87)
FPA vs SAT	0,76 (0,70 – 0,82)
FPA vs IgM	0,50 (0,42 – 0,58)
FPA vs IgG	0,74 (0,68 – 0,80)
FPA vs ELISA	0,85 (0,80 – 0,89)
RBT vs status	0,90 (0,86 – 0,94)
RBT vs SAT	0,77 (0,72 – 0,83)
RBT vs IgM	0,56 (0,48 – 0,63)
RBT vs IgG	0,72 (0,66 – 0,78)
RBT vs ELISA	0,84 (0,80 – 0,89)
SAT vs status	0,84 (0,79 – 0,88)
SAT vs IgM	0,57 (0,49 – 0,65)
SAT vs IgG	0,62 (0,55 – 0,69)
SAT vs ELISA	0,78 (0,72 – 0,83)
IgM vs status	0,57 (0,49 – 0,64)
IgM vs IgG	0,42 (0,33 – 0,50)
IgM vs ELISA	0,62 (0,55 – 0,69)
IgG vs status	0,79 (0,73 – 0,84)
IgG vs ELISA	0,85 (0,80 – 0,89)
ELISA vs status	0,94 (0,91 – 0,97)

Οι τιμές στις παρενθέσεις δηλώνουν το διάστημα εμπιστοσύνης 95 %

Τη μεγαλύτερη συμφωνία αποτελεσμάτων εμφάνισαν οι μέθοδοι FPA και ELISA σε σχέση με το status disease, όπως επίσης και το ζεύγος FPA – ELISA.

2.2.3. Αξιολόγηση σε ύποπτους ασθενείς με μία τουλάχιστον μέθοδο θετική και

αρνητικούς στη βρουκέλλωση μάρτυρες (BN) – Ομάδα Γ και Ομάδα Μ.

Στη συνέχεια η FPA διερευνήθηκε σε ύποπτους ασθενείς με βάση τη διάγνωση που προτείνει ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας στον ορισμό της περίπτωσης βρουκέλλωσης. Σύμφωνα με τον Π.Ο.Υ. αρκούν τα κλινικά συμπτώματα και τουλάχιστον μία ορολογική εξέταση με θετικό αποτέλεσμα, για να τεθεί η διάγνωση της νόσου.

Τα αποτελέσματα των 271 θετικών (Ομάδα Γ) και των 305 BN αναλύθηκαν και πάλι χρησιμοποιώντας την ROC analysis, τόσο για κάθε μία από τις μεθόδους ξεχωριστά, όσο και συγκριτικά για όλες τις μεθόδους μεταξύ τους.

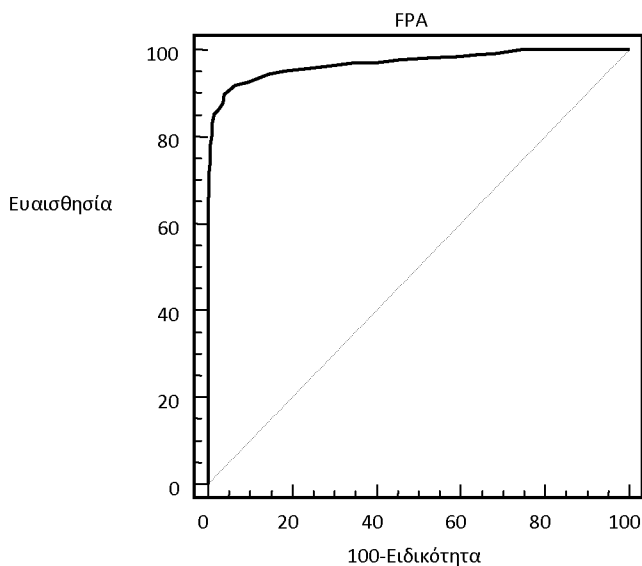
Κάθε μέθοδος εκτιμήθηκε ξεχωριστά και στη συνέχεια έγινε σύγκριση των μεθόδων μεταξύ τους.

2.2.3.1 Εκτίμηση της κάθε μεθόδου ξεχωριστά

2.2.3.1.1 FPA

Η ROC analysis έδωσε για την FPA την παρακάτω καμπύλη η οποία παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 19:

Διάγραμμα 19 : Η καμπύλη της ROC analysis για την FPA.



Η AUC υπολογίστηκε ότι είναι 0,931 (CI 95 % : 90,7 - 95). Ως τιμή cut-off ορίστηκε η τιμή των 99 mP, επειδή έδωσε το μεγαλύτερο άθροισμα ευαισθησίας και ειδικότητας (185,8). Όλα τα δείγματα που έδωσαν τιμή 99 mP θεωρήθηκαν αρνητικά.

Η μέθοδος FPA με τιμή cut-off 99 ανίχνευσε ως θετικά τα 243 από τα 271 θετικά δείγματα με εύρος τιμών από 100 έως 310 mP, ενώ έδωσε και 28 ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα με εύρος τιμών από 86 έως 99 mP. Επίσης για το ίδιο cut-off ανίχνευσε ως αρνητικά τα 293 από τα 305 αρνητικά δείγματα με εύρος τιμών από 35 έως 99 mP, ενώ έδωσε και 12 ψευδώς θετικά αποτελέσματα με εύρος τιμών από 100 έως 111 mP.

Στον Πίνακα 26 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της FPA στο σύνολο των δειγμάτων.

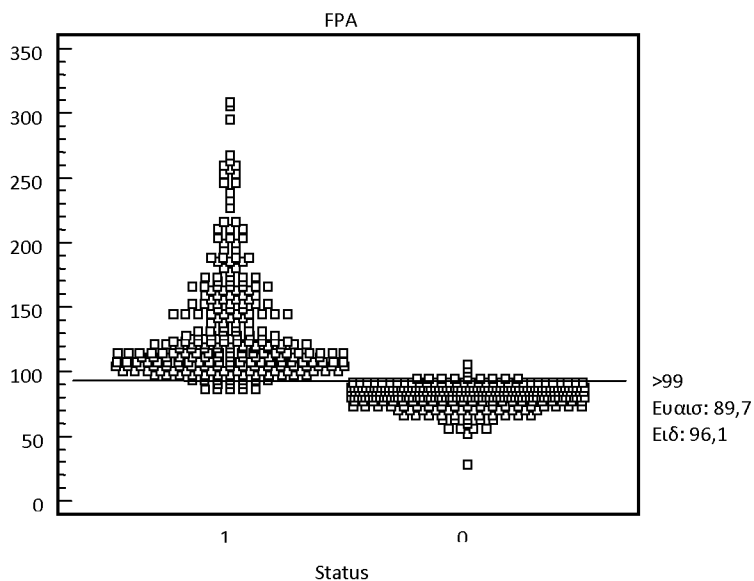
Πίνακας 26: Αποτελέσματα της FPA στο σύνολο των θετικών και των αρνητικών δειγμάτων.

		Βρουκέλλωση	
		Ομάδα Γ	BN
FPA	Θετική τιμή	243	12
	Αρνητική τιμή	28	293
		271	305

Για τη συγκεκριμένη τιμή cut-off η ευαισθησία της μεθόδου υπολογίστηκε ότι είναι 89,7 % (95 % CI : 85,4 % - 93) και η ειδικότητα 96,1 % (95 % CI : 93,2 – 97,9). Για την ίδια τιμή cut-off επίσης ο λόγος πιθανοτήτων θετικού αποτελέσματος (LR+) υπολογίστηκε ότι είναι 22,79 και ο λόγος πιθανοτήτων αρνητικού αποτελέσματος (LR-) 0,11. Η τιμή K της FPA υπολογίστηκε ότι είναι 0,86 (95 % CI : 0,82 – 0,9).

Το διάγραμμα διασποράς τιμών της FPA (Interactive Dot Diagram) παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 20:

Διάγραμμα 20: Διάγραμμα διασποράς τιμών της FPA σε σχέση με το status disease.



Στον Πίνακα 27 αναφέρονται οι μεταβολές της ευαισθησίας και της ειδικότητας της μεθόδου FPA ανάλογα με την αύξηση ή την ελάττωση της τιμής του cut-off.

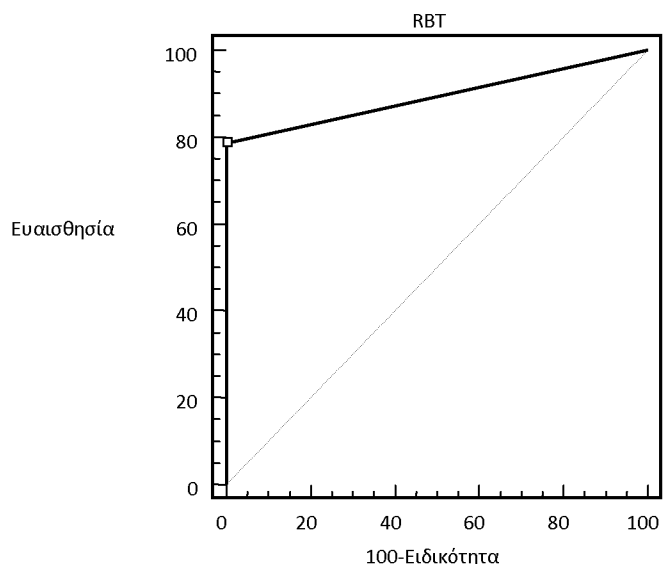
Πίνακας 27: Ευαισθησία και ειδικότητα της μεθόδου FPA ανάλογα με την τιμή cut-off.

Τιμή cut -off	Ευαισθησία (95% CI)	Ειδικότητα (95% CI)
85	100 (98,6 - 100)	25,6 (20,8 - 30,9)
86	99,3 (97,4 - 99,9)	31,8 (26,6 - 37,4)
87	98,9 (96,8 - 99,8)	36,1 (30,7 - 41,7)
88	98,5 (96,3 - 99,6)	40,7 (35,1 - 46,4)
89	98,2 (95,7 - 99,4)	46,9 (41,2 - 52,7)
90	97,8 (95,2 - 99,2)	54,4 (48,7 - 60,1)
91	97,0 (94,3 - 98,7)	60,0 (54,3 - 65,5)
92	97,0 (94,3 - 98,7)	65,2 (59,6 - 70,6)
93	96,3 (93,3 - 98,2)	70,8 (65,4 - 75,9)
94	95,9 (92,9 - 98,0)	75,1 (69,8 - 79,8)
95	95,2 (91,9 - 97,4)	81,6 (76,8 - 85,8)
96	94,5 (91,0 - 96,9)	85,6 (81,1 - 89,3)
97	92,6 (88,8 - 95,4)	90,5 (86,6 - 93,5)
98	91,9 (88,0 - 94,8)	93,4 (90,1 - 95,9)
99 *	89,7 (85,4 - 93,0)	96,1 (93,2 - 97,9)
100	87,8 (83,3 - 91,5)	96,4 (93,6 - 98,2)
101	86,3 (81,7 - 90,2)	97,4 (94,9 - 98,9)
102	85,2 (80,4 - 89,2)	98,4 (96,2 - 99,5)
103	83,0 (78,0 - 87,3)	99,0 (97,1 - 99,8)
104	80,8 (75,6 - 85,3)	99,0 (97,1 - 99,8)
105	77,9 (72,4 - 82,7)	99,3 (97,6 - 99,9)
106	76,0 (70,5 - 81,0)	99,3 (97,6 - 99,9)
107	74,2 (68,5 - 79,3)	99,3 (97,6 - 99,9)
108	72,0 (66,2 - 77,2)	99,7 (98,2 - 99,9)
109	69,7 (63,9 - 75,2)	99,7 (98,2 - 99,9)
110	67,5 (61,6 - 73,1)	99,7 (98,2 - 99,9)
111	65,3 (59,3 - 71,0)	100 (98,8 - 100)

2.2.3.1.2 RBT

Η ROC analysis για τη μέθοδο RBT έδωσε την παρακάτω καμπύλη η οποία παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 21:

Διάγραμμα 21 : Η καμπύλη της ROC analysis για την RBT.



Η AUC υπολογίστηκε ότι είναι 0,893 (CI 95 % : 86,5 - 91,7). Ως τιμή cut-off ορίστηκε η τιμή 0, επειδή οποιοδήποτε αποτέλεσμα (από 1+ έως και 4+) θεωρείται θετικό.

Η μέθοδος RBT ανίχνευσε ως θετικά τα 213 από τα 271 θετικά δείγματα με εύρος τιμών από 1+ έως 4+, ενώ έδωσε και 58 ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα.

Στον πίνακα 28 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της RBT στο σύνολο των δειγμάτων.

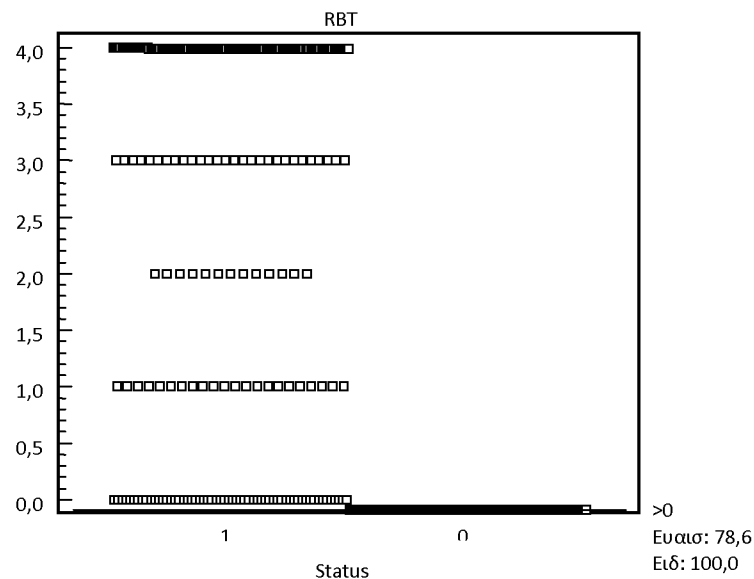
Πίνακας 28: Αποτελέσματα της RBT στο σύνολο των θετικών και των αρνητικών δειγμάτων.

		Βρουκέλλωση	
		Ομάδα Γ	BN
RBT	Θετική τιμή	213	0
	Αρνητική τιμή	58	305
		271	305

Η ευαισθησία της μεθόδου υπολογίστηκε ότι είναι 78,6 % (95 % CI : 73,2 - 83,3) και η ειδικότητα 100 % (95 % CI : 98,8 – 100), εφ' όσον η επιλογή των αρνητικών δειγμάτων έγινε με την συνθήκη ότι όλα τα δείγματα είναι αρνητικά σε όλες τις χρησιμοποιούμενες μεθόδους. Ο λόγος πιθανοτήτων θετικού αποτελέσματος (LR+) δεν κατέστη δυνατό να υπολογιστεί, ενώ ο λόγος πιθανοτήτων αρνητικού αποτελέσματος (LR-) υπολογίστηκε ότι είναι 0,21. Η τιμή K της RBT υπολογίστηκε ότι είναι 0,795 (95 % CI : 0,75 – 0,85).

Το διάγραμμα διασποράς τιμών της RBT (Interactive Dot Diagram) παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 22:

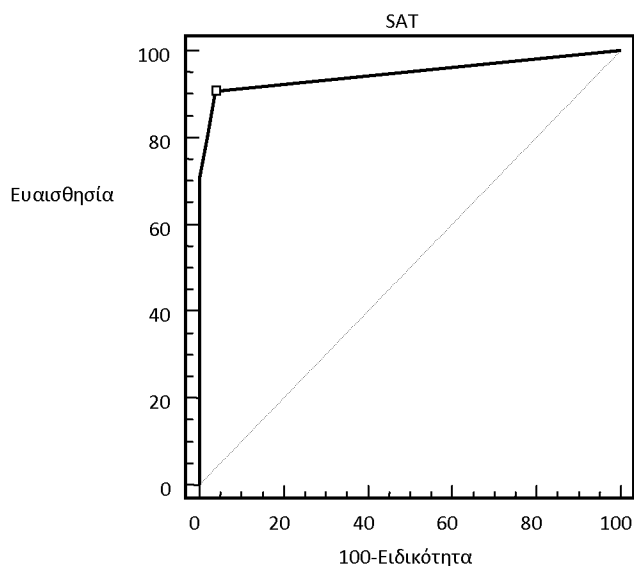
Διάγραμμα 22 : Διάγραμμα διασποράς τιμών της RBT σε σχέση με το status disease.



2.2.3.1.3 SAT

Η ROC analysis για τη μέθοδο SAT έδωσε την παρακάτω καμπύλη, η οποία παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 23:

Διάγραμμα 23: Η καμπύλη της ROC analysis για την SAT.



Η AUC υπολογίστηκε ότι είναι 0,854 (CI 95 % : 82,2 - 88,2). Ως τιμή cut-off ορίστηκε ο τίτλος $\geq 1:160$, γιατί αυτός είναι παγκοσμίως ο ελάχιστος θετικό τίτλος που δηλώνει νόσο στις χώρες, όπου η βρουκέλλωση ενδημεί.

Η μέθοδος SAT ανίχνευσε ως θετικά τα 191 από τα 271 θετικά δείγματα με εύρος τιμών από 1:160 έως 1:2.560, ενώ έδωσε και 79 ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα με τιμές από 0 έως και 1:80.

Στον πίνακα 29 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της SAT στο σύνολο των δειγμάτων.

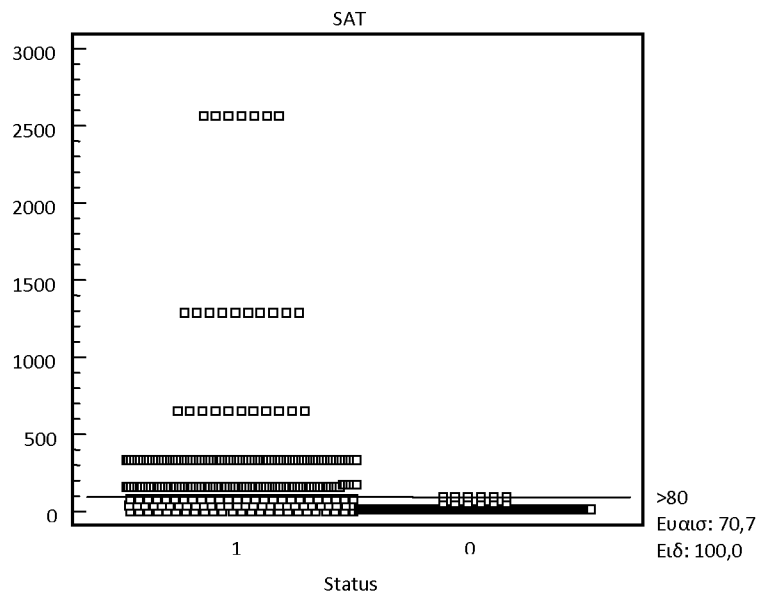
Πίνακας 29: Αποτελέσματα της SAT στο σύνολο των θετικών και των αρνητικών δειγμάτων.

		Βρουκέλλωση	
		Ομάδα Γ	BN
SAT	Θετική τιμή	191	0
	Αρνητική τιμή	79	305
		270	305

Η ευαισθησία της μεθόδου υπολογίστηκε ότι είναι 70,7 % (95 % CI : 64,9 - 76,1) και η ειδικότητα 100 % (95 % CI : 98,8 – 100), εφ' όσον η επιλογή των αρνητικών δειγμάτων έγινε με τη συνθήκη ότι όλα τα δείγματα είναι αρνητικά σε όλες τις χρησιμοποιούμενες μεθόδους. Ο λόγος πιθανοτήτων θετικού αποτελέσματος (LR+) δεν κατέστη δυνατό να υπολογιστεί, ενώ ο λόγος πιθανοτήτων αρνητικού αποτελέσματος (LR-) υπολογίστηκε ότι είναι 0,29. Η τιμή K της SAT υπολογίστηκε ότι είναι 0,719 (95 % CI : 0,66 – 0,78).

Το διάγραμμα διασποράς τιμών της SAT (Interactive Dot Diagram) παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 24:

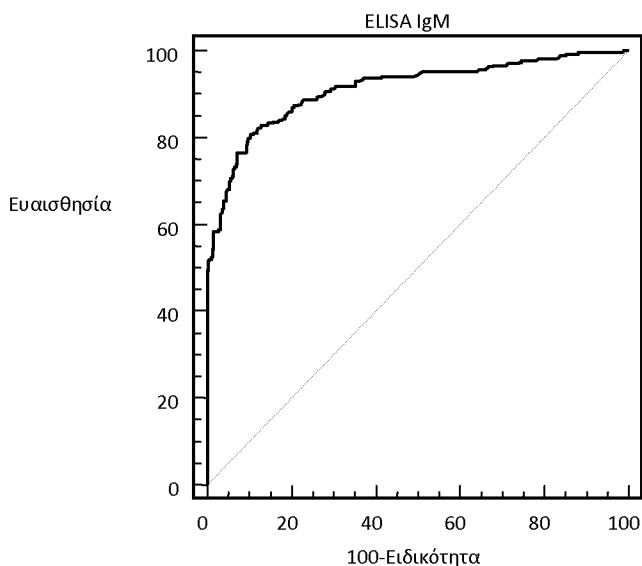
Διάγραμμα 24: Διάγραμμα διασποράς τιμών της SAT σε σχέση με το status disease.



4) ELISA IgM

Η ROC analysis για τη μέθοδο ELISA IgM, έδωσε την παρακάτω καμπύλη, η οποία παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 25:

Διάγραμμα 25: Η καμπύλη της ROC analysis για την ELISA IgM.



Η AUC υπολογίστηκε ότι είναι 0,732 (CI 95 % : 69,4 - 76,8). Ως τιμή cut-off ορίστηκε ο τίτλος > 11 μονάδων Panbio, αφού αυτός ο τίτλος ορίζεται από τον κατασκευαστή ως ο ελάχιστος τίτλος αντισωμάτων για να θεωρηθεί ένα δείγμα θετικό.

Η μέθοδος ELISA IgM ανίχνευσε ως θετικά τα 125 από τα 271 θετικά δείγματα με εύρος τιμών από 11,2 έως 112, ενώ έδωσε και 144 ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα με τιμές από 0,96 έως και 10,2 μονάδες Panbio.

Στον πίνακα 30 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ELISA IgM στο σύνολο των δειγμάτων.

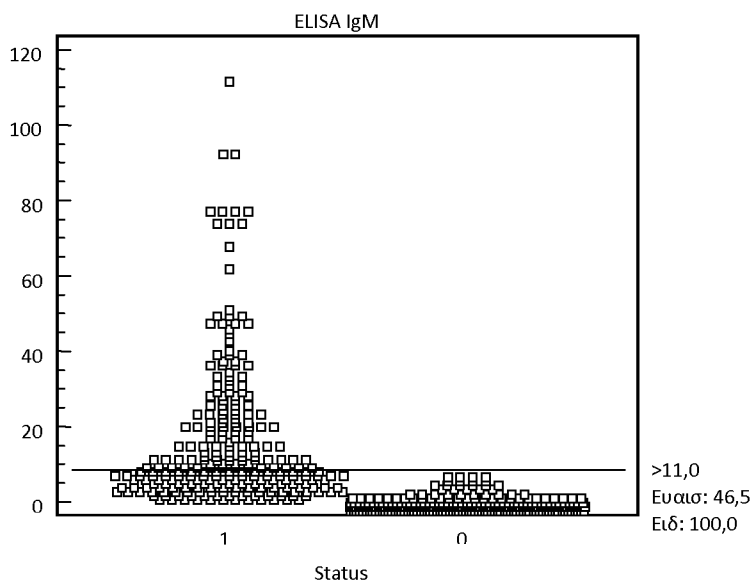
Πίνακας 30: Αποτελέσματα της ELISA IgM στο σύνολο των θετικών και των αρνητικών δειγμάτων.

		Βρουκέλλωση	
		Ομάδα Γ	BN
ELISA IgM	Θετική τιμή	125	0
	Αρνητική τιμή	144	305

Η ευαισθησία της μεθόδου υπολογίστηκε ότι είναι 46,5 % (95 % CI : 40,4 - 52,6) και η ειδικότητα 100 % (95 % CI : 98,8 – 100) εφ' όσον η επιλογή των αρνητικών δειγμάτων έγινε με τη συνθήκη ότι όλα τα δείγματα είναι αρνητικά σε όλες τις χρησιμοποιούμενες μεθόδους. Ο λόγος πιθανοτήτων θετικού αποτελέσματος (LR+) δεν κατέστη δυνατό να υπολογιστεί, ενώ ο λόγος πιθανοτήτων αρνητικού αποτελέσματος (LR-) υπολογίστηκε ότι είναι 0,54. Η τιμή K της IgM υπολογίστηκε ότι είναι 0,480 (95 % CI : 0,40 – 0,55).

Το διάγραμμα διασποράς τιμών της ELISA IgM παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 26:

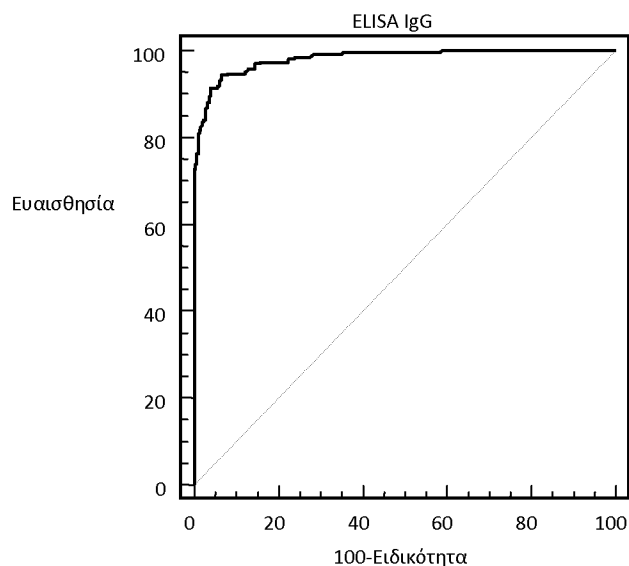
Διάγραμμα 26 : Διάγραμμα διασποράς τιμών της ELISA IgM σε σχέση με το status disease.



2.2.3.1.5 ELISA IgG

Η ROC analysis για τη μέθοδο ELISA IgG έδωσε την παρακάτω καμπύλη, η οποία παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 27:

Διάγραμμα 27: Η καμπύλη της ROC analysis για την ELISA IgG.



Η AUC υπολογίστηκε ότι είναι 0,855 (CI 95 % : 82,4 - 88,3). Ως τιμή cut-off ορίστηκε ο τίτλος > 11 μονάδων Panbio, αφού αυτός ο τίτλος ορίζεται από τον κατασκευαστή ως ο ελάχιστος τίτλος αντισωμάτων για να θεωρηθεί ένα δείγμα θετικό.

Η μέθοδος ELISA IgG ανίχνευσε ως θετικά τα 191 από τα 271 θετικά δείγματα με εύρος τιμών από 11,1 έως 194, ενώ έδωσε και 78 ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα με τιμές από 0,83 έως και 10,2 μονάδες Panbio.

Στον πίνακα 31 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ELISA IgG στο σύνολο των δειγμάτων.

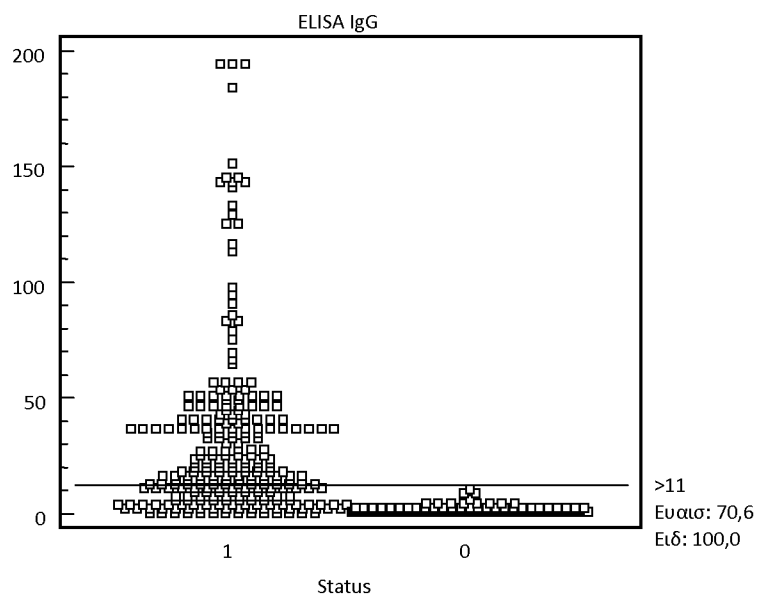
Πίνακας 31: Αποτελέσματα της ELISA IgG στο σύνολο των θετικών και των αρνητικών δειγμάτων.

		Βρουκέλλωση	
		BP	BN
ELISA IgG	Θετική τιμή	191	0
	Αρνητική τιμή	78	305
		269	305

Η ευαισθησία της μεθόδου υπολογίστηκε ότι είναι 70,6 % (95 % CI : 64,8 - 76) και η ειδικότητα 100 % (95 % CI : 98,8 – 100), εφ' όσον η επιλογή των αρνητικών δειγμάτων έγινε με τη συνθήκη ότι όλα τα δείγματα είναι αρνητικά σε όλες τις χρησιμοποιούμενες μεθόδους. Ο λόγος πιθανοτήτων θετικού αποτελέσματος (LR+) δεν κατέστη δυνατό να υπολογιστεί, ενώ ο λόγος πιθανοτήτων αρνητικού αποτελέσματος (LR-) υπολογίστηκε ότι είναι 0,29. Η τιμή K της IgM υπολογίστηκε ότι είναι 0,722 (95 % CI : 0,66 – 0,78).

Το διάγραμμα διασποράς τιμών της ELISA IgM παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 28:

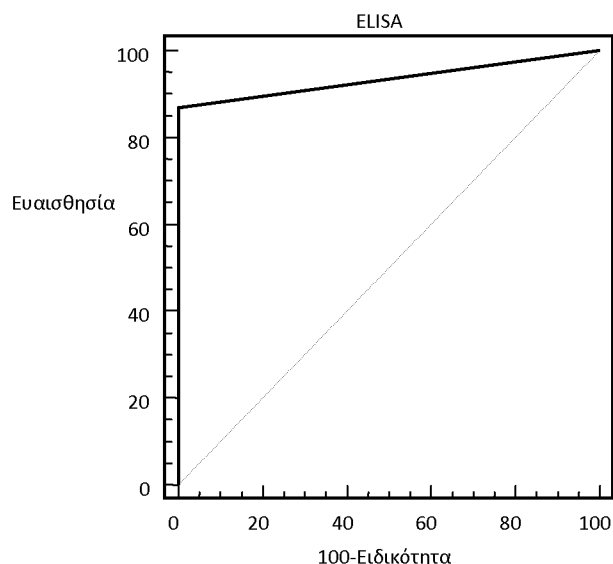
Διάγραμμα 28: Διάγραμμα διασποράς τιμών της ELISA IgG σε σχέση με το status disease.



6) ELISA (IgM ή / και IgG)

Η ROC analysis για τη μέθοδο ELISA (IgM ή / και IgG) έδωσε την παρακάτω καμπύλη η οποία παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 29:

Διάγραμμα 29: Η καμπύλη της ROC analysis για την ELISA.



Η AUC υπολογίστηκε ότι είναι 0,935 (CI 95 % : 91,2 - 95,4). Δεν ορίστηκε καμία τιμή ως τιμή cut-off, αλλά η μέθοδος θεωρήθηκε ως θετική εφόσον ήταν θετική είτε η IgM, είτε η IgG, είτε και οι δύο ταυτόχρονα.

Η μέθοδος ELISA ανίχνευσε ως θετικά τα 234 από τα 271 θετικά δείγματα με εύρος τιμών από 11,1 έως 194, ενώ έδωσε και 35 ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα με τιμές από 0,83 έως και 10,2 μονάδες Panbio.

Στον πίνακα 32 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ELISA στο σύνολο των δειγμάτων:

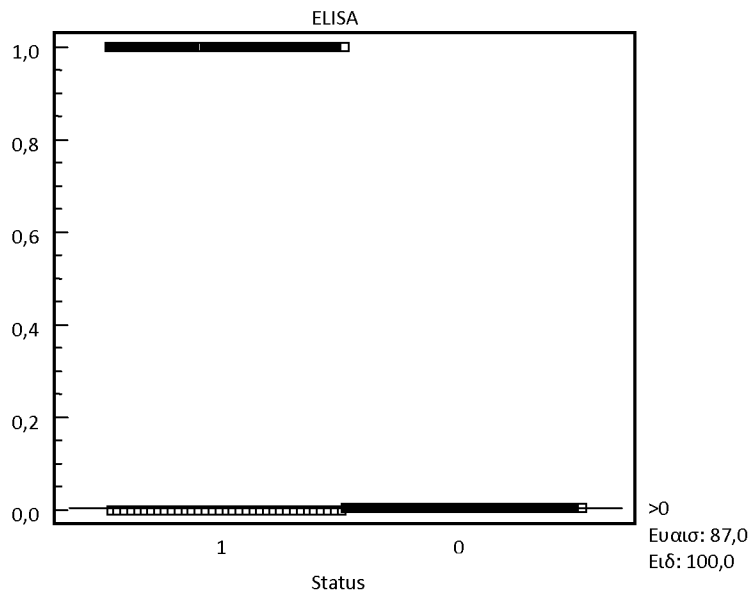
Πίνακας 32: Αποτελέσματα της ELISA στο σύνολο των θετικών και των αρνητικών δειγμάτων.

		Βρουκέλλωση	
		BP	BN
ELISA	Θετική τιμή	234	0
	Αρνητική τιμή	35	305

Η ευαισθησία της μεθόδου υπολογίστηκε ότι είναι 87 % (95 % CI : 82,4 - 90,8) και η ειδικότητα 100 % (95 % CI : 98,8 – 100), εφ' όσον η επιλογή των αρνητικών δειγμάτων έγινε με τη συνθήκη ότι όλα τα δείγματα είναι αρνητικά σε όλες τις χρησιμοποιούμενες μεθόδους. Ο λόγος πιθανοτήτων θετικού αποτελέσματος (LR+) δεν κατέστη δυνατό να υπολογιστεί, ενώ ο λόγος πιθανοτήτων αρνητικού αποτελέσματος (LR-) υπολογίστηκε ότι είναι 0,13. Η τιμή K της IgM υπολογίστηκε ότι είναι 0,877 (95 % CI : 0,84 – 0,92).

Το διάγραμμα διασποράς τιμών της ELISA IgM παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 30:

Διάγραμμα 30: Διάγραμμα διασποράς τιμών της ELISA σε σχέση με το status disease.



Συνοπτικά οι σπουδαιότερες παράμετροι κάθε μεθόδου δηλαδή η ευαισθησία, η ειδικότητα και η περιοχή κάτω από την καμπύλη (AUC) παρουσιάζονται στον πίνακα 33:
Πίνακας 33: Ευαισθησία, ειδικότητα και AUC όλων των μεθόδων που εφαρμόστηκαν.

Μέθοδοι	Ευαισθησία (95% CI)	Ειδικότητα (95% CI)	AUC (95% CI)
FPA	89,7 (85,4 – 93)	96,1 (93,2 – 97,9)	0,931 (90,7 – 95)
RBT	78,6 (73,2 – 83,3)	100 (98,8 – 100)	0,893 (86,5 – 91,7)
SAT	70,7 (64,9 – 76,1)	100 (98,8 – 100)	0,854 (82,2 – 88,2)
IgM	46,5 (40,4 – 52,6)	100 (98,8 – 100)	0,732 (69,4 – 76,8)
IgG	70,6 (64,8 – 76)	100 (98,8 – 100)	0,855 (82,4 – 88,3)
ELISA	87 (82,4 – 90,8)	100 (98,8 – 100)	0,935 (91,2 – 95,4)

Τη μεγαλύτερη ευαισθησία από όλες τις μεθόδους εμφάνισε η FPA, ενώ είχε μαζί με την ELISA και την υψηλότερη περιοχή κάτω από την καμπύλη με διαφορά μη στατιστικώς σημαντική. Αντίθετα τη χαμηλότερη ευαισθησία και τη μικρότερη περιοχή κάτω από την καμπύλη εμφάνισε η ELISA IgM.

2.2.3.2 Σύγκριση των μεθόδων μεταξύ τους

Τα αποτελέσματα της κάθε μιας από όλες τις μεθόδους που χρησιμοποιήθηκαν στη συνέχεια συγκρίθηκαν αφ' ενός με το status disease, έτσι όπως έχει περιγραφεί πρωτύτερα, δηλαδή θετικό status disease, όταν τουλάχιστον μία από τις RBT, SAT και ELISA IgM και IgG έδωσαν θετικό αποτέλεσμα και αρνητικό status disease όταν καμία από τις παραπάνω ορολογικές μεθόδους δεν έδωσε θετικό αποτέλεσμα.

Για την καλύτερη σύγκριση των μεθόδων μεταξύ τους, οι αρνητικές και οι θετικές τιμές όλων των μεθόδων μετατράπηκαν σε 0 και 1 αντίστοιχα.

- 1) Για την FPA: τιμές ≤ 99 mP αντικαταστάθηκαν με 0, ενώ τιμές > 99 mP με 1
- 2) Για την RBT: τιμή 0 παρέμεινε ως 0, ενώ τιμές 1+ έως 4+ αντικαταστάθηκαν με 1
- 3) Για την SAT: τίτλοι $< 1:160$ αντικαταστάθηκαν με 0, ενώ τίτλοι $\geq 1:160$ με 1,
- 4) Για τις ELISA IgM και IgG: τιμές < 11 μονάδων Panbio αντικαταστάθηκαν με 0, ενώ τιμές > 11 μονάδων Panbio με 1.
- 5) Για την ELISA συνολικά: το αποτέλεσμα θεωρήθηκε ως 0, όταν οι IgM και IgG ήταν και οι δύο αρνητικές, ενώ θεωρήθηκε ως 1, όταν μία εκ των δύο είχε θετικό αποτέλεσμα.

Ομοίως ως 0 και 1 χαρακτηρίστηκε και η κατάσταση των ασθενών και των μαρτύρων (status disease), , δηλαδή ως 0 χαρακτηρίστηκαν οι υγιείς αιμοδότες, οι οποίοι σε όλες τις χρησιμοποιούμενες εξετάσεις έδωσαν αρνητικό αποτέλεσμα, ενώ ως 1 (ασθενείς) χαρακτηρίστηκαν οι ύποπτοι που εμφάνισαν θετικό αποτέλεσμα τουλάχιστον σε μία από τις τρεις μεθόδους που εφαρμόστηκαν.

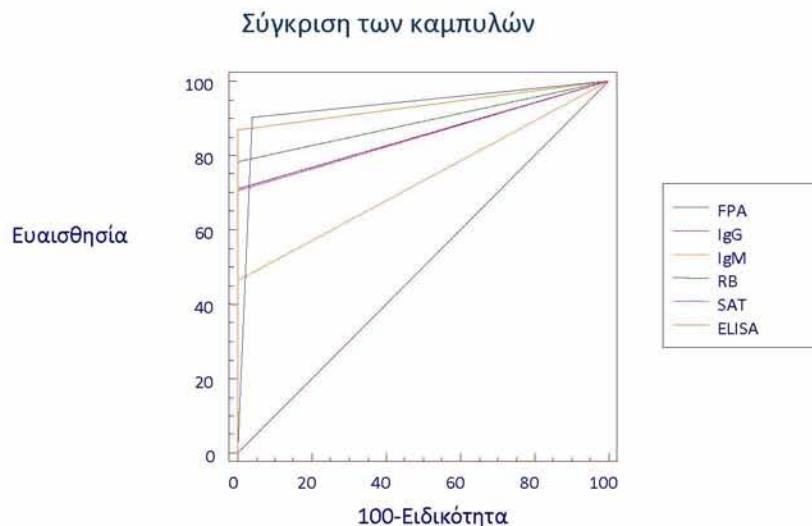
Για την σύγκριση των αποτελεσμάτων των μεθόδων χρησιμοποιήθηκαν:

- 1) Η ROC analysis, με την οποία έγινε η σύγκριση των καμπυλών κάθε ορολογικής μεθόδου και υπολογίστηκε η διαφορά της περιοχής κάτω από την καμπύλη της κάθε μεθόδου με όλες τις υπόλοιπες, καθώς επίσης και αν η διαφορά αυτή ήταν στατιστικώς σημαντική ή όχι και
- 2) Η Kappa statistic, με την οποία υπολογίστηκε η τιμή K (kappa value) της κάθε μεθόδου συγκρινόμενης με το status disease και με κάθε μια από τις υπόλοιπες μεθόδους, έτσι ώστε να βρεθεί η συμφωνία των αποτελεσμάτων (Inter – rater agreement) τους.

2.2.3.2.1 Σύγκριση των περιοχών κάτω από την καμπύλη (Comparison of ROC Curves)

Η σύγκριση των καμπυλών και των περιοχών κάτω από την καμπύλη (AUC) όλων των ορολογικών μεθόδων, που πραγματοποιήθηκε με την ROC analysis παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 31:

Διάγραμμα 31: Σύγκριση των AUC όλων των ορολογικών μεθόδων.



Η κατά ζεύγος σύγκριση (pairwise comparison of ROC curves) των καμπυλών και των διαφορών των περιοχών κάτω από την καμπύλη (AUC) όλων των ορολογικών μεθόδων παρουσιάζεται στον Πίνακα 34:

Πίνακας 34: Διαφορές των AUC στην κατά ζεύγος σύγκριση όλων των μεθόδων.

Ζεύγη συγκρινόμενων ορολογικών μεθόδων	Διαφορά των περιοχών κάτω από την καμπύλη	Στατιστική διαφορά (τιμή <i>P</i>)
FPA vs RBT	0,04	0,02*
FPA vs SAT	0,08	<0,001*
FPA vs IgM	0,20	< 0,001*
FPA vs IgG	0,08	< 0,001*
FPA vs ELISA	0,003	0,85
RBT vs SAT	0,04	0,05*
RBT vs IgM	0,16	< 0,001*
RBT vs IgG	0,04	0,08
RBT vs ELISA	0,04	0,02*
SAT vs IgM	0,12	< 0,001*
SAT vs IgG	0,002	0,93
SAT vs ELISA	0,08	<0,001*
IgM vs IgG	0,12	< 0,001*
IgM vs ELISA	0,20	< 0,001*
IgG vs ELISA	0,08	< 0,001*

* Στατιστικά σημαντική διαφορά ($P < 0,05$)

Όπως φαίνεται από την τιμή *P*, την μικρότερη και στατιστικά μη σημαντική διαφορά κάτω από την καμπύλη εμφανίζουν τα ζεύγη FPA – ELISA, FPA – RBT και SAT – ELISA IgG.

2.2.3.2.2 Συμφωνία των αποτελεσμάτων (Inter – rater agreement)

Με την Kappa analysis υπολογίστηκε η τιμή K (K value) της κάθε μεθόδου ως προς το status disease και ως προς κάθε μια από τις άλλες μεθόδους.

Τα αποτελέσματα της Kappa analysis παρατίθενται στον Πίνακα 35:

Πίνακας 35: Οι τιμές K όλων των μεθόδων συγκρινόμενες με το status disease και μεταξύ τους.

Ζεύγη ορολογικών μεθόδων	Τιμή K
FPA vs status	0,86 (0,82 – 0,90)
FPA vs RBT	0,72 (0,66 – 0,77)
FPA vs SAT	0,68 (0,62 – 0,74)
FPA vs IgM	0,44 (0,37 – 0,52)
FPA vs IgG	0,67 (0,61 – 0,74)
FPA vs ELISA	0,78 (0,72 – 0,83)
RBT vs status	0,80 (0,75 – 0,84)
RBT vs SAT	0,74 (0,68 – 0,80)
RBT vs IgM	0,50 (0,42 – 0,58)
RBT vs IgG	0,62 (0,55 – 0,69)
RBT vs ELISA	0,72 (0,66 – 0,78)
SAT vs status	0,72 (0,66 – 0,78)
SAT vs IgM	0,52 (0,44 – 0,60)
SAT vs IgG	0,52 (0,44 – 0,60)
SAT vs ELISA	0,66 (0,60 – 0,72)
IgM vs status	0,48 (0,40 – 0,55)
IgM vs IgG	0,34 (0,25 – 0,43)
IgM vs ELISA	0,57 (0,50 – 0,64)
IgG vs status	0,72 (0,66 – 0,78)
IgG vs ELISA	0,83 (0,79 – 0,88)
ELISA vs status	0,88 (0,84 – 0,92)

Οι τιμές στις παρενθέσεις δηλώνουν το διάστημα εμπιστοσύνης 95 %

Τη μεγαλύτερη συμφωνία αποτελεσμάτων εμφάνισαν οι μέθοδοι FPA και ELISA σε σχέση με το status disease και το ζεύγος ELISA – IgG.

Συνοπτικά όλες οι διαγνωστικές παράμετροι της μεθόδου FPA σε όλους τους πληθυσμούς που εφαρμόστηκε, αναφέρονται στον πίνακα 36:

Πίνακας 36: Τιμές όλων των διαγνωστικών παραμέτρων που έδωσε η FPA και στις τρεις ομάδες ύποπτων ασθενών που εφαρμόστηκε.

Διαγνωστικές παράμετροι	Μέθοδος FPA		
	Ομάδα Α προς Ομάδα Μ	Ομάδα Β προς Ομάδα Μ	Ομάδα Γ προς Ομάδα Μ
Τιμή cut-off	102	99	99
Max sum Se + Sp	189,6	189,6	185,8
Ευαισθησία	91,2	93,5	89,7
Ειδικότητα	98,4	96,1	96,1
LR +	55,61	23,76	22,79
LR -	0,09	0,07	0,11
AUC	0,983	0,981	0,97
Τιμή K (status disease)	0,91	0,92	0,86

Από τον παραπάνω πίνακα φαίνεται ότι η μέθοδος FPA ανταποκρίνεται καλύτερα στους πληθυσμούς που τα θετικά δείγματα έχουν τουλάχιστον δύο ορολογικές μεθόδους θετικές (Ομάδα Α και Ομάδα Β).

Στον Πίνακα 37 παρουσιάζονται συνοπτικά οι σπουδαιότερες διαγνωστικές παράμετροι όλων των μεθόδων σε όλες τις ομάδες εξετασθέντων δειγμάτων.

Πίνακας 37: Διαγνωστικές παράμετροι όλων των μεθόδων σε όλες τις ομάδες δειγμάτων.

Ομάδες δειγμάτων	Ορολογικές μέθοδοι	Διαγνωστικές παράμετροι					Τιμή Κ
		Ευαισθησία	Ειδικότητα	LR+	LR-	AUC	
Ομάδα Α προς Ομάδα Μ	FPA	91,2	98,4	55,61	0,09	0,983	0,91
Ομάδα Β προς Ομάδα Μ	FPA	93,5	96,1	23,76	0,07	0,981	0,92
	RBT	89	100	-	0,11	0,943	0,9
	SAT	81,6	100	-	0,18	0,909	0,84
	ELISA	93	100	-	0,01	0,965	0,94
Ομάδα Γ προς Ομάδα Μ	FPA	89,7	96,1	22,79	0,11	0,970	0,86
	RBT	78,6	100	-	0,21	0,893	0,8
	SAT	70,7	100	-	0,29	0,854	0,72
	ELISA	87	100	-	0,13	0,935	0,88

Όπως φαίνεται από τα συνολικά αποτελέσματα, η FPA εμφανίζει την υψηλότερη ευαισθησία, AUC και τιμή Κ σε όλες τις ομάδες, μαζί με την ELISA, χωρίς στατιστικά σημαντικές διαφορές από αυτήν.

3. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

3.1 Γενικά

Τα κλινικά συμπτώματα και σημεία της βρουκέλλωσης στον άνθρωπο τις περισσότερες φορές είναι έντονα, ιδιαίτερα κατά την οξεία φάση της νόσου. Παρ' όλα αυτά όμως, κανένα τους δεν είναι παθογνωμονικό και η κλινική διάγνωση είναι ιδιαίτερα δύσκολη, αφού η νόσος περιλαμβάνεται στη διαφορική διάγνωση του συνδρόμου «πυρετού αγνώστου αιτιολογίας» μαζί με πλήθος άλλων εμπύρετων νοσημάτων. Τα εργαστηριακά ευρήματα επίσης που προκύπτουν από τον αιματολογικό και βιοχημικό έλεγχο του ασθενούς μπορεί σε συνδυασμό με την κλινική εικόνα να κατευθύνουν προς την οξεία βρουκέλλωση, δεν μπορούν όμως να θέσουν με ασφάλεια τη διάγνωσή της, η οποία γίνεται ακόμη πιο δύσκολη στη χρόνια ή στις εντοπισμένες μορφές της νόσου. Επομένως η συνδρομή ενός εξειδικευμένου εργαστηρίου, το οποίο με ειδικές ορολογικές ή άλλες μεθόδους θα ανιχνεύσει τα ειδικά έναντι της βρουκέλλας αντισώματα ή θα απομονώσει τον παθογόνο παράγοντα, είναι πάντοτε απαραίτητη.

Η δυσκολία στο να τεθεί κλινικά η διάγνωση της βρουκέλλωσης, γίνεται αντιληπτή και από το γεγονός ότι, από το 1897 που οι Wright και Smith ανακάλυψαν, περιέγραψαν και άρχισαν να εφαρμόζουν τη μέθοδο Wright (SAT), ένας πολύ μεγάλος αριθμός ορολογικών και άλλων εξετάσεων (περισσότερες από δεκαπέντε) έχουν περιγραφεί και προταθεί για τη διάγνωση της νόσου. Από την άλλη μεριά, η ανάγκη ύπαρξης τόσο πολλών μεθόδων είναι επίσης ενδεικτική του γεγονότος, ότι καμία από τις μεθόδους που εφαρμόζονται, δεν μπορεί από μόνη της να διαγνώσει με ασφάλεια τη νόσο. Έτσι, πολλοί συγγραφείς υποστηρίζουν ότι απαιτείται η εκτέλεση τουλάχιστον δύο ορολογικών εξετάσεων (Young J.E. 1995) στο ταυτόχρονο θετικό αποτέλεσμα των οποίων θα βασιστεί ο κλινικός ιατρός, για να θέσει εκ του ασφαλούς τη διάγνωση της βρουκέλλωσης και να προχωρήσει στη θεραπευτική αγωγή.

Πολλές από τις μεθόδους που περιγράφηκαν τα τελευταία χρόνια, όπως οι σύνθετες και πολύπλοκες παραλλαγές της μεθόδου της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης και οι διάφορες ραδιοανοσολογικές μέθοδοι, προέκυψαν από την ανάγκη να βελτιωθούν οι διαγνωστικές παράμετροι (ειδικότητα, ευαισθησία, θετική και αρνητική προγνωστική αξία) των ήδη υπάρχουσών και εφαρμοζόμενων ορολογικών εξετάσεων. Οι νέες αυτές μέθοδοι παρουσιάζουν πολλά πλεονεκτήματα, όπως η βελτίωση των ποσοστών της ευαισθησίας και της ειδικότητας σε σχέση με τις παλαιότερες και η δυνατότητα να ανιχνεύουν τις διαφορετικές κλάσεις ανοσοσφαιρινών που παράγονται κατά την πορεία της νόσου, γεγονός που έχει

πολύ μεγάλη σημασία στη διάγνωση των χρόνιων και των εντοπισμένων μορφών της βρουκέλλωσης. Εμφανίζουν όμως και πολλά μειονεκτήματα που στις περισσότερες περιπτώσεις είναι απαγορευτικά για την εφαρμογή τους: είναι πολύ σύνθετες και απαιτούν εργαστήρια με υψηλά πρότυπα λειτουργίας και ιδιαίτερα ακριβό εξοπλισμό, όπως επίσης και εξειδικευμένο επιστημονικό προσωπικό, έχουν πολύ υψηλό κόστος εξέτασης ανά ασθενή, μερικές από αυτές είναι ιδιαίτερα χρονοβόρες και κάποιες άλλες αφήνουν ραδιενεργά κατάλοιπα (Memish Z.A. et al 2002). Έτσι η εφαρμογή τους από τα περισσότερα μικροβιολογικά εργαστήρια είτε ιδιωτικά, είτε νοσοκομείων, καθίσταται αδύνατη και μόνο λίγα εξειδικευμένα εργαστήρια των ανεπτυγμένων κυρίως χωρών μπορούν να υποστηρίξουν την εφαρμογή τους για επιστημονικούς και ερευνητικούς σκοπούς.

Παρά το μεγάλο αριθμό των ορολογικών εξετάσεων όμως, η σίγουρη και ασφαλής διάγνωση της βρουκέλλωσης μπορεί να τεθεί, όπως προαναφέρθηκε, μόνο με την απομόνωση του βακτηρίου από καλλιέργειες παθολογικού υλικού (αίμα, μυελός των οστών κλπ)

Από όλες τις ορολογικές μεθόδους που κατά καιρούς έχουν προταθεί για τη διάγνωση της βρουκέλλωσης, λίγες είναι αυτές που τυγχάνουν ευρείας εφαρμογής στην καθημερινή πράξη. Αυτές είναι η SAT ή μέθοδος Wright, η μέθοδος Rose Bengal, η μέθοδος ELISA και η μέθοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης ή PCR.

Γίνεται, λοιπόν, εύκολα αντιληπτό ότι μία ορολογική μέθοδος γρήγορη, εύκολη και με χαμηλό κόστος εξέτασης ανά δείγμα, μπορεί να προσφέρει πολλά στην εργαστηριακή διάγνωση της νόσου.

Η χρήση της μεθόδου FPA (Fluorescence Polarization Assay, μέθοδος της φθορίζουσας πόλωσης του φωτός) διερευνήθηκε και αξιολογήθηκε σε πολλά είδη ζώων, συμπεριλαμβανομένων των βοοειδών (Nielsen K. et al 1996, 1998, Dajer A. et al 1999, Nielsen K. et al 2001, 2002, McGiven J.A. et al 2003), των αιγοπροβάτων (Nielsen K. et al 1999a, Burriel A.R. et al 2004, Minas A. et al 2005), του χοίρου (Nielsen K. et al 1999b) και του βίσωνα (Gall D. et al 2000).

Στις μελέτες αυτές, τόσο η ευαισθησία όσο και η ειδικότητα της μεθόδου, εμφανίζουν πολύ υψηλές τιμές και ανάλογα με το είδος του ζώου κυμαίνονται ως εξής:

Βοοειδή : ευαισθησία 95,3 – 99,1 και ειδικότητα 96,9 – 99,8

Πρόβατα : ευαισθησία 85 – 95,7 και ειδικότητα 96 – 98,9

Αίγες : ευαισθησία 88,1 και ειδικότητα 99,1

Χοίρος : ευαισθησία 93,5 και ειδικότητα 97,2

Βίσωνα : ευαισθησία 92,1 και ειδικότητα 99,4

Με βάση τα αποτελέσματα αυτά αποδείχθηκε ότι η μέθοδος FPA είναι πολύ αξιόπιστη στην ορολογική διάγνωση της βρουκέλλωσης σε όλα τα είδη των παραγωγικών ζώων και για το λόγο αυτό το Παγκόσμιο Γραφείο Επιζωοτιών τη συμπεριέλαβε από το 2000 στο εγχειρίδιο εργαστηριακής διάγνωσης της νόσου (ΟΙΕ 2000, ΟΙΕ 2004).

Σε αντίθεση με τα παραγωγικά ζώα, η εφαρμογή και η αξιολόγηση της μεθόδου στη διάγνωση της βρουκέλλωσης του ανθρώπου βρίσκεται ακόμη σε πολύ αρχικό στάδιο. Μόνο μία μελέτη υπάρχει στην παγκόσμια βιβλιογραφία (Lucero N. et al 2003), η οποία προέρχεται από την αμερικανική ήπειρο χωρίς να διευκρινίζεται η χώρα προέλευσης των ασθενών (ενδημική ή μη ενδημική περιοχή).

Λαμβάνοντας υπ' όψη τις τιμές των διαγνωστικών παραμέτρων (ευαισθησία και ειδικότητα) της μεθόδου στα ζώα και με βάση το γεγονός ότι η μέθοδος θεωρείται μη ειδική του είδους (multispecies method) και δεν έχει αξιολογηθεί επαρκώς η εφαρμογή της στον άνθρωπο, αποφασίστηκε να διερευνηθεί και να αξιολογηθεί η χρήση της στην ορολογική διάγνωση της βρουκέλλωσης του ανθρώπου στη χώρα μας όπου η νόσος ενδημεί σε όλες σχεδόν τις αγροτικές περιοχές (Hadjichristodoulou Ch. et al 1999a, 1999b).

3.2 Αξιολόγηση των αποτελεσμάτων

Η μέθοδος διερευνήθηκε και αξιολογήθηκε σε τέσσερις διαφορετικές ομάδες συμμετεχόντων στη μελέτη, όπως έχει ήδη αναφερθεί.

Η μέθοδος αρχικά διερευνήθηκε και αξιολογήθηκε σε **γνωστούς θετικούς (Ομάδα Α – BP) και γνωστούς αρνητικούς (Ομάδα Μ – BN) ορούς**. Η διερεύνηση στις ομάδες αυτές έγινε με βάση το δεδομένο ότι οι συμμετέχοντες προσέγγιζαν σχεδόν με απόλυτη ασφάλεια το «status disease» (Ομάδα Α) και το «no disease status» (Ομάδα Μ).

Στη συνέχεια η μέθοδος FPA εφαρμόστηκε μαζί με τις άλλες ορολογικές μεθόδους στις **Ομάδες Β (ύποπτοι ασθενείς με τουλάχιστον δύο ορολογικές μεθόδους θετικές) και Μ (BN)**. Η διερεύνηση της μεθόδου στην Ομάδα Β, καθώς επίσης και η σύγκριση των αποτελεσμάτων της με αυτά των άλλων μεθόδων, αποφασίστηκε λαμβάνοντας υπόψη το γεγονός ότι η βρουκέλλωση είναι νόσος που στη χώρα μας ενδημεί στις περισσότερες αγροτικές περιοχές. Είναι γνωστό επίσης ότι στις περιοχές αυτές οι κάτοικοι είναι δυνατό να εμφανίζουν λόγω της συνεχούς έκθεσης στον αιτιολογικό παράγοντα της νόσου, τίτλο αντισωμάτων χωρίς την ταυτόχρονη ύπαρξη κλινικής εικόνας συμβατής με τη νόσο. Η προσέγγιση αυτή ίσως είναι και η πιο ρεαλιστική γιατί αφ' ενός μεν στις ενδημικές της νόσου χώρες δεν είναι αρκετή ποτέ μία θετική ορολογική εξέταση για να τεθεί εκ του ασφαλούς η εργαστηριακή διάγνωση της βρουκέλλωσης, αφ' ετέρου ένας ασθενής με κλινική

εικόνα συμβατή με βρουκέλλωση, με την ύπαρξη επιδημιολογικής σύνδεσης και με δύο γνωστές ορολογικές μεθόδους πλην της FPA θετικές, θεωρείται ότι σίγουρα νοσεί από βρουκέλλωση.

Τέλος, η μέθοδος εφαρμόστηκε μαζί με τις SAT, RBT και ELISA στις **Ομάδες Γ (ύποπτοι ασθενείς με τουλάχιστον μία μέθοδο θετική) και Μ (BN)**. Η διερεύνηση αυτή και η σύγκριση των αποτελεσμάτων της FPA με τις άλλες ορολογικές μεθόδους, στην Ομάδα Γ πραγματοποιήθηκε ώστε να αξιολογηθεί η FPA σε συμμετέχοντες που πληρούσαν τον ορισμό της περίπτωσης βρουκέλλωσης σύμφωνα με τον Π.Ο.Υ. (κλινικά συμπτώματα και θετικό αποτέλεσμα σε μία από τις γνωστές αξιολογημένες μεθόδους).

Και στις τρεις ομάδες συμμετεχόντων, χρησιμοποιώντας το μέγιστο άθροισμα ευαισθησίας και ειδικότητας για τον καθορισμό του cut-off, η μέθοδος έδωσε παραπλήσιες τιμές cut-off (102 mP στην πρώτη περίπτωση και 99 mP στη δεύτερη και στην τρίτη) ενώ για την ευαισθησία, την ειδικότητα, το λόγο πιθανοτήτων θετικού και το λόγο πιθανοτήτων αρνητικού αποτελέσματος έδωσε τιμές, οι οποίες εμφάνιζαν μικρές διαφορές μη στατιστικά σημαντικές. Παρόμοια σε μη στατιστικά σημαντικές διαφορές κυμάνθηκε και η τιμή της περιοχής κάτω από την καμπύλη (AUC).

Έτσι, στις Ομάδες Α και Μ, η μέθοδος έδωσε τις παρακάτω τιμές:

Τιμή cut-off: 102 mP

Μέγιστο άθροισμα ευαισθησίας και ειδικότητας: 189,6

Περιοχή κάτω από την καμπύλη (AUC): 0,983

Ευαισθησία (Se): 91,2%

Ειδικότητα (Sp): 98,4%

Θετικός λόγος πιθανοτήτων (LR+): 55,61

Αρνητικός λόγος πιθανοτήτων (LR-): 0,09

Στις Ομάδες Β και Μ, οι ίδιες διαγνωστικές παράμετροι εμφάνισαν τις παρακάτω τιμές:

Τιμή cut-off: 99 mP

Μέγιστο άθροισμα ευαισθησίας και ειδικότητας: 189,6

Περιοχή κάτω από την καμπύλη (AUC): 0,981

Ευαισθησία (Se): 93,5%

Ειδικότητα (Sp): 96,1%

Θετικός λόγος πιθανοτήτων (LR+): 23,76

Αρνητικός λόγος πιθανοτήτων (LR-): 0,07.

Τέλος στις Ομάδες Γ και Μ, οι παραπάνω διαγνωστικές παράμετροι είχαν τις εξής τιμές:

Τιμή cut-off: 99 mP

Μέγιστο άθροισμα ευαισθησίας και ειδικότητας: 185,8

Περιοχή κάτω από την καμπύλη (AUC): 0,970

Ευαισθησία (Se): 89,7%

Ειδικότητα (Sp): 96,1%

Θετικός λόγος πιθανοτήτων (LR+): 22,79

Αρνητικός λόγος πιθανοτήτων (LR-): 0,11.

Από την ανάλυση των παραπάνω αποτελεσμάτων προκύπτουν τρία βασικά συμπεράσματα:

Συμπέρασμα 1^ο: Η μέθοδος FPA εμφανίζει πολύ υψηλές τιμές ευαισθησίας στις Ομάδες Α και Β, δηλαδή στους ασθενείς που προσεγγίζουν με μεγαλύτερες πιθανότητες το λεγόμενο status disease (πραγματικοί ασθενείς), έχοντας όλες ή τουλάχιστον δύο θετικές ορολογικές μεθόδους εκτός των κλινικών συμπτωμάτων και της επιδημιολογικής σύνδεσης. Στους θετικούς στη βρουκέλλωση - BP ασθενείς η ευαισθησία είναι 91,2% ενώ στους ύποπτους με τουλάχιστον δύο μεθόδους θετικές είναι 93,5%. Η διαφορά που παρατηρείται στις τιμές της ευαισθησίας θεωρείται στατιστικά μη σημαντική. Αυτό αποδεικνύεται και από το γεγονός ότι στην Ομάδα Α το δεύτερο καλύτερο μέγιστο άθροισμα, όπως φαίνεται στον πίνακα 15 είναι 189,3 (διαφορά αμελητέα σε σχέση με το 189,6) για το οποίο η ευαισθησία είναι 93,2% και η ειδικότητα 96,1%, τιμές ίσες με αυτές της Ομάδας Β.

Συμπέρασμα 2^ο: Η μέθοδος εμφανίζει μικρότερη ευαισθησία (η ειδικότητα παραμένει σταθερή, αφού ο πληθυσμός των αρνητικών δειγμάτων είναι σταθερός σε όλες τις περιπτώσεις) στους ύποπτους με τουλάχιστον μία μέθοδο θετική εκτός των κλινικών συμπτωμάτων και της επιδημιολογικής σύνδεσης (Ομάδα Γ). Αυτό δικαιολογείται από το γεγονός ότι στον πληθυσμό αυτό των ύποπτων ασθενών περιλαμβάνεται και ένας αριθμός ασθενών (41 ασθενείς), οι οποίοι εμφάνισαν θετικό αποτέλεσμα μόνο σε μια ορολογική μέθοδο. Οι ασθενείς αυτοί παρά τη συμβατή κλινική εικόνα και την επιδημιολογική σύνδεση υπάρχει η πιθανότητα να μη νοσούν από βρουκέλλωση αλλά από κάποιο άλλο εμπύρετο νόσημα και η μοναδική ορολογική μέθοδος να έχει δώσει ψευδώς θετικό αποτέλεσμα. Στην περίπτωση αυτή η μέθοδος FPA δεν τους ανιχνεύει ως θετικούς και έτσι η τιμή της ευαισθησίας της φαίνεται ψευδώς να είναι χαμηλότερη. Παρά το γεγονός αυτό, οι τιμές των διαγνωστικών παραμέτρων στην περίπτωση αυτή επαληθεύουν όλες τις βιβλιογραφικές αναφορές που αναφέρουν ότι: α) ποτέ μια ορολογική μέθοδος δεν είναι αρκετή για να θέσει εκ του ασφαλούς την εργαστηριακή διάγνωση της νόσου και β) δύο τουλάχιστον ορολογικές μέθοδοι

πρέπει να εφαρμόζονται σε υποψία βρουκέλλωσης είτε παράλληλα (“in parallel” – θετικό αποτέλεσμα είτε στην μία είτε στην άλλη), είτε σε συνδυασμό (“combined” – θετικό αποτέλεσμα και στην μια και στην άλλη), για να αποφευχθούν τα ψευδώς αρνητικά και τα ψευδώς θετικά αποτελέσματα αντίστοιχα (Al Dahouk S. et al 2003). Και στην Ομάδα Γ όμως η FPA εμφάνισε την υψηλότερη ευαισθησία (89,7%) σε σχέση με τις υπόλοιπες μεθόδους (ELISA 87%, RBT 78,6% και SAT 70,7%).

Συμπέρασμα 3^ο: Η μέθοδος FPA εμφανίζει ένα πολύ μεγάλο πλεονέκτημα σε σχέση με τις περισσότερες από τις ευρέως χρησιμοποιούμενες ορολογικές μεθόδους. Το πλεονέκτημα αυτό συνοψίζεται στη δυνατότητα αυξομείωσης της τιμής του cut-off της μεθόδου ανάλογα με τις τοπικές συνθήκες ή τα επιδημιολογικά χαρακτηριστικά μιας συγκεκριμένης περιοχής, στην οποία διερευνάται η νόσος. Είναι γνωστό ότι στις ενδημικές της νόσου περιοχές το επιθυμητό χαρακτηριστικό μιας ορολογικής μεθόδου που θα εφαρμοστεί, είναι η όσο το δυνατόν υψηλότερη ευαισθησία, δηλαδή η μέθοδος να ανιχνεύει όσο το δυνατόν μεγαλύτερο αριθμό ασθενών. Αντίθετα, σε μη ενδημικές περιοχές το ζητούμενο από μία ορολογική μέθοδο χαρακτηριστικό είναι η όσο το δυνατόν υψηλότερη ειδικότητα, δηλαδή η μέθοδος να χαρακτηρίζεται ως υγιή όσο το δυνατόν περισσότερα πραγματικά υγιή άτομα. Η μέθοδος FPA προσφέρει τη δυνατότητα αυτή της επιλογής του επιθυμητού cut-off, όπως φαίνεται και από τους πίνακες 15, 18 και 27.

Η ειδικότητα της μεθόδου ήταν, όπως φαίνεται και από τα αποτελέσματα, στην Ομάδα Α 98,4% και στις Ομάδες Β και Γ 96,1%. Παρά το γεγονός ότι ήταν η χαμηλότερη από όλες τις άλλες μεθόδους που εφαρμόστηκαν, θεωρείται ως πολύ υψηλή ακόμη και για μία ενδημική χώρα, όπως είναι η Ελλάδα, όπου τα επισήμως αναφερόμενα περιστατικά ανέρχονται σε 21/1.000.000 πληθυσμού κατ’ έτος (Pappas G. et al 2006), ενώ ο πραγματικός αριθμός τους ανέρχεται περίπου σε 21-30/100.000 (Taleski V. et al 2003), αριθμός 10-15πλάσιος των επισήμως δηλωμένων περιστατικών. Από τη στιγμή όμως που το κριτήριο επιλογής των αρνητικών δειγμάτων (υγιείς αιμοδότες) ήταν το αρνητικό αποτέλεσμα σε όλες τις άλλες ορολογικές μεθόδους, είναι αναμενόμενο η ειδικότητα των άλλων μεθόδων να είναι 100%. Αυτό πιθανά να οδηγεί σε σφάλμα εκτίμησης (bias) τόσο της ευαισθησίας, όσο και της ειδικότητας όλων των άλλων μεθόδων που συμμετείχαν στον ορισμό του πληθυσμού των αρνητικών δειγμάτων, και μάλιστα προς όφελος τους.

Τόσο η ευαισθησία όσο και η ειδικότητα της FPA που υπολογίστηκαν στην παρούσα μελέτη και στους τρεις πληθυσμούς θετικών ασθενών, συγκρινόμενες με αυτές των άλλων μεθόδων εμφανίζονται να είναι ίσες ή/και υψηλότερες. Ο Al Dahouk (2003) σε μία βιβλιογραφική ανασκόπηση παρουσίασε συγκεντρωτικά τα ποσοστά της ευαισθησίας και της ειδικότητας όλων των άλλων εφαρμοζόμενων ορολογικών

μεθόδων, που αναφέρονταν σε προηγούμενες μελέτες. Στη βιβλιογραφική αυτή ανασκόπηση αναφέρεται ότι η iELISA έχει ποσοστά ευαισθησίας και ειδικότητας 94-100% και 97-100% αντίστοιχα, η RBT ευαισθησία 90-95% και ειδικότητα 84-98%, και η SAT ευαισθησία 51-96% και ειδικότητα $\leq 100\%$ εξαρτώμενη από τα επίπεδα παρουσίας των μη ειδικών IgM ανοσοσφαιρινών.

Η μέθοδος κατά την εφαρμογή της έδωσε έναν αριθμό ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων, τα οποία ήταν : στην Ομάδα Α (cut-off 102 mP), 11 ψευδώς αρνητικά στα 147 θετικά δείγματα, στην Ομάδα Β (cut-off 99 mP), 26 ψευδώς αρνητικά στα 230 θετικά δείγματα και στην Ομάδα Γ (cut-off 99 mP), 28 ψευδώς αρνητικά στα 271 θετικά δείγματα

Τα παραπάνω ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα μπορούν να δικαιολογηθούν από μη ειδικούς παράγοντες οι οποίοι δε σχετίζονται με την συγκεκριμένη μέθοδο, αλλά παρατηρούνται σε όλες τις ορολογικές μεθόδους που η ευαισθησία τους είναι μικρότερη του 100%. Οι σπουδαιότεροι από τους παράγοντες αυτούς είναι ο πολύ χαμηλός τίτλος αντισωμάτων που μπορεί να έχει ένας θετικός έναντι μιας νόσου ορός, με αποτέλεσμα να καθίσταται αδύνατη η ανίχνευση τους από μια ορολογική μέθοδο, όπως επίσης και η ασταθής ή κακή σύνδεση του αντιγόνου που χρησιμοποιείται σε μια μέθοδο με τα υπάρχοντα αντισώματα.

Η μέθοδος επίσης κατά την εφαρμογή της έδωσε και έναν αριθμό ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων στην Ομάδα Μ των μαρτύρων, τα οποία ήταν: πέντε στα 305 αρνητικά δείγματα όταν το cut-off καθορίστηκε στα 102 mP και 12 στα 305 αρνητικά δείγματα όταν το cut-off ορίστηκε να είναι 99 mP.

Οι λόγοι της εμφάνισης των παραπάνω ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων είναι ειδικοί της μεθόδου FPA και σχετίζονται, αφ' ενός μεν με τη διαδικασία εκτέλεσης της μεθόδου, και αφ' ετέρου με τη φύση των αντισωμάτων έναντι της βρουκέλλας.

Αναλυτικότερα η διαδικασία εκτέλεσης της μεθόδου μπορεί να επηρεαστεί από την ποιότητα του χρησιμοποιούμενου ορού. Η ύπαρξη μικροσκοπικών ακόμη και μη ορατών με γυμνό οφθαλμό πηγμάτων αίματος, αιωρούμενων σωματιδίων σκόνης που μπορεί να ρυπάνουν τον ορό κατά τη διάρκεια χειρισμού του ή ακόμη και άλλων ευμεγέθων μορίων (π.χ. λιπαιμικοί οροί που οφείλονται σε αυξημένα επίπεδα χοληστερόλης ή τριγλυκεριδίων), μπορούν να επηρεάσουν τη δίοδο των εκπεμπόμενων φωτεινών σημάτων από τον αναλυτή και να οδηγήσουν σε αύξηση της τιμής πόλωσης του εκπεμπόμενου φθορίζοντος φωτός, και επομένως σε θετικό αποτέλεσμα (Minas et al 2005).

Η μέθοδος FPA όπως προαναφέρθηκε ανιχνεύει αντισώματα έναντι της βρουκέλλας χρησιμοποιώντας αντιγόνο O – polysaccharide από *B. abortus* στέλεχος

1119.3, συνδεδεμένο με φθορίζον μόριο Fluoro-isothiocyanate – FITC, ανιχνεύει δηλαδή αντισώματα έναντι της εξώτατης στοιβάδας του κυτταρικού τοιχώματος του βακτηρίου. Όμως αυτά τα πολυσακχαριδικά αντιγόνα μπορεί να είναι συγγενή δομικά με αντιγόνα που συναντώνται και σε άλλα βακτήρια, όπως στην *Yersinia enterocolitica* O:9, στην *Escherichia coli* O:157, στην *Salmonella* Kaufmann – White group N και στην *Stenotrophomonas multophila* (Corbel MJ & MacMillan AP 1998) και τα οποία μπορεί να δώσουν διασταυρούμενες αντιδράσεις με τη βρουκέλλωση. Είναι όμως αναγκαίο να τονιστεί ότι στη χώρα μας τα ετήσια περιστατικά που οφείλονται σε λοίμωξη από *Y. Enterocolitica* O:9 είναι πάρα πολύ λίγα και παρατηρούνται συνήθως σε παιδιά που πάσχουν από μεσογειακή αναιμία. Ομοίως η μόλυνση από *E. coli* O:157 είναι πολύ σπάνια στην Ελλάδα και μόνο ένα περιστατικό αναφέρθηκε επίσημα το έτος 2006. Επομένως η πιθανότητα αυτά τα ψευδώς θετικά αποτελέσματα να οφείλονται σε διασταυρούμενες αντιδράσεις με άλλα βακτήρια είναι πάρα πολύ μικρή και σχετίζονται κυρίως με την ποιότητα των χρησιμοποιούμενων ορών.

Στα αποτελέσματα της μεθόδου παρατηρήθηκε και το εξής «παράδοξο» φαινόμενο. Ενώ σύμφωνα με τις τιμές βαθμονόμησης του αναλυτή, που περιλαμβάνονται στο εγχειρίδιο χρήσης του, η τιμή του αρνητικού μάρτυρα πρέπει να είναι > 60 mP, ένα δείγμα εμφάνισε τιμή 35 mP, τιμή πάρα πολύ χαμηλή, η οποία όμως παρέμεινε σταθερή σε επανειλημμένες μετρήσεις. Ίσως κάποιοι παράγοντες να παρεμπόδισαν πλήρως της δίοδο και πόλωση του φωτός, όμως οι ακριβείς λόγοι που οδήγησαν στην εμφάνιση μιας τέτοιας τιμής παραμένουν άγνωστοι. Παρά το γεγονός ότι η τιμή του δείγματος αυτού θα μπορούσε να επηρεάσει την τιμή cut-off και επομένως και την ευαισθησία και την ειδικότητα της μεθόδου και κανονικά θα έπρεπε να εξαιρεθεί από τον πληθυσμό των αρνητικών δειγμάτων, κρίθηκε αναγκαία η χρησιμοποίηση του και η αναφορά του, αφού ήταν η πρώτη φορά που παρατηρήθηκε αυτό το «παράδοξο» φαινόμενο.

3.3 Σύγκριση της εφαρμογής της FPA στον άνθρωπο και στα παραγωγικά ζώα (μηρυκαστικά – χοίρος)

Στις περισσότερες από τις μελέτες που έχουν δημοσιευτεί και αφορούν στην εφαρμογή της μεθόδου στα παραγωγικά ζώα, παρατηρείται μια αρκετά μεγάλη διαφορά ως προς τις τιμές του cut-off σε σχέση με τις αντίστοιχες που παρατηρήθηκαν στην παρούσα μελέτη και αφορούσαν στον άνθρωπο. Το ίδιο παρατηρείται και στις τιμές της ευαισθησίας και της ειδικότητας.

3.3.1 Διαφορά στην τιμή cut-off

Οι τιμές cut-off που αναφέρονται στη διεθνή βιβλιογραφία ανάλογα με το είδος του ζώου κυμαίνονται: για τα μικρά μηρυκαστικά από 77 – 84 mP (Nielsen K. et al 1999), έως 87 mP (Minas A. et al 2005), για την αγελάδα από 87 – 90 mP (Dajer A. et al 1999, Nielsen K. et al 1999, 2001), για το χοίρο 85 mP (Nielsen K. et al 1999) και για το βίσωνα 85 mP (Gall D. et al 2000). Παρατηρείται έτσι μια διαφορά στην τιμή cut-off σε σχέση με τις αντίστοιχες του ανθρώπου που καθορίστηκαν στην παρούσα μελέτη που κυμαίνεται από 10 – 25 mP.

Η διαφορά αυτή είναι αξιοσημείωτη και πρέπει να γίνει προσπάθεια να ερμηνευτεί. Οι παράγοντες που πιθανά δίνουν αυτή τη μεγάλη διαφορά στις τιμές cut-off μεταξύ των παραγωγικών ζώων και του ανθρώπου, ακόμη και στις μελέτες που χρησιμοποιήθηκε η ίδια διαδικασία εκτέλεσης της μεθόδου και ο ίδιος αναλυτής φθορίζουσας πόλωσης, είναι οι εξής:

1) Ρυθμιστικό διάλυμα. Το ρυθμιστικό διάλυμα (buffer) που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη είναι προσαρμοσμένο για τη χρήση ορού αίματος μηρυκαστικών, αφού δεν έχει διερευνηθεί μέχρι στιγμής και περιγραφεί για τη μέθοδο FPA αντίστοιχο διάλυμα προσαρμοσμένο στον ανθρώπινο ορό. Επομένως, είναι πιθανό ο ανθρώπινος ορός να μην είναι απολύτως συμβατός με ένα τέτοιο ρυθμιστικό διάλυμα και για το λόγο αυτό να προκύπτει η διαφορά αυτή στην τιμή cut-off.

2) Βιοχημικές παράμετροι του ορού. Η ύπαρξη μεγαλομοριακών ενώσεων στον ορό του αίματος του ανθρώπου σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις από αυτές στον ορό των ζώων θα μπορούσαν να επηρεάσουν λόγω του μεγάλου μοριακού τους μεγέθους την πόλωση των εκπεμπόμενων δεσμών φωτός κατά την πρόσκρουση τους σ' αυτές και να αυξήσουν την τιμή πόλωσης τόσο στα θετικά, όσο και στα αρνητικά δείγματα, αυξάνοντας κατά συνέπεια την τιμή του cut-off. Ειδικότερα, οι βιοχημικές παράμετροι που θα μπορούσαν να ενοχοποιηθούν για την αύξηση της τιμής πόλωσης του φωτός λόγω μεγάλου μοριακού μεγέθους είναι:

Χοληστερόλη: η συγκέντρωση της στον ορό του ανθρώπου είναι 150-300 mg/dl, ενώ στον ορό των ζώων είναι: στην αγελάδα 80-120 mg/dl, στο πρόβατο 52-76 mg/dl και στην αίγα 80-130 mg/dl.

Τριγλυκερίδια: η συγκέντρωσή τους στον άνθρωπο είναι 48,6-168 mg/dl, ενώ στην αγελάδα 13,9±0,4 mg/dl (Marcos E. et al 1990).

Ολικές πρωτεΐνες: παρά το γεγονός ότι τα επίπεδα των ολικών πρωτεϊνών είναι περίπου ίδια τόσο στον άνθρωπο (6-8 g/dl) όσο και στα ζώα (αγελάδα: 6,75-7,45 g/dl, πρόβατο: 6-7,90 g/dl και αίγα 6,40-7 mg/dl), τα επίπεδα των αλβουμινών στον ορό του ανθρώπου είναι αρκετά υψηλότερα από αυτά των ζώων (άνθρωπος 3,5-5 g/dl, αγελάδα 3-3,5 g/dl, πρόβατο 2,4-3 g/dl και αίγα 2,7-3,9 g/dl).

Επίσης η ύπαρξη κάποιων ουσιών που κατά την πρόσκρουση των δεσμών εκπεμπόμενου φωτός στο μόριο τους, θα μπορούσαν να εμφανίσουν φαινόμενα φθορισμού και που η συγκέντρωσή τους στον ορό του ανθρώπου είναι υψηλότερη από αυτή των ζώων, είναι πιθανό να αυξάνουν την τιμή πόλωσης των θετικών και των αρνητικών δειγμάτων και να επηρεάσουν έτσι προς υψηλότερες τιμές το cut-off της μεθόδου. Τέτοια ουσία που θα μπορούσε λόγω χρωστικών που περιέχονται στο μόριο της να προκαλέσει φθορισμό είναι η χολερυθρίνη, η οποία κατά τη σύνδεση της με την αλβουμίνη του ορού δίνει ένα μεγαλομόριο με υψηλή τιμή πόλωσης (Jolley M. 2007, προσωπική επικοινωνία)

Χολερυθρίνη: η συγκέντρωσή της στον άνθρωπο είναι 0,2-1 mg/dl, ενώ στα ζώα είναι: στην αγελάδα 0,01-0,47 mg/dl, στο πρόβατο 0,1-0,4 mg/dl και στην αίγα 0-0,1 mg/dl.

3.3.2 Διαφορά στην ευαισθησία της FPA

Όπως προαναφέρθηκε, στις περισσότερες από τις μελέτες για την εφαρμογή της FPA στα παραγωγικά ζώα, εμφανίζονται τιμές ευαισθησίας υψηλότερες από αυτές που καθορίστηκαν στην παρούσα μελέτη για τον άνθρωπο. Με δεδομένο ότι η συγκεκριμένη μέθοδος είναι μη ειδική του είδους, είναι πιθανόν κάποιοι παράγοντες να επηρεάζουν την εφαρμογή της μεθόδου στον άνθρωπο, μειώνοντας την ευαισθησία της μεθόδου. Οι παράγοντες που πιθανά επηρεάζουν την ευαισθησία της FPA στα ζώα και στον άνθρωπο είναι οι εξής:

1) Φυσική πορεία της νόσου στα ζώα: Η βρουκέλλωση είναι μια νόσος η οποία στα ζώα δεν έχει την ίδια κλινική με οξεία συμπτώματα εικόνα, όπως στον άνθρωπο. Το σπουδαιότερο και συχνότερο κλινικό σύμπτωμα που παρατηρείται είναι οι αποβολές, ιδιαίτερα κατά την πρώτη εγκυμοσύνη μετά από τη μόλυνση. Δεν παρατηρούνται ή υποεκτιμώνται τα μη ειδικά συμπτώματα (πυρετός, κακουχία, κατάπτωση, ανορεξία κλπ) που παρατηρούνται στον άνθρωπο. Επίσης είναι μία νόσος, η οποία διαγιγνώσκεται μόνο μετά από τυχαίες και δειγματοληπτικές αιμοληψίες σε κοπάδια αιγοπροβάτων ή σε εκτροφές βοοειδών. Αυτό έχει ως συνέπεια η νόσος στα ζώα να ακολουθεί τη φυσική της πορεία και εξέλιξη. Επομένως, τα ασθενή ή μολυσμένα ζώα παραμένουν για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα ασθενή και ο τίτλος των αντισωμάτων τους για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα σε υψηλότερα επίπεδα, γεγονός που καθιστά πιο εύκολη την ορολογική διάγνωση της νόσου, αυξάνοντας κατά συνέπεια την ευαισθησία των ορολογικών μεθόδων, συμπεριλαμβανομένης και της FPA.

2) Φαρμακευτική αγωγή: Ένας άλλος σημαντικός παράγοντας είναι η φαρμακευτική αγωγή, η οποία εφαρμόζεται στον άνθρωπο αμέσως μετά ή πολλές φορές σε υποψία της νόσου, ακόμη και πριν την εργαστηριακή οριστική διάγνωση της. Αυτό έχει ως

συνέπεια ο τίτλος των αντισωμάτων να μειώνεται γρήγορα ή πολλές φορές να παραμένει σε πολύ χαμηλά επίπεδα από την αρχή και να είναι πιο δύσκολο να ανιχνευτεί με τις ορολογικές μεθόδους, με άμεση συνέπεια τη μείωση της ευαισθησίας των ορολογικών μεθόδων παρά το γεγονός ότι ο ασθενής δεν έχει πλήρως ιαθεί.

3) Δεσμευτικά ή ατελή αντισώματα: Ο Griffiths το 1947 ανέφερε πρώτος την ύπαρξη ενός παράγοντα στον ορό του αίματος κάποιων ασθενών, ο οποίος παρεμποδίζει τη σύνδεση των βρουκελλικών αντιγόνων με τις IgG1 και IgG2 ανοσοσφαιρίνες. Στην περίπτωση αυτή η σύνδεση είναι ατελής και το αντιγόνο δεν ανιχνεύεται με τις ορολογικές μεθόδους (Young EJ. 1991). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, ο ασθενής παρά το ότι πάσχει από τη νόσο, να είναι ψευδώς αρνητικός στις ορολογικές εξετάσεις, με συνέπεια τη μείωση της ευαισθησίας των ορολογικών μεθόδων συμπεριλαμβανομένης και της FPA.

3.3.3 Διαφορά στην ειδικότητα της FPA

Ομοίως με την ευαισθησία και η ειδικότητα της μεθόδου στις περισσότερες μελέτες στα ζώα εμφανίζει τιμές υψηλότερες από αυτές του ανθρώπου. Οι πιθανοί παράγοντες που μπορεί να επηρεάζουν την εφαρμογή της μεθόδου στον άνθρωπο και να δίνουν χαμηλότερες τιμές ειδικότητας είναι:

1) Διασταυρούμενες αντιδράσεις με άλλα βακτήρια: Έχει προαναφερθεί ότι η βρουκέλλα δίνει διασταυρούμενες αντιδράσεις με άλλα βακτήρια που εμφανίζουν αντιγονική συγγένεια, κυρίως την E.coli O:157, την Salmonella και την Y.enterocolitica O:9. Έτσι είναι πιθανό ασθενείς που νοσούν από τα παραπάνω νοσήματα ή έχουν τίτλο αντισωμάτων έναντι των βακτηρίων αυτών, να εμφανίζονται θετικοί στη βρουκέλλωση (ψευδώς θετικοί) με συνέπεια τη μείωση της ειδικότητας της FPA.

2) Παραμονή των αντισωμάτων για μεγάλο χρονικό διάστημα: Πολλές φορές παρατηρείται το φαινόμενο, ασθενείς που έπασχαν στο παρελθόν από τη νόσο, μετά την επιτυχή θεραπευτική αγωγή και την πλήρη ίαση, να εμφανίζουν ανιχνεύσιμο τίτλο αντισωμάτων για μεγάλο χρονικό διάστημα (έως και πολλά χρόνια μετά την πλήρη ίαση). Οι ασθενείς αυτοί εμφανίζονται ως υγιείς, ιδιαίτερα αν μεσολαβήσει μεγάλο χρονικό διάστημα από τη νόσο, και επομένως εσφαλμένα ως ψευδώς θετικοί στην βρουκέλλωση, μειώνοντας όμως το ποσοστό ειδικότητας της μεθόδου. Αυτό θα μπορούσε να παρατηρηθεί σε ασθενείς μεγάλης ηλικίας, οι οποίοι νόσησαν πριν από μεγάλο χρονικό διάστημα και δίνουν ψευδές ιστορικό (δε θυμούνται ότι νόσησαν) ή, παρά το ότι νόσησαν στο παρελθόν ή ήρθαν σε επαφή με το βακτήριο (επιδημιολογική σύνδεση) δίνουν ακούσια ή εκούσια εσφαλμένο ιστορικό.

3.4 Σύγκριση της εφαρμογής της FPA στην παρούσα μελέτη και στην προϋπάρχουσα της Lucero N. et al (2003).

Όπως προαναφέρθηκε, μόνο μία μελέτη υπάρχει στην παγκόσμια βιβλιογραφία, η οποία διερεύνησε της χρήση της μεθόδου FPA στη διάγνωση της βρουκέλλωσης του ανθρώπου. Η μελέτη αυτή δημοσιεύτηκε από την Lucero N. et al το 2003 και αφορά κυρίως στον καθορισμό ενός cut-off και στην εκτίμηση της ευαισθησίας και της ειδικότητας της μεθόδου. Συγκρινόμενες οι δύο μελέτες μεταξύ τους, εμφανίζουν κάποιες διαφορές, οι οποίες αναλυτικότερα εντοπίζονται στα παρακάτω σημεία:

3.4.1 Διαφορά στην τιμή cut-off

Η μελέτη της Lucero ανέδειξε ως το ιδανικότερο cut-off της μεθόδου την τιμή 72 mP, ενώ στη δική μας μελέτη η τιμή cut-off ήταν 102 mP στην Ομάδα Α και 99 mP στις Ομάδες Β και Γ. Έτσι, ενώ στην παρούσα μελέτη η διαφορά στις τιμές cut-off θεωρείται μη σημαντική ή/και αμελητέα, η διαφορά στην τιμή cut-off μεταξύ της παρούσας μελέτης και της Lucero είναι σημαντική και πρέπει να ερμηνευτεί. Οι πιθανοί παράγοντες που οδήγησαν σ' αυτήν τη μεγάλη διαφορά μεταξύ των δύο τιμών είναι οι εξής:

1) Διαφορές μεταξύ των θετικών πληθυσμών που επιλέχθηκαν

Υπάρχουν μεγάλες διαφορές μεταξύ των δύο μελετών, όσον αφορά στην επιλογή των εξεταζόμενων θετικών πληθυσμών.

α) Τοπικές συνθήκες: Με τον όρο τοπικές συνθήκες εννοούμε το αν η νόσος είναι ενδημική ή όχι στην περιοχή, από την οποία συλλέχθηκαν οι οροί ασθενών που συμμετείχαν στην αξιολόγηση της μεθόδου. Στη δική μας περίπτωση οι οροί συλλέχθηκαν από ενδημικές – αγροτικές περιοχές, στις οποίες η πιθανότητα ακόμα και υγιή κλινικά άτομα να έχουν χαμηλό τίτλο αντισωμάτων είναι υπαρκτή. Σε τέτοιους πληθυσμούς είναι πιθανό η μέθοδος να δίνει μεγαλύτερες τιμές για τα θετικά και αρνητικά δείγματα και επομένως να αυξάνει η τιμή cut-off. Στην περίπτωση της μελέτης της Lucero, δυστυχώς δεν αναφέρεται η περιοχή, από την οποία συλλέχθηκαν οι οροί που χρησιμοποιήθηκαν ως δείγματα. Ο αναγνώστης υποθέτει ότι προέρχονται από κάποια περιοχή της αμερικανικής ηπείρου, χωρίς όμως να γίνεται γνωστό ποιά είναι και αν η συγκεκριμένη περιοχή είναι ενδημική της νόσου ή όχι.

β) Διαφορετικές διατροφικές συνήθειες: Οι ασθενείς, από τους οποίους συλλέχθηκαν οι οροί σε κάθε μια από τις δύο μελέτες, προέρχονται από διαφορετικές γεωγραφικές ηπείρους, επομένως υπάρχουν μεγάλες διαφορές στις διατροφικές συνήθειες τους. Είναι γνωστό ότι στη χώρα μας υπάρχει υπερκατανάλωση κρέατος

κυρίως όσον αφορά στη συχνότητα (καθημερινή χρήση), ιδιαίτερα στις αγροτικές περιοχές, και μάλιστα κρέατος που δεν πληρεί τους όρους της λεγόμενης «υγιεινής διατροφής» (αιγοπρόβειο κρέας πλούσιο σε λιπαρά). Η συχνή ή και καθημερινή διατροφή τέτοιου είδους μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένα επίπεδα χοληστερόλης και τριγλυκεριδίων στον ορό του αίματος. Λόγω του ότι οι ουσίες αυτές είναι ως επί το πλείστον μεγάλου μοριακού βάρους, τα αυξημένα επίπεδα αυτών των βιοχημικών παραμέτρων θα μπορούσαν να επηρεάσουν τη δίοδο των δεσμών φωτός που εκπέμπει ο αναλυτής κατά τη διαδικασία μέτρησης της πόλωσης, και κατ' επέκταση να δώσει υψηλότερες τιμές πόλωσης τόσο στα θετικά όσο και στα αρνητικά δείγματα και να επηρεάσει έτσι τον καθορισμό της τιμής cut-off.

2) Διαφορετική διαδικασία εκτέλεσης της μεθόδου

Ο δεύτερος, και πιθανά ο σημαντικότερος παράγοντας στον οποίο μπορεί να οφείλεται αυτή η μεγάλη διαφορά στην τιμή cut-off μεταξύ της δικής μας μελέτης και αυτής της Lucero, είναι η τελείως διαφορετική διαδικασία εκτέλεσης της μεθόδου. Ειδικότερα οι διαφορές μεταξύ των δύο μεθόδων είναι οι εξής:

α) Ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος: Η Lucero στη μελέτη της εφάρμοσε την αρχική και παλαιότερη μέθοδο FPA, κατά τη διαδικασία εκτέλεσης της οποίας απαιτούνταν η χρήση 2 ml ρυθμιστικού διαλύματος (buffer). Αντίθετα, στη δική μας μελέτη η ποσότητα του ρυθμιστικού διαλύματος ανερχόταν σε 200 ml για τα τρία πρώτα φρεάτια της πρώτης στήλης και 180 ml για όλα τα υπόλοιπα.

β) Ατομική μέτρηση κάθε δείγματος: Στη μέθοδο FPA που χρησιμοποίησε η Lucero, η ποσότητα του ρυθμιστικού διαλύματος τοποθετούνταν σε ατομικό γυάλινο διαφανές φιαλίδιο και η μέτρηση του κάθε δείγματος γινόταν ξεχωριστά. Εδώ πρέπει να τονιστεί ότι αναγκαία προϋπόθεση για την ακρίβεια της μέτρησης σε αυτή την εκτέλεση της μεθόδου είναι η απόλυτη καθαρότητα των τοιχωμάτων του φιαλιδίου. Η ύπαρξη οποιασδήποτε μικροχαραγής, ακαθαρσίας ή σκόνης στην εξωτερική ή εσωτερική επιφάνεια του τοιχώματος του φιαλιδίου ή η άμεση επαφή του τοιχώματος του φιαλιδίου με τα δάκτυλα του εκτελούντα τη μέτρηση (ιδρώτας, λιπαρότητα δέρματος κλπ) μπορεί να επηρεάσει τη δίοδο των δεσμών φωτός και να αλλοιώσει το αποτέλεσμα της μέτρησης. Έτσι, πριν τη χρήση του το φιαλίδιο πρέπει να καθαρίζεται σχολαστικά, να συγκρατείται και να τοποθετείται στον αναλυτή με τη βοήθεια μαλακού υφάσματος. Αντίθετα, στη δική μας μέθοδο η τοποθέτηση του ρυθμιστικού διαλύματος γινόταν σε κάθε φρεάτιο μαύρης αδιαφανούς πλάκας 96 φρεατίων χωρίς τον κίνδυνο να αλλοιωθεί το αποτέλεσμα της μέτρησης λόγω ρυπαρότητας του τοιχώματος της πλάκας.

γ) Διαφορετικός αναλυτής: Ο αναλυτής πόλωσης του φθορίζοντος φωτός που χρησιμοποιήθηκε σε κάθε μια από τις δύο μεθόδους ήταν διαφορετικός. Η Lucero

χρησιμοποίησε τον παλαιό αναλυτή φθορίζουσας πόλωσης FPM-1 - Jolley Consulting and Research, ενώ στη δική μας μελέτη χρησιμοποιήθηκε ο αναλυτής πολλαπλών λειτουργιών Tecan Genios Pro ρυθμισμένος στη λειτουργία φθορίζουσας πόλωσης, που είναι και ο πιο σύγχρονος και βελτιωμένος αναλυτής που έχει κατασκευαστεί μέχρι στιγμής. Επίσης πρέπει να τονιστεί ότι, αφού πρόκειται για αναλυτές διαφορετικών εμπορικών εταιρειών είναι πιθανό να είναι διαφορετική ακόμη και η διαδικασία βαθμονόμησης του αναλυτή. Στη μελέτη της Lucero δεν αναφέρονται οι παράμετροι ρύθμισης και η διαδικασία βαθμονόμησης καθώς επίσης και οι αποδεκτές τιμές του ρυθμιστικού διαλύματος και του θετικού και αρνητικού μάρτυρα.

δ) Διαφορετική θερμοκρασία: Η εσωτερική θερμοκρασία του θαλάμου του αναλυτή στη μέθοδο της Lucero ήταν ρυθμισμένη στους 37⁰C, ενώ ο θάλαμος μέτρησης του αναλυτή που χρησιμοποιήθηκε στη δική μας μελέτη είναι σταθερά ρυθμισμένος στους 22⁰C. Εδώ πρέπει να τονιστεί ότι κατά την εκτέλεση της μεθόδου FPA ένας από τους καθοριστικότερους παράγοντες είναι η θερμοκρασία του δείγματος κατά τη διαδικασία της μέτρησης. Η ιδανικότερη και πιο αντιπροσωπευτική μέτρηση γίνεται, όταν η θερμοκρασία του προς μέτρηση δείγματος είναι ίση με τη θερμοκρασία δωματίου (22 ± 4⁰C) και έχει αποδειχθεί ότι μεγάλες αποκλίσεις από τη θερμοκρασία αυτή επηρεάζουν το τελικό αποτέλεσμα της μέτρησης. Πιο συγκεκριμένα, η αύξηση της θερμοκρασίας οδηγεί σε μείωση της τιμής πόλωσης, ενώ η μείωσή της σε αύξηση της τιμής πόλωσης (Minas A. et al 2007). Και μόνο η διαφορά αυτή των 15⁰C κατά τη διαδικασία της μέτρησης των δειγμάτων μεταξύ των δύο μελετών θα μπορούσε να δικαιολογήσει το χαμηλότερο cut-off που υπολογίστηκε και χρησιμοποιήθηκε από την Lucero, αφού λόγω της υψηλότερης θερμοκρασίας κατά τη μέτρηση οι τιμές της φθορίζουσας πόλωσης του φωτός ήταν χαμηλότερες από αυτές της παρούσας μελέτης.

3.4.2 Διαφορά στην ευαισθησία της FPA

Η Lucero αναφέρει στη μελέτη της μια τιμή ευαισθησίας 96,1%, ενώ στην παρούσα μελέτη οι τιμές της ευαισθησίας είναι 91,2% για την Ομάδα Α, 93,5% για την Ομάδα Β και 89,7% για την Ομάδα Γ. Η διαφορά αυτή εκ πρώτης όψεως φαίνεται να είναι σημαντική, έχει όμως σχέση με την επιλογή του πληθυσμού των θετικών δειγμάτων. Αναλυτικότερα:

1) Η Lucero, για να υπολογίσει την ευαισθησία της FPA, χρησιμοποίησε από τον πληθυσμό των θετικών (απομόνωση της βρουκέλλας από το αίμα, n=76), των υπόπτων (ασθενείς θετικοί σε όλες τις ορολογικές μεθόδους, n=84)) και των πιθανών ασθενών (ασθενείς θετικοί τουλάχιστον σε μία ορολογική μέθοδο, n=87) μόνο τους 76 ασθενείς με θετική αιμοκαλλιέργεια. Όπως αναφέρεται και στη

βιβλιογραφία, οι ασθενείς, στους οποίους η αιμοκαλλιέργεια είναι θετική έχουν ήδη αναπτύξει πολύ ισχυρή ανοσολογική απάντηση με πολύ υψηλούς τίτλους αντισωμάτων, με αποτέλεσμα οι τίτλοι αυτοί να είναι ανιχνεύσιμοι ακόμα και από μεθόδους με χαμηλή ευαισθησία (Memish Z. et al 2000, Minas A. et al 2005). Επομένως η ευαισθησία που αναφέρει είναι πλασματική λόγω της συγκεκριμένης επιλογής του δείγματος των ασθενών. Αντίθετα, στην παρούσα μελέτη έγινε εκτίμηση της ευαισθησίας σε τρεις διαφορετικές ομάδες ύποπτων ασθενών, χωρίς να γίνει προσπάθεια απομόνωσης της βρουκέλλας από καλλιέργειες αίματος και αυτό, γιατί, εάν χρησιμοποιούνταν ένας τέτοιος πληθυσμός, θα είχαμε από την μια αύξηση της ευαισθησίας της μεθόδου αλλά από την άλλη μείωση της ειδικότητας της. Η επιλογή του δικού μας πληθυσμού συμμετεχόντων είναι μια εναλλακτική επιλογή πληθυσμού θετικών δειγμάτων (Greiner M. & Gardner I.A. 2000), πολύ πιο ρεαλιστική και αντιπροσωπευτική, διότι λαμβάνει υπ' όψη τους ορισμούς του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (WHO) και του Κέντρου Ελέγχου Λοιμώξεων των ΗΠΑ (CDC) για την περίπτωση βρουκέλλωσης, οι οποίοι αναφέρονται στο κεφάλαιο της Παθοφυσιολογίας.

2) Ο αριθμός των θετικών ασθενών που χρησιμοποίησε η Lucero για τον καθορισμό της ευαισθησίας της μεθόδου είναι πολύ μικρότερος ($n=76$) σε σχέση με τους δικούς μας αριθμούς συμμετεχόντων (Ομάδα Α – $n_A=147$, Ομάδα Β – $n_B=230$ και Ομάδα Γ – $n_G=271$). Επομένως στατιστικά η εκτίμηση της ευαισθησίας των δικών μας πληθυσμών είναι πολύ πιο ασφαλής.

3.4.3 Διαφορά στην ειδικότητα της FPA

Όπως συνέβη με την τιμή της ευαισθησίας, ομοίως και η τιμή της ειδικότητας που αναφέρεται στη μελέτη της Lucero εμφανίζεται υψηλότερη σε σχέση με τη δική μας. Η Lucero εκτιμά την ειδικότητα της FPA 97,9%, ενώ στην παρούσα μελέτη η ειδικότητα κυμαίνεται από 96,1-98,4%. Παρά το ότι ο πληθυσμός των υγιών μαρτύρων είναι περίπου ο ίδιος (Lucero $n=340$, δικός μας πληθυσμός – Ομάδα Μ (BN) $n_M=305$) και η διαφορά φαίνεται να μην είναι σημαντική ως ποσοστό ιδιαίτερα συγκρινόμενη με τους δικούς μας πληθυσμούς, εν τούτοις μπορεί να εξηγηθεί με βάση τη φύση του πληθυσμού που επιλέχθηκε. Ο πληθυσμός που επιλέχθηκε από την Lucero, αν και δεν αναφέρεται, προέρχεται πιθανότατα από κάποια περιοχή της Αργεντινής, χώρα στην οποία η βρουκέλλωση θεωρείται ενδημική στα ζώα (Παγκόσμιο Γραφείο Επιζωοτιών - ΟΙΕ), αλλά όχι στον άνθρωπο (WHO 2005). Αντίθετα ο δικός μας πληθυσμός υγιών μαρτύρων προέρχεται από περιοχές στις οποίες η βρουκέλλωση θεωρείται ενδημική τόσο στα ζώα όσο και στον άνθρωπο. Σε έναν τέτοιο πληθυσμό που προέρχεται από ενδημική στη νόσο περιοχή, υπάρχει η πιθανότητα κάποιο υγιές άτομο που δεν έχει νοσήσει ποτέ, ούτε εμφανίζει

επιδημιολογική σύνδεση, να έχει τίτλο αντισωμάτων ο οποίος να ανιχνεύεται από κάποιες ορολογικές μεθόδους, μειώνοντας έτσι την ειδικότητα των μεθόδων αυτών, αφού εμφανίζεται ως ψευδώς θετικός στη νόσο.

3.5 Σύγκριση όλων των ορολογικών μεθόδων μεταξύ τους

Τα αποτελέσματα όλων των μεθόδων που εφαρμόστηκαν στο πειραματικό μέρος, δηλαδή της FPA, της RBT, της SAT, της ELISA IgM, της ELISA IgG και της ELISA (είτε η IgM, είτε η IgG), συγκρίθηκαν μεταξύ τους χρησιμοποιώντας:

1) την ROC analysis, με την οποία έγινε σύγκριση των καμπυλών και των περιοχών κάτω από την καμπύλη (comparison of ROC curves) τόσο της κάθε μεθόδου με το status disease, όσο και κατά ζεύγος (pairwise comparison).

2) την Kappa statistic, με την οποία εκτιμήθηκε η συμφωνία των αποτελεσμάτων κάθε μεθόδου με το status disease κάθε πληθυσμού, όπως έχει ήδη προαναφερθεί.

3.5.1 Ομάδα Α

Στην Ομάδα Α λόγω της εξ ορισμού επιλογής των θετικών (όλες οι ορολογικές μέθοδοι με θετικό αποτέλεσμα – ευαισθησία 100%) και των αρνητικών δειγμάτων (όλες οι ορολογικές μέθοδοι με αρνητικό αποτέλεσμα – ειδικότητα 100%), με τα οποία έγινε η εκτίμηση της μεθόδου FPA, η μόνη σύγκριση ήταν αυτή των αποτελεσμάτων της μεθόδου με το status disease. Στον πληθυσμό αυτό η τιμή K ήταν 0,90 και σύμφωνα με τον Altman (1995) χαρακτηρίζεται ως πολύ καλή (very good). Η τιμή K υποδηλώνει το ποσοστό των αποτελεσμάτων της FPA που συμφωνεί (συμπίπτει) με την κατάσταση του πληθυσμού εκτίμησης, δηλαδή με το status disease (υπάρχει σύμπτωση στο 90% των αποτελεσμάτων).

3.5.2 Ομάδα Β

3.5.2.1 Ευαισθησία και ειδικότητα

Στην Ομάδα Β, η μέθοδος FPA παρουσίασε την υψηλότερη ευαισθησία (93,5%) και ακολούθησε η μέθοδος ELISA συνολικά (93%). Οι δύο αυτές μέθοδοι δεν εμφανίζουν στατιστικώς σημαντική διαφορά ως προς την ευαισθησία (95% CI: 89,5 – 96,3 και 88,9 – 96 αντίστοιχα). Τη χαμηλότερη ευαισθησία εμφάνισε η ELISA IgM (51,5%), επιβεβαιώνοντας το γεγονός ότι η συγκεκριμένη μέθοδος δεν ανιχνεύει υψηλό ποσοστό χρόνιων ασθενών, στους οποίους ο τίτλος IgM ανοσοσφαιρινών είναι χαμηλός. Αντίθετα η ELISA IgG εμφάνισε μεγαλύτερο ποσοστό ευαισθησίας (74%) σε σχέση με την Ομάδα Γ. Αν η ELISA θεωρούνταν θετική, όταν ήταν θετική είτε η IgM, είτε η IgG, τότε το ποσοστό ευαισθησίας της ανερχόταν στο 93% ποσοστό ελαφρώς χαμηλότερο από αυτό που αναφέρει ο AL Dahouk S. et al (2003) και η SAT ήταν η μέθοδος με τη χαμηλότερη ευαισθησία. Στον συγκεκριμένο πληθυσμό και οι υπόλοιπες μέθοδοι εμφάνισαν υψηλότερες ευαισθησίες σε σχέση με αυτές της Ομάδας Γ (SAT: 81,6% και RBT: 89%). Κατά φθίνουσα σειρά η

ευαισθησία των μεθόδων ήταν: FPA > ELISA > RBT > SAT > ELISA IgG > ELISA IgM.

Η ειδικότητα της FPA παρέμεινε σταθερή στο 96,1%, όπως και στην Ομάδα Γ, αφού οι αρνητικοί μάρτυρες ήταν οι ίδιοι.

Αν ληφθεί τέλος υπόψη το μέγιστο άθροισμα ευαισθησίας και ειδικότητας, τότε η σειρά κατάταξης των μεθόδων ήταν: ELISA (193) > FPA (189,6) > RBT (189) > SAT (181,6) > ELISA IgG (174) > ELISA IgM (151,5).

Συμπεράσματα: Από τη μελέτη των αποτελεσμάτων στην Ομάδα Β, εξάγονται τα εξής:

1) Την υψηλότερη ευαισθησία εμφάνισε η μέθοδος FPA και αμέσως μετά η ELISA, χωρίς αυτές οι δύο μέθοδοι να διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους.

2) Στην Ομάδα Β όλες οι ορολογικές μέθοδοι που εφαρμόστηκαν, εμφάνισαν υψηλότερη ευαισθησία από την Ομάδα Γ. Αυτό σημαίνει ότι, όταν για την εργαστηριακή διάγνωση της βρουκέλλωσης χρησιμοποιήθηκε ένας πιο αυστηρός από τον Π.Ο.Υ. ορισμός της περίπτωσης βρουκέλλωσης (περισσότερες από μία θετικές ορολογικές μέθοδοι σε συνδυασμό - combined), τότε μειώθηκε το ποσοστό των ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων, αφού απομακρύνθηκε ένας αριθμός ασθενών που είχαν μόνο μία μέθοδο θετική, όπου η πιθανότητα ενός ψευδώς θετικού αποτελέσματος, όταν χρησιμοποιείται μόνο μία μέθοδος είναι μεγαλύτερη. Η παραπάνω παρατήρηση συμφωνεί και με την παγκόσμια βιβλιογραφία, όπου όλοι οι ερευνητές αναφέρουν ότι για την ασφαλέστερη εργαστηριακή διάγνωση της βρουκέλλωσης απαιτούνται περισσότερες από μία ορολογικές μέθοδοι με θετικό αποτέλεσμα.

3.5.2.2 Περιοχή κάτω από την καμπύλη – Area Under the Curve

Ο υπολογισμός της περιοχής κάτω από την καμπύλη κάθε μεθόδου στην Ομάδα Β, κατέδειξε ότι οι μέθοδοι ELISA (0,965), FPA (0,956) και RBT (0,943), παρουσιάζουν υψηλή διακριτική ικανότητα με τιμές αρκετά πάνω από 0,900 και δε διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους (95% CI: 94,6 – 97,9, 93,5 – 97,2 και 92 – 96,1 αντίστοιχα). Αντίθετα η AUC των υπολοίπων μεθόδων κυμάνθηκε σε χαμηλότερα επίπεδα (SAT 0,909, ELISA IgG 0,883 και ELISA IgM 0,767), διαφέροντας στατιστικώς σημαντικά με τις προηγούμενες τρεις. Κατά φθίνουσα σειρά η AUC όλων των μεθόδων ήταν: ELISA > FPA > RBT > SAT > ELISA IgG > ELISA IgM.

Στην κατά ζεύγος σύγκριση (pairwise comparison) των περιοχών κάτω από την καμπύλη, η μέθοδος FPA φαίνεται να ταιριάζει περισσότερο με την ELISA (διαφορά των AUC: 0,009) και κατά δεύτερο λόγο με την RBT (διαφορά: 0,013), χωρίς να διαφέρει στατιστικώς σημαντικά με καμία από τις δύο. Στον ίδιο πληθυσμό

και πάλι η SAT φαίνεται να ταιριάζει με την ELISA IgG (διαφορά AUC: 0,026) με μη στατιστικώς σημαντική διαφορά, ενώ από όλες τις μεθόδους η ELISA IgM ήταν η μέθοδος που εμφάνιζε τις μεγαλύτερες διαφορές AUC συγκρινόμενη με κάθε άλλη μέθοδο, διαφέροντας στατιστικώς σημαντικά από όλες τις υπόλοιπες.

Συμπέρασμα: Στην Ομάδα Β, οι μέθοδοι με τη μεγαλύτερη περιοχή κάτω από την καμπύλη, άρα και με τη μεγαλύτερη πιθανότητα ένας θετικός ασθενής να εμφανίζει τιμή μεγαλύτερη από έναν υγιή μάρτυρα, ήταν η FPA, η ELISA και η RBT. Παρατηρείται δηλαδή ότι, όσο πλησιάζουμε στο status disease (πληθυσμός ασθενών με τουλάχιστον δύο ορολογικές μεθόδους θετικές) και άλλες μέθοδοι (συγκεκριμένα η RBT) εμφανίζουν υψηλή διακριτική ικανότητα.

3.5.2.3 Συμφωνία αποτελεσμάτων – Τιμή Κ (Inter-rater agreement – K value)

Η τιμή Κ κάθε μεθόδου στην Ομάδα Β υπολογίστηκε και τόσο ως προς το status disease, όσο και προς κάθε μία από τις υπόλοιπες μεθόδους.

Οι μέθοδοι με την υψηλότερη συμφωνία αποτελεσμάτων ως προς το status disease, ήταν η ELISA (0,94), η FPA (0,91) και η RBT (0,90). Τη μικρότερη συμφωνία αποτελεσμάτων εμφάνισε η ELISA IgM (0,57), ενώ η SAT κυμάνθηκε σε υψηλά επίπεδα (0,84) και η ELISA IgG (0,79) σε λίγο χαμηλότερα. Έτσι σύμφωνα με την κατάταξη των αποτελεσμάτων της τιμής Κ (Altman D.G. 1995), πολύ καλή κρίνεται η συμφωνία με το status disease για τις ELISA, FPA, RBT και SAT, καλή για την ELISA IgG και μέτρια για την ELISA IgM.

Κατά φθίνουσα σειρά η τιμή Κ ήταν: ELISA > FPA > RBT > SAT > ELISA IgG > ELISA IgM.

Συγκρινόμενες με την ELISA: οι μέθοδοι FPA και RBT εμφάνισαν **πολύ καλή** συμφωνία αποτελεσμάτων (τιμή Κ: 0,85 και 0,84 αντίστοιχα), ενώ η SAT **καλή** (τιμή Κ : 0,77).

Συμπέρασμα: συνοψίζοντας την ανάλυση των αποτελεσμάτων των ορολογικών μεθόδων που εφαρμόστηκαν στην Ομάδα Β, οι μέθοδοι FPA, ELISA και RBT μπορούν να χαρακτηριστούν ως οι μέθοδοι με τα καλύτερα αποτελέσματα και αυτό γιατί ήταν οι μέθοδοι που εμφάνισαν:

1. την υψηλότερη ευαισθησία,
2. το μεγαλύτερο άθροισμα ευαισθησίας και ειδικότητας,
3. τη μεγαλύτερη περιοχή κάτω από την καμπύλη,
4. τη μικρότερη διαφορά συγκρινόμενες ως ζεύγη στην περιοχή κάτω από την καμπύλη και
5. τη μεγαλύτερη συμφωνία αποτελεσμάτων με το status disease

χωρίς να εμφανίζουν στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ τους. Έτσι η ακρίβεια (accuracy) της μεθόδου FPA εκτιμάται ότι είναι ίση με αυτήν των ELISA και RBT, ενώ υπερέρχει σημαντικά από αυτήν των SAT, ELISA IgG και ELISA IgM.

3.5.3 Ομάδα Γ

3.5.3.1 Ευαισθησία και Ειδικότητα

Από όλες τις μεθόδους που εφαρμόστηκαν, η μέθοδος FPA και η μέθοδος ELISA (θετική είτε η IgM, είτε η IgG) παρουσίασαν τη μεγαλύτερη ευαισθησία. Η ευαισθησία της FPA ήταν 89,7%, ενώ της ELISA 87%. Οι δύο αυτές τιμές δεν εμφανίζουν στατιστικώς σημαντική διαφορά (95% CI: 85,4 – 93 και 82,4 – 90,8 αντίστοιχα). Από τις υπόλοιπες μεθόδους, τη χαμηλότερη ευαισθησία παρουσίασε η ELISA IgM με τιμή 46,5 %, ποσοστό που μπορεί να δικαιολογηθεί από το γεγονός ότι πολλά από τα δείγματα που συλλέχθηκαν, προέρχονταν από χρόνιους ασθενείς. Στους ασθενείς αυτούς, ο τίτλος των IgM αντισωμάτων έχει υποχωρήσει, και κατά συνέπεια αυτά δεν ανιχνεύονται από τη συγκεκριμένη μέθοδο. Αντίθετα, η ELISA IgG παρουσίασε υψηλότερη ευαισθησία 70,6%, ανιχνεύοντας πολύ μεγαλύτερο ποσοστό χρόνιων ασθενών. Η συνολική ευαισθησία της ELISA όταν η IgM και η IgG εκτιμήθηκαν παράλληλα (in parallel: είτε η μία, είτε η άλλη) αυξήθηκε στο 87%. Το ποσοστό αυτό είναι ελαφρώς χαμηλότερο από αυτά που αναφέρονται στη διεθνή βιβλιογραφία (Al Dahouk et al 2003). Η μέθοδος RBT εμφάνισε ευαισθησία 78,6%, ενώ η SAT 70,7%, ποσοστό ίσο με αυτό της ELISA IgG. Και τα δύο αυτά ποσοστά συμβαδίζουν με τις ευαισθησίες που αναφέρονται στη διεθνή βιβλιογραφία και αφορούν στην εκτίμηση των διαγνωστικών παραμέτρων των δύο προαναφερόμενων μεθόδων. Κατά φθίνουσα σειρά ποσοστού ευαισθησίας τα αποτελέσματα των ορολογικών μεθόδων ήταν: FPA (89,7) > ELISA (87) > RBT (78,6) > SAT (70,7) > ELISA IgG (70,6) > ELISA IgM (46,5).

Η ειδικότητα της FPA εκτιμήθηκε στο 96,1%, ποσοστό μικρότερο από όλες τις άλλες μεθόδους που η ειδικότητα τους ανερχόταν στο 100%, το οποίο όμως είναι πλασματικό, διότι εξ ορισμού, όπως έχει ήδη αναφερθεί, οι αρνητικοί μάρτυρες επιλέχθηκαν με βάση το αρνητικό αποτέλεσμα σε όλες τις ορολογικές μεθόδους.

Το ποσοστό της ειδικότητας της FPA κρίνεται πολύ υψηλό για μια ενδημική στη βρουκέλλωση νόσο, όπως είναι η χώρα μας, και ιδιαίτερα σε αγροτικές περιοχές όπως η Θεσσαλία και ο Νομός Θεσσαλονίκης.

Τέλος, αν ληφθεί υπ' όψη το μέγιστο άθροισμα ευαισθησίας και ειδικότητας (max sum Se + Sp), τότε κατά φθίνουσα σειρά τα αποτελέσματα των ορολογικών μεθόδων ήταν: ELISA (187) > FPA (185,8) > RBT (178,6) > SAT (170,7) > ELISA IgG (170,6) > ELISA IgM (146,5).

Συμπεράσματα: Από την εκτίμηση των αποτελεσμάτων στην Ομάδα Γ προκύπτουν τα εξής:

1) Την υψηλότερη ευαισθησία παρουσίασε και πάλι η μέθοδος FPA και αμέσως μετά η μέθοδος ELISA (συνολικά), χωρίς αυτές οι δύο να διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους. Αντίθετα τη χαμηλότερη ευαισθησία παρουσίασε η ELISA IgM με δεύτερη χαμηλότερη την ELISA IgG, η οποία δε διαφέρει σημαντικά από την SAT. Αν η ELISA εκτιμηθεί σαν ενιαία μέθοδος, τότε τη χαμηλότερη ευαισθησία παρουσίασε η SAT.

2) Με βάση τα ποσοστά ευαισθησίας που εμφάνισαν όλες οι μέθοδοι στην Ομάδα Γ, δηλαδή όταν θεωρήθηκαν ως θετικοί οι ασθενείς που εμφάνιζαν μία τουλάχιστον ορολογική μέθοδο θετική (εκτός των κλινικών συμπτωμάτων και της επιδημιολογικής σύνδεσης), καμία από τις μεθόδους δεν αποδείχθηκε αρκετή από μόνη της να θέσει με ασφάλεια την εργαστηριακή διάγνωση της νόσου. Επιβεβαιώθηκε δηλαδή και στην παρούσα μελέτη αυτό που αναφέρεται από τους περισσότερους ερευνητές, ότι η βρουκέλλωση είναι μία ιδιαίτερη νόσος με πολλά διαγνωστικά προβλήματα, που η διάγνωση της απαιτεί συνδυασμό εργαστηριακών μεθόδων.

3.5.3.2 Περιοχή κάτω από την καμπύλη – Area Under Curve

Ο υπολογισμός της περιοχής κάτω από την καμπύλη έδειξε ότι η μέθοδος FPA (0,931) και η ELISA (0,935) έχουν υψηλή δυνατότητα διάκρισης (high discriminatory ability) αφού η AUC και των δύο έχει τιμή μεγαλύτερη του 0,900, χωρίς να διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους (CI: 90,7 – 95 και 91,2 – 95,4 αντίστοιχα). Χαμηλότερες τιμές AUC εμφανίζουν οι υπόλοιπες μέθοδοι με υψηλότερη την RBT (0,893), χαμηλότερη την ELISA IgM (0,732), ενώ η SAT (0,854) και η ELISA IgG (0,855) βρίσκονται ενδιάμεσα χωρίς να διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους (CI: 82,2 – 88,2 και 82,4 – 88,3 αντίστοιχα).

Κατά φθίνουσα σειρά τα αποτελέσματα της AUC είναι: ELISA > FPA > RBT > ELISA IgG > SAT > ELISA IgM.

Η κατά ζεύγος σύγκριση (pairwise comparison) των AUC και ο υπολογισμός της διαφοράς κάτω από την καμπύλη κατέδειξε ότι η μέθοδος FPA εμφανίζει μικρή διαφορά μη στατιστικώς σημαντική μόνο με την ELISA (συνολικά), ενώ εμφανίζει στατιστικώς σημαντική διαφορά από όλες τις υπόλοιπες. Ομοίως η ELISA IgG εμφανίζει πολύ μικρή διαφορά με την RBT και την SAT και στατιστικώς σημαντική διαφορά με όλες τις υπόλοιπες. Αντιθέτως η ELISA IgM εμφανίζει στατιστικώς σημαντικές διαφορές με όλες τις υπόλοιπες μεθόδους.

Συμπέρασμα: Από όλες τις μεθόδους που εφαρμόστηκαν στην Ομάδα Γ, οι μέθοδοι που έχουν τη μεγαλύτερη περιοχή κάτω από την καμπύλη, δηλαδή οι μέθοδοι με τη μεγαλύτερη πιθανότητα ένας τυχαίος ασθενής να εμφανίζει σε αυτές τιμή μεγαλύτερη

από έναν τυχαίο υγιή μάρτυρα, είναι η ELISA συνολικά και η FPA, ενώ τη μικρότερη περιοχή εμφανίζει η ELISA IgM.

3.5.3.3 Συμφωνία αποτελεσμάτων – Τιμή K (Inter-rater agreement – K value)

Για κάθε μέθοδο υπολογίστηκε η τιμή K σε σχέση με το status disease και με κάθε μία από τις υπόλοιπες μεθόδους.

Οι μέθοδοι που έδωσαν τη μεγαλύτερη συμφωνία αποτελεσμάτων σε σχέση με το status disease ήταν και πάλι οι μέθοδοι ELISA (0,88) και FPA (0,86), χωρίς να υπάρχει στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ τους (CI: 0,84 – 0,92 και 0,82 – 0,90 αντίστοιχα). Αντίθετα τη μικρότερη συμφωνία είχε η ELISA IgM (0,48), ενώ από τις υπόλοιπες μεθόδους καλύτερη εμφανίζεται η RBT (0,80) και αμέσως μετά με την ίδια ακριβώς τιμή K, οι μέθοδοι SAT και ELISA IgG (0,72). Έτσι σύμφωνα με τον Altman (1995) η συμφωνία των αποτελεσμάτων χαρακτηρίζεται ως πολύ καλή για τις μεθόδους FPA και ELISA, καλή για τις μεθόδους RBT και ELISA IgG και μέτρια για την ELISA IgM. Κατά φθίνουσα σειρά η συμφωνία των αποτελεσμάτων κάθε μεθόδου με το status disease ήταν: ELISA > FPA > RBT > SAT = ELISA IgG > ELISA IgM.

Συγκρινόμενες και πάλι με την ELISA, όλες οι μέθοδοι εμφάνισαν καλή συμφωνία αποτελεσμάτων (τιμή K: FPA: 0,78, RBT: 0,72 και SAT: 0,66).

Συμπέρασμα: συνοψίζοντας την ανάλυση των αποτελεσμάτων των ορολογικών μεθόδων που εφαρμόστηκαν στην Ομάδα Γ, οι μέθοδοι FPA και ELISA μπορούν να χαρακτηριστούν ως οι μέθοδοι με τα καλύτερα αποτελέσματα, και αυτό γιατί ήταν οι δύο μέθοδοι που εμφάνισαν:

1. την υψηλότερη ευαισθησία,
2. το μεγαλύτερο άθροισμα ευαισθησίας και ειδικότητας,
3. τη μεγαλύτερη περιοχή κάτω από την καμπύλη,
4. τη μικρότερη διαφορά συγκρινόμενες ως ζεύγος στην περιοχή κάτω από την καμπύλη και
5. τη μεγαλύτερη συμφωνία αποτελεσμάτων με το status disease

3.6 Συμπεράσματα επί του συνόλου των αποτελεσμάτων σε όλες τις ομάδες

Εκτιμώντας και αξιολογώντας το σύνολο των αποτελεσμάτων σε όλες τις ομάδες (A, B και Γ), στις οποίες εφαρμόστηκε η μέθοδος FPA, εξάγονται τα εξής συμπεράσματα:

- 1) Η μέθοδος εμφανίζει υψηλή ευαισθησία που κυμαίνεται από 89,7 – 93,5%.

2) Εμφανίζει πολύ υψηλή ειδικότητα ακόμη και σε μία ενδημική στη βρουκέλλωση χώρα, όπως η Ελλάδα που κυμαίνεται από 96,1 – 98,4%.

3) Η περιοχή κάτω από την καμπύλη (AUC), δηλαδή η πιθανότητα ένας πραγματικά ασθενής να έχει τιμή FPA μεγαλύτερη από έναν πραγματικά υγιή είναι πολύ υψηλή, και κυμαίνεται από 0,931 – 0,98.

4) Η μέθοδος εμφανίζει πολύ υψηλή τιμή K, δηλαδή πολύ καλή συμφωνία αποτελεσμάτων με το status disease κάθε ομάδας, που κυμαίνεται από 0,86 – 0,91.

5) Εμφανίζει καλή έως πολύ καλή συμφωνία αποτελεσμάτων με την μέθοδο ELISA, χωρίς στατιστικά σημαντικές διαφορές σε όλες τις διαγνωστικές παραμέτρους και στους δύο πληθυσμούς, όπου ήταν εφικτή η σύγκριση όλων των μεθόδων μεταξύ τους.

6) Όλες οι παράμετροι της μεθόδου εμφανίζουν αύξηση των τιμών στις Ομάδες A και B, σε σχέση με την Ομάδα Γ. Το ίδιο συμβαίνει και με τις αντίστοιχες τιμές όλων των άλλων μεθόδων. Επομένως, επιβεβαιώνεται το γεγονός ότι μία ορολογική μέθοδος ποτέ δεν είναι αρκετή από μόνη της να θέσει με ασφάλεια τη διάγνωση της νόσου, ακόμη και αν συνοδεύεται από κλινική εικόνα και επιδημιολογική σύνδεση συμβατή με αυτήν της βρουκέλλωσης.

7) Τα αποτελέσματα της FPA δεν εμφανίζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους στις Ομάδες A και B, όπως το ίδιο συμβαίνει και στις αντίστοιχες τιμές της ELISA. Δεν παρατηρούνται δηλαδή διαφορές στα αποτελέσματα της μεθόδου στις ομάδες ασθενών που είχαν τουλάχιστον δύο (Ομάδα B) και όλες τις μεθόδους θετικές(Ομάδα A). Το γεγονός αυτό σημαίνει ότι, όταν για τη διάγνωση της νόσου πραγματοποιούνται τουλάχιστον δύο διαφορετικές ορολογικές μέθοδοι οι οποίες δίνουν θετικό αποτέλεσμα, τότε προσεγγίζεται με ασφάλεια το πραγματικό status disease. Συνεπώς, όταν συνυπάρχουν τα κλινικά συμπτώματα ή/και η επιδημιολογική σύνδεση, δύο θετικές ορολογικές μέθοδοι είναι αρκετές για να θέσουν με ασφάλεια τη διάγνωση της νόσου.

3.7 Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα της μεθόδου FPA

Λαμβάνοντας υπ' όψη την δική μας εμπειρία κατά τη διαδικασία εκτέλεσης της μεθόδου στο εργαστήριο, αλλά και τη διεθνή βιβλιογραφία (Minas A. et al 2005, Lucero N.E. et al 2003) η μέθοδος FPA παρουσιάζει τα εξής πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα:

Πλεονεκτήματα

- 1) Είναι μέθοδος μη ειδική του είδους (multi-species assay), δεν εξαρτάται δηλαδή από το ζωικό είδος και μπορεί να εφαρμοστεί με την ίδια ευκολία στα ζώα και στον άνθρωπο
- 2) Είναι μία μέθοδος απλή στην εφαρμογή της και δεν απαιτεί εξειδικευμένο προσωπικό
- 3) Ανήκει στην κατηγορία των ομοιογενών μεθόδων (homogenous assays) και δεν περιλαμβάνει κατά την εκτέλεση της πολλαπλά στάδια διαχωρισμού ή διαδοχικών αραιώσεων
- 4) Η όλη διαδικασία εφαρμογής της περιλαμβάνει μόνο ένα στάδιο αραιώσης (single-step dilution method)
- 5) Δεν εμφανίζει φαινόμενο προζώνης ή αντισυμπληρωματικά φαινόμενα
- 6) Είναι πολύ γρήγορη μέθοδος στην εκτέλεση της και ο χρόνος ολοκλήρωσης της δεν ξεπερνά τα πέντε λεπτά
- 7) Η εξαγωγή των αποτελεσμάτων, η ανάγνωση και η αποθήκευση τους γίνεται σε ηλεκτρονική μορφή, άρα είναι εύκολη η διατήρηση αρχείου για μεγάλο χρονικό διάστημα
- 8) Είναι μέθοδος αντικειμενική, αφού την εξαγωγή των αποτελεσμάτων πραγματοποιεί αυτόματα ηλεκτρονικός υπολογιστής συνδεδεμένος με τον αναλυτή φθορίζουσας πόλωσης. Έτσι εξαλείφεται κάθε πιθανότητα υποκειμενικής εκτίμησης του αποτελέσματος από τον εκτελούντα την μέθοδο
- 9) Μπορεί να πραγματοποιηθεί σε πλάσμα, ορό ή πλήρες αίμα ακόμα και αιμολυμένο, χωρίς να επηρεάζεται η τιμή πόλωσης
- 10) Έχει χαμηλό κόστος εξέτασης ανά δείγμα (περίπου 1 ευρώ), επομένως μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην καθημερινή ρουτίνα ενός εργαστηρίου (νοσοκομειακού ή ιδιωτικού)
- 11) Δεν απαιτεί τη συγκέντρωση μεγάλου αριθμού δειγμάτων για την εκτέλεση της (ελαχιστοποίηση του κόστους εξέτασης), όπως συμβαίνει με άλλες μεθόδους
- 12) Είναι μέθοδος η οποία μπορεί μέσω της δυνατότητας αυξομείωσης της τιμής cut-off να βρει εφαρμογή σε διαφορετικές επιδημιολογικές συνθήκες, ανάλογα αν το ζητούμενο είναι η υψηλή ευαισθησία ή η υψηλή ειδικότητα.

Μειονεκτήματα

- 1) Το κόστος εξοπλισμού είναι υψηλό, αφού ο σύγχρονος αναλυτής φθορίζουσας πόλωσης που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη κοστίζει περίπου 90.000-100.000 €
- 2) Το υψηλό κόστος είναι απαγορευτικό για τη χρήση της μεθόδου σε αναπτυσσόμενες χώρες ή περιοχές του πλανήτη, όπου η βρουκέλλωση ενδημεί

- 3) Η ευαισθησία και η ειδικότητα της μεθόδου, παρά το ότι είναι υψηλές, δεν επιτρέπουν την εφαρμογή της μεθόδου ως μοναδικής στη διάγνωση της νόσου στον άνθρωπο
- 4) Λόγω της πολύ μικρής εμπειρίας εφαρμογής της στη βρουκέλλωση του ανθρώπου δεν υπάρχει διεθνές πρότυπο, πάνω στο οποίο να βασίζεται η εφαρμογή της και ακόμη περισσότερο η ερμηνεία και η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων της
- 5) Δεν έχει διερευνηθεί και αξιολογηθεί η επαναληψιμότητα της μεθόδου
- 6) Δεν υπάρχει καμία διεθνής εμπειρία όσον αφορά στη συμπεριφορά της μεθόδου σε περιπτώσεις διασταυρούμενων αντιδράσεων (cross-reactions)

3.8. Μελλοντικά πεδία έρευνας της μεθόδου

Η χρήση και κατ' επέκταση η σωστή και αντικειμενική αξιολόγηση της μεθόδου FPA στη διάγνωση της βρουκέλλωσης του ανθρώπου, βρίσκεται ακόμη σε πολύ αρχικό στάδιο. Κατά συνέπεια, υπάρχει ακόμη μεγάλο πεδίο έρευνας μέχρι την καθιέρωση της ως μεθόδου ρουτίνας στην εργαστηριακή διάγνωση της βρουκέλλωσης. Αναλυτικότερα τα πεδία στα οποία πρέπει η μέθοδος να διερευνηθεί είναι:

1) Η καθιέρωση διεθνών προτύπων (standards) που θα διέπουν την εφαρμογή της στην πράξη, αλλά κυρίως την ερμηνεία των αποτελεσμάτων της. Η δυνατότητα αυξομείωσης της τιμής cut-off να μην αποτελεί ένα συγκριτικό πλεονέκτημα σε σχέση με τις υπόλοιπες ευρέως χρησιμοποιούμενες μεθόδους, από μόνο του όμως δεν μπορεί να δώσει τα αναμενόμενα αποτελέσματα, αν δεν υπάρχουν διεθνώς αποδεκτά πρότυπα για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων της μεθόδου. Υπάρχει ο κίνδυνος ελλείψει των διεθνών αυτών προτύπων κάθε χώρα, περιοχή ή ακόμη και εργαστήριο της ίδιας περιοχής να βρίσκει ή να ερμηνεύει διαφορετικά τα αποτελέσματα της FPA.

Ένα τέτοιο πρότυπο θα ήταν π.χ. ο καθορισμός του cut-off να γίνεται όχι με βάση το μέχρι τώρα χρησιμοποιούμενο μέγιστο άθροισμα ευαισθησίας και ειδικότητας, αλλά με την πρόσθεση μιας διεθνώς αποδεκτής σταθερής τιμής στο μέσο όρο της τιμής του ρυθμιστικού διαλύματος κάθε μικροπλάκας εξέτασης. Με το δεδομένο ότι μπορεί να χρησιμοποιείται διαφορετικός αναλυτής ή η βαθμονόμηση του να διαφέρει από εργαστήριο σε εργαστήριο, η παραπάνω μέθοδος υπολογισμού του cut-off θα απομάκρυνε την διαφορετική και πολλές φορές αντικρουόμενη εκτίμηση ενός αποτελέσματος ως θετικού ή αρνητικού (Minas A. et al 2007).

Επίσης είναι επιτακτικό να πραγματοποιηθούν περισσότερες συγκριτικές μελέτες μεταξύ ενδημικών και μη ενδημικών χωρών ή ολόκληρων περιοχών του πλανήτη, ώστε να εξαχθούν τα ανάλογα συμπεράσματα για τη χρήση της μεθόδου σε διαφορετικές επιδημιολογικές συνθήκες.

2) Λόγω των μεγάλων διαφορών που υπάρχουν στην κλινική εκδήλωση της νόσου μεταξύ των ζώων και του ανθρώπου, η μέθοδος πρέπει να διερευνηθεί περισσότερο στον άνθρωπο και κυρίως στις χρόνιες ή στις εντοπισμένες μορφές της νόσου, εκεί δηλαδή που οι περισσότερες μέθοδοι δεν εμφανίζουν υψηλή ευαισθησία. Στη διεθνή βιβλιογραφία αναφέρεται ένας μεγάλος αριθμός εντοπισμένων ή σπάνιων μορφών της νόσου. Στις μορφές αυτές η μέθοδος FPA πρέπει να ερευνηθεί διεξοδικά, ώστε να εκτιμηθεί και να αξιολογηθεί η χρήση της και η δυνατότητα εφαρμογής της.

3) Η διαφορετική διατροφή μεταξύ των ζώων και του ανθρώπου αποτελεί έναν ακόμη παράγοντα που πρέπει να διερευνηθεί. Οι διαφορές μεταξύ φυτοφάγων ζώων και ανθρώπου είναι πολλές τόσο ως προς τη διαφορετική φύση των καταναλισκόμενων τροφών, όσο και ως προς τη φυσιολογία του πεπτικού συστήματος. Οι διαφορές αυτές μεταξύ των διαφορετικών ζωικών ειδών και του ανθρώπου οδηγεί σε μεγάλες διαφορές στη συγκέντρωση των διαφόρων ουσιών στο αίμα. Ακόμη και μεταξύ των κατοίκων διαφορετικών χωρών ή περιοχών υπάρχουν τόσο διαφορετικές διατροφικές συνήθειες, που η μέθοδος FPA, όπως έχει ήδη προαναφερθεί, θα μπορούσε να επηρεαστεί και να δώσει διαφορετικά αποτελέσματα (υπερβολική κατανάλωση κρέατος και άλλων τροφών που οδηγεί σε αύξηση της χοληστερόλης και των τριγλυκεριδίων του ορού).

4) Επεκτείνοντας το προηγούμενο πεδίο έρευνας, η μέθοδος πρέπει να διερευνηθεί και σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις ή νόσους που μπορεί να προκαλέσουν αύξηση των βιοχημικών παραμέτρων του ορού (υπερχοληστεριναιμία, υπερτριγλυκεριδαιμία, υπερχολερυθριναιμία) που μπορεί να επηρεάζουν το αποτέλεσμα της μεθόδου.

5) Άλλο πεδίο έρευνας είναι οι διασταυρούμενες αντιδράσεις που μπορεί να έχει η μέθοδος με άλλα βακτήρια τα οποία είναι αντιγονικά συγγενή με την βρουκέλλα. Έτσι, παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον η διερεύνηση της FPA σε ασθενείς που μολύνθηκαν από *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella* ή *E. coli* O:157, έτσι ώστε να εκτιμηθεί η ειδικότητα της και η ύπαρξη ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων για βρουκέλλωση λόγω διασταυρούμενων αντιδράσεων σε τέτοιους ασθενείς, οι οποίοι ούτως ή άλλως εμφανίζουν κλινική εικόνα συμβατή με αυτή της βρουκέλλωσης.

6) Επίσης η ειδικότητα της μεθόδου FPA πρέπει να διερευνηθεί σε ομάδες ασθενών που νοσούν από άλλη νόσο και όχι από βρουκέλλωση, παρουσιάζουν όμως συμβατή κλινική εικόνα. Οι ασθενείς αυτοί θα μπορούσαν να διερευνηθούν με τη

μέθοδο FPA, χωρίς όμως άλλο ορολογικό έλεγχο για τη νόσο. Το πρόβλημα είναι όμως ότι οι ασθενείς αυτοί δεν μπορεί να θεωρηθούν με ασφάλεια ελεύθεροι βρουκέλλωσης από την στιγμή που η καλλιέργεια αίματος έχει μικρή ευαισθησία.

7) Τέλος, περισσότερες μελέτες και έρευνες απαιτούνται για να εκτιμηθεί και η επαναληψιμότητα (reproducibility) της μεθόδου, ώστε να είναι σίγουρο ότι η μέθοδος δίνει σταθερά αποτελέσματα κάτω από διαφορετικές συνθήκες.

ΤΕΛΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Λαμβάνοντας υπόψη τα αποτελέσματα της μεθόδου σε όλες τις ομάδες που εφαρμόστηκε, τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματα της μεθόδου κατά τη διαδικασία εφαρμογής, την έλλειψη διεθνούς εμπειρίας από την εφαρμογή της μεθόδου στον άνθρωπο, αλλά και από τις ανάγκες για παραπέρα διερεύνηση και αξιολόγηση της μεθόδου, από την παρούσα μελέτη προκύπτουν τα εξής συμπεράσματα:

- 1) Η μέθοδος FPA εμφανίζεται ως μια ελπιδοφόρος και πολλά υποσχόμενη μέθοδος στην εργαστηριακή διάγνωση της βρουκέλλωσης του ανθρώπου
- 2) Η ακρίβεια της μεθόδου στην παρούσα μελέτη βρέθηκε ότι είναι ίση με αυτήν της ELISA και ανώτερη από αυτήν της SAT και της RBT. Λόγω και της μεγάλης ευκολίας που παρουσιάζει η διαδικασία εκτέλεσης της, η μέθοδος FPA μπορεί να υποκαταστήσει τις δύο τελευταίες στην εργαστηριακή διάγνωση της νόσου
- 3) Επειδή δεν έχει διερευνηθεί αρκετά και επειδή δεν έχουν καθιερωθεί διεθνή πρότυπα εκτέλεσης της μεθόδου και ερμηνείας των αποτελεσμάτων της, η FPA δεν μπορεί ακόμη να καθιερωθεί ως μοναδική μέθοδος διάγνωσης, αλλά μπορεί να εφαρμοστεί είτε παράλληλα είτε σε συνδυασμό με κάποια άλλη
- 4) Η μέθοδος FPA τουλάχιστον στο τωρινό, αρχικό στάδιο διερεύνησης της ως εργαστηριακή μέθοδος διάγνωσης, μπορεί να εφαρμοστεί σε επιδημιολογικές μελέτες και προγράμματα ελέγχου της νόσου, λόγω της υψηλής ευαισθησίας και ειδικότητας που παρουσιάζει και λόγω του χαμηλού κόστους εξέτασης ανά δείγμα
- 5) Αν η μέθοδος FPA εφαρμοστεί σε συνδυασμό με την ELISA, με την οποία εμφανίζει στατιστικά μη σημαντικές διαφορές σε όλες τις διαγνωστικές παραμέτρους, σε όλες τις ομάδες δειγμάτων, μπορεί να καλύψει ένα μεγάλο κενό στην εργαστηριακή διάγνωση της βρουκέλλωσης του ανθρώπου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η βρουκέλλωση είναι μια κλασσική και πολύ σοβαρή ζωνόσος που ενδημεί σε πολλές περιοχές του πλανήτη. Οι περιοχές με τη μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης της νόσου είναι οι μεσογειακές χώρες, οι χώρες της Αραβικής και της Ινδικής χερσονήσου, οι περισσότερες χώρες της κεντρικής Ασίας, η κεντρική Αμερική (Μεξικό) και πολλές χώρες της νότιας Αμερικής.

Η κλινική διάγνωση της βρουκέλλωσης στον άνθρωπο είναι πολύ δύσκολη, εξαιτίας των ποικίλων διαφορετικών συμπτωμάτων και σημείων που εμφανίζει, της χρονιότητας της νόσου και την ύπαρξη υποκλινικών, άτυπων ή εντοπισμένων μορφών. Επίσης εξαρτάται από το είδος της βρουκέλλας και την προηγούμενη χορήγηση αντιβιοτικών.

Η διάγνωση τίθεται με βεβαιότητα μόνο όταν η βρουκέλλα απομονωθεί μετά από καλλιέργεια αίματος, μυελού των οστών ή άλλου παθολογικού υλικού. Όμως τις περισσότερες φορές η διάγνωση της νόσου βασίζεται στο θετικό αποτέλεσμα διαφόρων ορολογικών μεθόδων. Και αυτό γιατί αφ' ενός η απομόνωση της βρουκέλλας είναι πάρα πολύ δύσκολη και απαιτεί εξειδικευμένο εργαστήριο επιπέδου III βιοασφάλειας, αφ' ετέρου εγκυμονεί κινδύνους για το εργαστηριακό προσωπικό.

Η βραδεία οροσυγκόλληση σε σωληνάρια (μέθοδος Wright, SAT) αποτελεί ακόμη και σήμερα ως μέθοδος, το χρυσό πρότυπο, με το οποίο συγκρίνονται όλες οι άλλες μέθοδοι. Εμφανίζει κάποια σοβαρά μειονεκτήματα όπως η αδυναμία χρήσης της σε μεγάλο αριθμό δειγμάτων, η χαμηλή ευαισθησία της ειδικά σε χρόνιες και εντοπισμένες μορφές της νόσου και η μεγάλη συχνότητα εμφάνισης ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων λόγω διασταυρούμενων αντιδράσεων με άλλα Gram- βακτήρια.

Η μέθοδος Rose Bengal (RBT) είναι μια γρήγορη, με χαμηλό κόστος και υψηλή ευαισθησία μέθοδος η οποία μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μέθοδος διαλογής σε ενδημικές περιοχές. Το μειονέκτημα της είναι ότι εμφανίζει σχετικά χαμηλή ειδικότητα.

Η μέθοδος ELISA αναφέρεται ως η μέθοδος με την υψηλότερη ευαισθησία και ειδικότητα και το μεγαλύτερο πλεονέκτημα της σε σχέση με τις άλλες μεθόδους είναι ότι επιτρέπει την ανίχνευση των ειδικών έναντι της νόσου IgM, IgG και IgA ανοσοσφαιρινών στον ορό του αίματος και στο E.N.Y.

Η μέθοδος της φθορίζουσας πόλωσης του φωτός (Fluorescence Polarization Assay – FPA), είναι μια μέθοδος που την τελευταία δεκαετία χρησιμοποιείται στη διάγνωση της βρουκέλλωσης των βοοειδών, των αιγοπροβάτων και του χοίρου.

Η θεωρητική αρχή της μεθόδου βασίζεται στη διέγερση ενός φθορίζοντος μορίου που βρίσκεται σε διάλυμα, όταν δέσμη επίπεδα πολωμένου φωτός προσπέσει πάνω στο μόριο αυτό. Η διέγερση του μορίου οδηγεί σε αύξηση της κινητικής ενέργειας και περιστροφή του. Κατά την διάρκεια της περιστροφής το μόριο εκπέμπει φως, η τιμή πόλωσης του οποίου μπορεί να μετρηθεί σε απόλυτο αριθμό και να εκφραστεί σε μονάδες πόλωσης (millipolarization units – mP). Η ταχύτητα περιστροφής είναι αντιστρόφως ανάλογη του μεγέθους του μορίου που διεγείρεται. Έτσι, όσο μικρότερο είναι το μοριακό μέγεθος, τόσο μεγαλύτερη είναι η ταχύτητα περιστροφής και τόσο γρηγορότερη είναι η εκπόλωση του φωτός (χαμηλή τιμή πόλωσης), ενώ όσο μεγαλύτερο είναι το μέγεθος του μορίου, τόσο μικρότερη είναι η ταχύτητα περιστροφής και τόσο πιο αργή η εκπόλωση του (υψηλή τιμή πόλωσης).

Σύμφωνα με τα παραπάνω, στον προς εξέταση ορό προστίθεται αντιγόνο έναντι της βρουκέλλας, σημασμένο με φθορίζον μόριο. Εάν ο ορός δεν περιέχει αντισώματα (αρνητικός) τότε το μέγεθος του διεγερθέντος μορίου θα παραμείνει μικρό, η ταχύτητα περιστροφής του θα είναι υψηλή και η τιμή του πολωμένου φωτός θα παραμείνει χαμηλή (γρήγορη εκπόλωση). Το αντίθετο θα συμβεί εφ' όσον ο προς εξέταση ορός είναι θετικός. Το σημασμένο αντιγόνο θα συνδεθεί με το αντίσωμα, το μέγεθος του διεγερθέντος μορίου θα αυξηθεί, η ταχύτητα περιστροφής θα είναι μικρή και η τιμή του πολωμένου φωτός θα είναι μεγάλη (καθυστέρηση της εκπόλωσης).

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να διερευνηθεί η χρήση της μεθόδου FPA στη διάγνωση της βρουκέλλωσης του ανθρώπου και να συγκριθεί η μέθοδος με τις τρεις αξιολογημένες και πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες ορολογικές μεθόδους, τις SAT, RBT και ELISA (IgM και IgG), στην Ελλάδα, η οποία θεωρείται ενδημική της νόσου τόσο στα ζώα, όσο και στον άνθρωπο.

Για το λόγο αυτό, συλλέχθηκαν 313 δείγματα αίματος από ύποπτους για βρουκέλλωση ασθενείς (κλινική εικόνα και τουλάχιστον έναν παράγοντα κινδύνου), οι οποίοι προσήλθαν την περίοδο 2002 - 2004 στα νοσοκομεία Ειδικών Παθήσεων Θεσ/νίκης και Πανεπιστημιακό Λάρισας. Η διάγνωση τέθηκε με την εργαστηριακή εξέταση των δειγμάτων. Όλα τα δείγματα εξετάστηκαν με τις SAT, RBT και ELISA (IgM & IgG). Επίσης συλλέχθηκαν 317 δείγματα υγιών ατόμων, τα οποία προσήλθαν στα ίδια νοσοκομεία, την ίδια χρονική περίοδο σαν αιμοδότες. Και τα δείγματα αυτά εξετάστηκαν επίσης με τις SAT, RBT και ELISA (IgM & IgG).

Οι 313 ύποπτοι ασθενείς χωρίστηκαν σε τρεις ομάδες, ανάλογα με τα αποτελέσματα των ορολογικών εξετάσεων στις οποίες υποβλήθηκαν:

Ομάδα Α (Θετικοί στην βρουκέλλωση, Brucellosis Positive-BP, n=147): Όλοι οι ύποπτοι ασθενείς που εμφάνιζαν κλινική εικόνα συμβατή με βρουκέλλωση, επιδημιολογική σύνδεση και θετικό αποτέλεσμα σε όλες τις μεθόδους με τις οποίες

εξετάστηκαν.

Ομάδα Β (n=230): Όλοι οι ύποπτοι ασθενείς που εμφάνιζαν κλινική εικόνα συμβατή με βρουκέλλωση, επιδημιολογική σύνδεση και θετικό αποτέλεσμα τουλάχιστον σε δύο από τις τρεις μεθόδους με τις οποίες εξετάστηκαν.

Ομάδα Γ (n=271): Όλοι οι ύποπτοι ασθενείς που εμφάνιζαν κλινική εικόνα συμβατή με βρουκέλλωση, επιδημιολογική σύνδεση και θετικό αποτέλεσμα τουλάχιστον σε μία από τις τρεις μεθόδους με τις οποίες εξετάστηκαν.

Από τους 317 υγιείς αιμοδότες, οι 305 αποτέλεσαν την ομάδα των μαρτύρων όπως περιγράφεται παρακάτω:

Ομάδα Μ (αρνητικοί στην βρουκέλλωση, Brucellosis Negative-BN, n=305): Όλοι οι υγιείς αιμοδότες που δεν είχαν ιστορικό, κλινική εικόνα και επιδημιολογική σύνδεση που να παραπέμπει έστω σε υποψία βρουκέλλωσης και αρνητικό αποτέλεσμα και στις τρεις ορολογικές μεθόδους με τις οποίες εξετάστηκαν.

Ακολούθως όλα τα δείγματα όλων των ομάδων εξετάστηκαν με τη μέθοδο FPA.

Όλα τα αποτελέσματα εισήχθησαν σε βάση δεδομένων που δημιουργήθηκε για το σκοπό αυτό στο ιατρικό στατιστικό πρόγραμμα MedCalc (έκδοση 8.0.1.0). Με το παραπάνω λογισμικό εφαρμόστηκε η στατιστική μέθοδος ROC analysis και υπολογίστηκαν όλες οι παρακάτω διαγνωστικές παράμετροι και τα 95% όρια αξιοπιστίας τους: ευαισθησία, ειδικότητα, λόγος πιθανοτήτων θετικού αποτελέσματος, λόγος πιθανοτήτων αρνητικού αποτελέσματος και περιοχή κάτω από την καμπύλη. Επίσης έγινε σύγκριση των καμπυλών όλων των μεθόδων, σύγκριση κατά ζεύγος της κάθε μιας με τις υπόλοιπες και υπολογίστηκε η τιμή K (συμφωνία αποτελεσμάτων), με τη χρήση του παραπάνω λογισμικού.

Τα αποτελέσματα σε κάθε ομάδα δειγμάτων που εξετάστηκαν ήταν τα εξής:

Ομάδα Α: ως τιμή cut-off επιλέχθηκε η τιμή των 102 mP. Η τιμή αυτή έδωσε το μέγιστο άθροισμα ευαισθησίας και ειδικότητας (189,6). Για το συγκεκριμένο cut-off η ευαισθησία της FPA υπολογίστηκε σε 91,8% και η ειδικότητα σε 98,4%. Η περιοχή κάτω από την καμπύλη υπολογίστηκε σε 0,983, ο θετικός λόγος πιθανοτήτων 55,61, ο αρνητικός λόγος πιθανοτήτων 0,09 και η τιμή K για το ζεύγος FPA-status disease 0,908 (πολύ καλή).

Ομάδα Β: η τιμή cut-off που επιλέχθηκε ήταν 99 mP, γιατί η τιμή αυτή έδωσε το μέγιστο άθροισμα ευαισθησίας και ειδικότητας (189,6). Για τη συγκεκριμένη τιμή cut-off η ευαισθησία και η ειδικότητα υπολογίστηκαν σε 93,5% και 96,1% αντίστοιχα. Η περιοχή κάτω από την καμπύλη ήταν 0,956, ο θετικός λόγος πιθανοτήτων 23,76, ο αρνητικός λόγος πιθανοτήτων 0,07 και η τιμή K για το ζεύγος FPA-status disease 0,91 (πολύ καλή).

Ομάδα Γ: η τιμή cut-off που επιλέχθηκε ήταν 99 mP, γιατί η τιμή αυτή έδωσε το μέγιστο άθροισμα ευαισθησίας και ειδικότητας (185,8). Για τη συγκεκριμένη τιμή cut-off η ευαισθησία και η ειδικότητα υπολογίστηκαν σε 89,7% και 96,1% αντίστοιχα. Η περιοχή κάτω από την καμπύλη ήταν 0,931, ο θετικός λόγος πιθανοτήτων 22,79, ο αρνητικός λόγος πιθανοτήτων 0,11 και η τιμή K για το ζεύγος FPA-status disease 0,86 (πολύ καλή).

Η κατά ζεύγος σύγκριση των καμπυλών που προέκυψαν από την ROC analysis, και ιδιαίτερα τα ζεύγη FPA-ELISA και FPA-RBT δεν ανέδειξαν καμία στατιστικώς σημαντική διαφορά ($P > 0,05$). Το αντίθετο συνέβη για το ζεύγος FPA-SAT στο οποίο η διαφορά ήταν στατιστικά σημαντική ($P < 0,05$).

Η συμφωνία αποτελεσμάτων (τιμή K) υπολογίστηκε με τη χρήση της Kappa statistic. Ο υπολογισμός της τιμής K ανέδειξε πολύ καλή συμφωνία ($K = 0,81-1$) για τα ζεύγη FPA-status disease, FPA-ELISA και FPA-RBT.

Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα, εξάγονται τα ακόλουθα συμπεράσματα: (1) η μέθοδος FPA εμφανίζει υψηλή ευαισθησία που κυμαίνεται από 89,7-93,5%. Η ευαισθησία είναι υψηλότερη στις ομάδες ασθενών που προσεγγίζουν την πραγματική νόσο, (2) η FPA εμφανίζει πολύ υψηλή ειδικότητα που κυμαίνεται από 96,1-98,4%, (3) η περιοχή κάτω από την καμπύλη είναι πολύ υψηλή και κυμαίνεται από 0,931-0,983, (4) η συμφωνία αποτελεσμάτων είναι πολύ καλή για το ζεύγος FPA-status disease (0,86-0,91), και από καλή (0,78) έως πολύ καλή (0,85) για το ζεύγος FPA-ELISA, που είναι και η μέθοδος που αναφέρεται ότι έχει την υψηλότερη ακρίβεια.

Η μέθοδος FPA εμφανίζει πολλά πλεονεκτήματα: (1) θεωρείται μέθοδος μη ειδική του είδους και μπορεί να εφαρμοστεί με την ίδια ευκολία τόσο στα ζώα, όσο και στον άνθρωπο, (2) είναι μέθοδος απλή στην εφαρμογή της και δεν απαιτεί εξειδικευμένο προσωπικό, η όλη δε διαδικασία ολοκληρώνεται σε λιγότερο από πέντε λεπτά, (3) είναι μέθοδος ομοιογενής, με μόνο ένα στάδιο αραίωσης, (4) δεν εμφανίζει φαινόμενο προζώνης ή αντισυμπληρωματικά φαινόμενα, (5) όλα τα αποτελέσματα εξάγονται και αποθηκεύονται ηλεκτρονικά, (6) είναι μέθοδος αντικειμενική, (7) μπορεί με την ίδια ακρίβεια να εφαρμοστεί σε πλήρες αίμα (αιμολυμένο ή μη), σε ορό ή πλάσμα αίματος, (8) αυξάνοντας ή ελαττώνοντας την τιμή cut-off, η μέθοδος μπορεί να εφαρμοστεί σε γεωγραφικές περιοχές με διαφορετικά επιδημιολογικά χαρακτηριστικά, και (9) το κόστος εξέτασης ανά δείγμα είναι πολύ χαμηλό και ανέρχεται περίπου σε ένα ευρώ.

Η μέθοδος εμφανίζει και κάποια μειονεκτήματα τα οποία είναι: (1) το κόστος εξοπλισμού είναι σχετικά υψηλό και κυμαίνεται περίπου στις 100.000 ευρώ, για τον λόγο αυτό δεν μπορεί εύκολα να χρησιμοποιηθεί σε αναπτυσσόμενες χώρες, όπου η

νόσος ενδημεί, (2) παρά την υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα, η μέθοδος δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί ακόμη σαν μοναδική μέθοδος διάγνωσης, (3) λόγω της ελάχιστης εμπειρίας από την εφαρμογή της, δεν έχουν καθοριστεί ακόμη διεθνή πρότυπα για τη χρήση της, (4) δεν έχει εκτιμηθεί η επαναληψιμότητα της μεθόδου και (5) δεν έχει αξιολογηθεί η ακρίβεια της μεθόδου σε διασταυρούμενες αντιδράσεις με άλλα βακτήρια.

Από τη στιγμή που η βρουκέλλωση εμφανίζει πολύ μεγάλες διαφορές ανάμεσα στον άνθρωπο και στα ζώα, είναι απαραίτητες περισσότερες έρευνες πάνω στην εφαρμογή της μεθόδου, και μάλιστα κάτω από διαφορετικές συνθήκες όπως σε ενδημικές και μη ενδημικές περιοχές, σε οξείες, χρόνιες και εντοπισμένες μορφές της νόσου και σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις που θα μπορούσαν να επηρεάσουν τον υπολογισμό της πόλωσης του φωτός. Είναι επίσης απαραίτητο να διερευνηθεί η επαναληψιμότητα της μεθόδου, όπως επίσης και η ακρίβεια της σε διασταυρούμενες αντιδράσεις.

Τα **τελικά συμπεράσματα** που εξάγονται από την παρούσα μελέτη είναι τα εξής: (1) η μέθοδος FPA φαίνεται να είναι σημαντικής αξίας για τη διάγνωση της βρουκέλλωσης στον άνθρωπο, (2) η ακρίβεια της μεθόδου είναι ίση με αυτήν της ELISA, ενώ υπερέχει σημαντικά από αυτήν της SAT και της RBT, (3) λόγω της ελάχιστης εμπειρίας δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί σα μοναδική μέθοδος διάγνωσης, (4) εξαιτίας της υψηλής ευαισθησίας και ειδικότητας που εμφανίζει, μπορεί προς το παρόν να χρησιμοποιηθεί σε διάφορες επιδημιολογικές μελέτες και προγράμματα ελέγχου της νόσου και (5) αν εφαρμοστεί σε συνδυασμό με την ELISA, μπορεί να καλύψει ένα μεγάλο κενό στην εργαστηριακή διάγνωση της βρουκέλλωσης.

EVALUATION OF FLUORESCENCE POLARIZATION ASSAY IN DIAGNOSIS OF HUMAN BRUCELLOSIS

Athanasios P. Konstantinidis
Doctoral Thesis

ABSTRACT

Brucellosis is an important zoonosis in many parts of the world. The Mediterranean basin, the Arabian Peninsula, the Indian subcontinent, most countries of Central Asia, Central (Mexico) and South America, are the areas with the highest reported incidence of brucellosis in humans.

The clinical diagnosis of human brucellosis may be very difficult due to variable clinical signs and symptoms, chronicity of the disease, occurrence of subclinical, atypical or localized infections, brucella species and previous antibiotic therapy.

The diagnosis is made with certainty when *Brucella* spp. is isolated from blood, bone-marrow or tissue cultivation. Since the primary isolation is very difficult, time consuming, requires special media and a Biosafety Level III cabin, and presents a risk for laboratory personnel, the confirmation of diagnosis in humans is based mainly on serology.

The standard tube agglutination test (SAT) still remains the basis from which all other methods are compared. The limitations of the method are that it cannot be used for large numbers of sera, is both a work and time intensive test, has low sensitivity in chronic and localized forms of the disease and often gives false positive results because of cross-reaction with other gram-negative bacteria.

The Rose Bengal test (RBT) has high sensitivity and relatively low specificity. It is quick, inexpensive and easily performed and can be used as a screening test in endemic areas.

The Brucella enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) has been reported to be highly sensitive and specific and its major advantage is the determination of specific IgG, IgM and IgA brucella antibodies in blood, serum and CSF.

Fluorescence Polarization Assay was validated for diagnosis of bovine, ovine and swine brucellosis. It measures the antibody binding to antigen directly, based on a fluorescent dye attached to a small antigen or an antibody fragment, which is excited by plane polarized light, in a specific wavelength. When the molecular size of the antigen remains unchanged (absence of antibody), the rate of rotation and consequently the light polarization also remains constant. On the other hand, when the molecular size is increased (existence of an antigen-antibody complex), its rate of rotation is reduced and the light polarization becomes high. The change of this rate can be measured by a fluorescence polarization analyzer and the result is expressed in millipolarization (mP) units.

The clinical signs and symptoms of brucellosis are usually severe and may be confused with various other diseases that require a different therapeutic approach. Therefore an easily performed, cheap and reliable test would be of great value in differentiating these disorders.

The aim of this study was the evaluation of Fluorescence Polarization Assay in diagnosis of human brucellosis and the comparison of the performance of the method with that of SAT, RBT and ELISA (IgM and IgG) in Greece where the infection is endemic both in animals and humans.

Three hundred and thirteen blood samples were collected from patients who attended the Medical School of University of Thessaly and the Hospital of Infectious Diseases in Thessaloniki during the years 2002-2004 with clinical features suggesting brucellosis and had been referred to laboratory with possible brucellosis: signs and symptoms with at least one risk factor. The confirmation of diagnosis was made by laboratory examination. All samples were examined by SAT, RBT and ELISA (IgM and IgG) tests. Three hundred and seventeen blood samples were also collected from healthy individuals who visited the same hospitals in the same period as blood donors. All these samples were also examined by SAT, RBT and ELISA (IgM and IgG) tests.

The 313 patients were classified to three different groups depending on the results of the tests performed: (1) Group A (brucellosis positive patients, n=147): all the patients with clinical signs or symptoms compatible with brucellosis, epidemiological link and positive results **to all** the tests performed, (2) Group B (n=230): all the suspected patients with clinical signs or symptoms, epidemiological link and at least **two** positive test results and (3) Group C (n=271): all the suspected patients who had clinical signs or symptoms compatible with brucellosis, epidemiological link and at least **one** positive test result.

From the 317 healthy individuals with no history of the disease, no

epidemiological link and any clinical signs or symptoms compatible with brucellosis, 305 (Group M) were classified as brucellosis negative. The 305 samples had a negative results **to all** the tests performed.

All the samples of the four groups were then examined with Fluorescence Polarization Assay.

All the results were entered in a database created in the statistical program MedCalc (version 8.0.1.0) and the following diagnostic parameters and their 95% CI were determined with the ROC analysis using the MedCalc software: Sensitivity, Specificity, LR+, LR- and AUC. The ROC curves comparison, the pairwise comparison of them and the k-value were also estimated by using the above statistical program.

The results in each of the three groups were the following:

Group A: a cut-off value of 102 mP was selected because it gave the maximum sum of sensitivity and specificity (189.6). For this cut-off value, the sensitivity and specificity were determined to be 91.8% and 98.4% respectively. The AUC was estimated at 0.983, the LR+ 55.61, the LR- 0.09 and the k value 0.908.

Group B: for a cut-off value of 99 mP which gave the maximum sum of sensitivity and specificity (189.6), the sensitivity and specificity were determined to be 93.5% and 96.1 % respectively. The AUC was estimated at 0.956, the LR+ 23.76, the LR- 0.07 and the k value was very good for the FPA-status disease (0.91).

Group C: for a cut-off value of 99 mP which gave the maximum sum of sensitivity and specificity (185.8), the sensitivity and specificity were determined to be 89.7% and 96.1 % respectively. The AUC was estimated at 0.931, the LR+ 22.79, the LR- 0.11 and the k value was very good for the FPA-status disease (0.86).

The pairwise comparison of ROC curves, in particular the comparison of FPA vs ELISA and FPA vs RBT did not reveal any significant statistic difference ($P>0.05$), as compared to FPA vs SAT ($P<0.05$).

The inter-rater agreement was estimated by using the Kappa statistic. The results of Kappa statistic as expressed by *K* value revealed a very good agreement ($K=0.81-1$) for FPA vs status disease, FPA vs ELISA and FPA vs RBT.

According to the results of this study the following conclusions are inferred: (1) FPA reveals a high sensitivity which varies from 89.7-93.5%. The sensitivity is higher in groups that approach the true status disease, (2) FPA also reveals a very high specificity which varies from 96.1-98.4%, (3) The area under the curve is very high and varies from 0,931-0,983, (4) The inter-rater agreement for FPA vs status disease is very good and varies from 0.86-0.91, as it is for FPA vs ELISA which is reported as the method with the highest accuracy.

FPA has many advantages: (1) it is a multi-species method that can be performed with the same easiness both in animals and humans, (2) it is a simple method that did not require specialized personnel, and the whole procedure is completed in less than five minutes, (3) it is a homogenous assay with only one-step dilution, (4) prozone or anticomplementary effects are not observed, (5) all the results are obtained and stored electronically and can be easily dispersed, (6) it is an objective method, (7) it can be used with the same degree of accuracy in whole blood, serum or plasma, (8) it gives the ability to be used with appropriate modifications for a particular area or epidemiological characteristics by increasing or decreasing the cut-off value and (9) the cost of the method is low, about one Euro per sample.

FPA has also some disadvantages which are: (1) the cost of the analyzer is very high, about 100.000 Euros, thus it cannot be used in developing countries in the daily routine, (2) although the sensitivity and specificity of the method is high, it cannot be used as a unique method for diagnosis of brucellosis, (3) because of the very little experience in the application of the method, there are not international standards, (4) the reproducibility of the method has not been evaluated yet and (5) the accuracy of the method has not been evaluated in cross-reactions.

Since there are many differences between animal and human disease, further studies of the assay are needed. Such studies should be performed in various different settings such as endemic and not endemic areas, acute, chronic or localized forms of the disease and bad nutritional habits or pathological situations that could have an effect to the estimation of the polarization. It is also necessary that the reproducibility of FPA be evaluated with further studies in order for FPA to be introduced as a routine test, as necessary is the study of possible cross-reactions with *Y. enterocolitica* and Salmonella group N infections.

The final conclusions of this study are: (1) FPA seems to be of significant value in diagnosis of human brucellosis, (2) the accuracy of the method is equal to ELISA's and RBT's and is a significantly superior diagnostic test to the SAT, (3) because of the little experience the method should not be used as an unique method in diagnosis of the disease, (4) because of its high sensitivity and specificity the method could be used alone in different epidemiological studies or programs for control of brucellosis, (5) if the method is used in combination with ELISA, then is of great value in diagnosis of human brucellosis.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Akcakus M., Esel D., Cetin N., Kisaarslan A.P., Kurtoglu S (2005). *Brucella melitensis* in blood cultures of two newborns due to exchange transfusion. *Turk J Pediatr*, 47(3), 272-274.
- Al Dahouk S., Tomaso H., Nockler K., Neubauer H., Frangoulidis D. (2003a). Laboratory-based Diagnosis of Brucellosis - A Review of the literature. Part I: Techniques for Direct Detection and Identification of *Brucella* spp. *Clin Lab*, 49, 487-505.
- Al Dahouk S., Tomaso H., Nockler K., Neubauer H., Frangoulidis D. (2003b). Laboratory-based Diagnosis of Brucellosis - A Review of the Literature. Part II: Serological Tests for Brucellosis. *Clin Lab*, 49, 577-589.
- Al-Attas R.A., Al-Khalifa M., Al-Qurashi A.R., Badawy M., Al-Gualy N. (2000). Evaluation of PCR, Culture and Serology for the diagnosis of Acute Human Brucellosis. *Annals of Saudi Medicine*, 20(3-4), 224-228.
- Alballa S.R. (1995). Epidemiology of human brucellosis in southern Saudi Arabia. *J Trop Med Hyg*, 98(3), 185-189.
- Almuneef M., Memish Z.A. (2003). Prevalence of *Brucella* antibodies after Acute Brucellosis. *J Chemother*, 15(2), 148-151.
- Al-Shamahy H.A., Wright S.G. (1998). Enzyme-linked immunosorbent assay for *Brucella* antigen detection in human sera. *J Med Microbiol*, 47(2), 169-172.
- Alsubaie S., Almuneef M., Alshaalan M., Balkhy H., Albanyan E., Alola S., Alotaibi B., Memish Z.A. (2005). Acute brucellosis in Saudi families: Relationship between brucella serology and clinical symptoms. *Int J Infect Dis*, 9, 218-224.
- Altman D.G. (1995). *Practical Statistics for Medical Research*. Chapman and Hall, London, United Kingdom, p 404.
- Alton G.G., Jones L.M., Pietz D.E. (1975). *Laboratory techniques in brucellosis*. 2nd ed., WHO, Geneva.
- Alton G.G., Jones L.M., Angus R.D., Verger J.M (1988). *Techniques for the Brucella Laboratory*, Institut National de la Recherche Agronomique, Paris.
- Alton G.G., Maw J., Rogerson B.A., McPherson G.G. (1975). *The serological*

diagnosis of bovine brucellosis: an evaluation of the complement fixation, serum agglutination and Rose Bengal tests. *Aust Vet J*, 51, 57-63.

Araj G.F. (1999). Human Brucellosis: A Classical Infectious Disease with Persistent Diagnostic Challenges. *Clin Lab Sci*, 12(4), 207-212.

Araj G.F., Azzam R.A. (1996). Seroprevalence of brucella antibodies among persons in high-risk occupation in Lebanon. *Epidemiol Infect*, 117(2), 281-288.

Araj G.F., Kattar M.M., Fattouh L.G., Bajakian K.O., Kobeissi A.A. (2005). Evaluation of the PANBIO Brucella Immunoglobulin G (IgG) and IgM Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for Diagnosis of Human Brucellosis. *Clin Diagn Lab Immunol*, 12(11), 1334-1335.

Araj G.F., Kaufmann A.F. (1989). Determination by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay of Immunoglobulin G (IgG), IgM and IgA to *Brucella melitensis* Major Outer Membrane Proteins and Whole Heat-Killed Antigens in Sera of Patients with Brucellosis. *J Clin Microbiol*, 27(8), 1909-1912.

Araj G.F., Lulu A.R., Mustafa M.Y., Khateeb M.I. (1986). Evaluation of ELISA in the diagnosis of acute and chronic brucellosis in human beings. *J Hyg (Lond)*, 97(3), 457-469.

Ariza J., Corredoira J., Pallares R., Viladrich P.F., Rufi G., Pujol M., Gudiol F. (1995). Characteristics of and risk factors for relapse of brucellosis in humans. *Clin Infect Dis*, 20(5), 1241-1249.

Ariza J., Gudiol F., Pallares R., Viladrich P.F., Rufi G., Corredoira J., Miravittles M.R. (1992). Treatment of Human Brucellosis with Doxycycline plus Rifampicin or Doxycycline plus Streptomycine. A randomized, Double-Blind Study. *Ann Int Med*, 117, 25-30.

Ariza J., Pellicer T., Pallares R., Foz A., Gudiol F. (1992). Specific Antibody Profile in Human Brucellosis. *Clin Infect Dis*, 14, 131-140.

Ashford D.A., Di Pietra J., Lingappa J., Woods C., Noll H., Neville B., Weyant R., Bragg S.L., Spiegel R.A., Tappero J., Perkins B.A. (2004). Adverse events in humans associated with accidental exposure to the livestock brucellosis vaccine RB51. *Vaccine*, 22(25-26), 3435-3439.

Avdikou I., Maipa V., Alamanos Y. (2005). Epidemiology of human brucellosis in a

defined area of Northwestern Greece. *Epidemiol Infect*, 133, 905-910.

Baily G.G., Krahn J.B., Drasar B.S., Stoker N.G. (1992). Detection of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* by DNA amplification. *J Trop Med Hyg*, 95, 271-275.

Baldi P.C., Araj G.F., Racaro G.C., Wallach J.C., Fossati C.A. (1999). Detection of Antibodies to *Brucella* Cytoplasmic Proteins in the Cerebrospinal Fluid of Patients with Neurobrucellosis. *Clin Diagn Lab Immunol*, 6(5), 756-759.

Baldi P.C., Miguel S.e., Fossati C.a., Wallach J.C. (1996). Serological follow-up of human brucellosis by measuring IgG antibodies to lipopolysaccharide and cytoplasmic proteins of *Brucella* species. *Clin Infect Dis.*, 22(3), 446-455.

Bang B. (1897). The etiology of epizootic abortion. *J Comp Path Therap*, 10, 125.

Bang B. (1906). Infectious abortion in cattle. *J Comp Path Therap*, 19, 191.

Bardenstein S., Mandelboim M., Ficht T.A., Baum M., Banai M. (2002). Identification of the *Brucella melitensis* Vaccine Strain Rev.1 in Animals and Humans in Israel by PCR Analysis of the PstI Site Polymorphism of Ots omp2 Gene. *J Clin Microbiol*, 40(4), 1475-1480.

Batchelor B.I., Brindle R.J., Gilks G.F., Selkon J.B. (1992). Biochemical mis-identification of *Brucella melitensis* and subsequent laboratory-acquired infections. *J Hosp Infect*, 22(2), 159-162.

Baum M., Zamir O., Bergman-Rios R., Katz E., Beider Z., Cohen A., Banai M. (1995). Comparative Evaluation of Microagglutination Test and Serum Agglutination Test as Supplementary Diagnostic Methods for Brucellosis. *J Clin Microbiol*, 33(8), 2166-2170.

Blasco J.M., Garin-Bastuji B., Marin C.M., Gerbier G., Fando J., Jimenez de Bagues M.P., Cau C. (1994). Efficacy of different Rose Bengal and complement fixation antigens for the diagnosis of *Brucella melitensis* infection in sheep and goats. *Vet Rec*, 134(16), 415-420.

Bosilkovski M., Krteva L., Dimzova M., Kondova I. (2007). Brucellosis in 418 patients from the Balkan Peninsula: exposure-related differences in clinical manifestations, laboratory results and therapy outcome. *Int J Infect Dis*, doi:10.1016/j.ijid.2006.10.002

Bouza E., Sanchez-Carillo C., Hernangomez S., Gonzalez M.J., The Spanish

Cooperative Group for the study of Laboratory-acquired Brucellosis (2005). Laboratory acquired brucellosis: a Spanish national survey. *J Hosp Infect*, 61(1), 80-83.

Bricker B.J. (2002). PCR as a diagnostic tool for brucellosis. *Vet Microbiol*, 90, 435-446.

Bruce D. (1887). Note on the discovery of a micro-organism in Malta fever. *Practitioner*, 39, 161.

Bruce D. (1889). Malta Fever. *Br Med J*, i, 1101-1107.

Buchanan T.M., Faber L.C. (1980). 2-mercaptoethanol Brucella agglutination test: usefulness for predicting recovery from brucellosis. *J Clin Microbiol*, 11, 691-693.

Buchanan T.M., Sulzer C.R., Frix M.K., Feldman R.A. (1974). Brucellosis in the United States, 1960-1972: an abattoir-associated disease, II. Diagnostic aspects. *Medicine*, 53, 415-426.

Buddle M.B. and Boyes B.W. (1953). A brucella mutant causing genital disease of sheep in New Zealand. *Aust Vet J*, 29, 145.

Burriel A.R., Christodouloupoulos G., Bisias G., Fthenakis G.C. (2004). Comparison of fluorescence polarization assay, indirect ELISA and competitive ELISA methods for diagnosis of *Brucella melitensis* - infection in small ruminants. *Small Ruminant Research*, 54, 243-247.

Buxton A., Fraser G. (1977). Brucella. In: *Animal Microbiology*, chapter 10, 1st edition, Blackwell Scientific Publications, Oxford, London, Edinburgh-Melbourne.

Carmichael L.E. (1966). Abortions in 200 beagles. *J Am Vet Med Assoc*, 149, 1126.

Carter G.R. (1979). Brucella. In: *Diagnostic Procedures in Veterinary Bacteriology and Mycology*, Chapter 9, Third edition (ed Carter G.R.), C.C. Thomas, Springfield, Illinois, U.S.A., , 76-81.

Casanas M.C., Queipo-Ortuno M.I., Rodriguez-Torres A., Orduna A., Colmenero J.D., Morata P. (2001). Specificity of a Polymerase Chain Reaction Assay of a Target Sequence on the 31-Kilodalton Brucella Antigen DNA Used to Diagnose Human Brucellosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.*, 20, 127-131.

Casao M.A., Navarro E., Solera J. (2004). Evaluation of Brucellacapt for the diagnosis of human brucellosis. *J Infect.*, 49(2), 102-108.

Casao M.A., Smits H.L., Navarro E., Solera J. (2003). Clinical utility of a dipstick assay in patients with brucellosis: correlation with the period of evolution of the disease. *Clin Microbiol Infect*, 9, 301-305.

Cascio A., Scarlata F., Giordano S., Antinori S., Colomba C., Titone L. (2003). Treatment of human brucellosis with rifampin plus minocycline. *J Chemother.*, 15(3), 248-252.

Cassataro J., Pasquevich K., Bruno L., Wallach J.C., Fossati C.A., Baldi P.C. (2004). Antibody reactivity to Omp31 from *Brucella melitensis* in human and animal infections by smooth and rough *Brucellae*. *Clin Diagn Lab Immunol*, 11(1), 111-114.

CDC: http://www.cdc.gov/epo/dphsi/print/brucellosis_current.htm (online).

Celik I., Cihangiroglu M., Denk A. (2005). In vitro susceptibility of clinical isolates of *Brucella melitensis* to fucidic acid. *J Infect Chemother*, 11, 101-103.

Cho H.J., Ingram D.G. (1972). Mechanisms of prozone formation in agglutination reaction. *Can J Microbiol*, 18, 449-456.

Cloekaert A., Grayon M., Grepinet O. (2002). Identification of *Brucella melitensis* vaccine strain Rev. 1 by PCR-RFLP based on a mutation in the *rspL* gene. *Vaccine*, 20, 2546-2550.

Cloekaert A., Verger J.M., Grayon M., Grepinet O., (1996). Polymorphism at the *dnaK* locus of *Brucella* species and identification of a *Brucella melitensis* species-specific marker. *J Med Microbiol*, 45, 200-205.

Cloekaert A., Weynants V., Godfroid L., Verger J.M., Grayon M., Zygmunt M.S. (1998). O-Polysaccharite Epitopic Heterogeneity at the Surface of *Brucella* spp. Studied by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and Flow Cytometry. *Clin Diagn Lab Immunol*, 5(6), 862-870.

Cloekaert A., Zygmunt M.S. (1992). O chain expression in the rough *Brucella melitensis* strain B115: induction of O-polysaccharide-specific monoclonal antibodies and intracellular localization by immunoelectron microscopy. *J Gen Microbiol*, 138, 1211-1219.

Colak H., Usluer G., Ozgunes I., Karagüven B., Barlas S. (1992). Comparison of the Wright, indirect Coombs and enzyme immunoassay IgG methods for the diagnosis of chronic brucellosis. *Mikrobiyol Bul.*, 26(1), 56-60.

- Colakoglu O., Taskiran B., Adnan K., Tunakan M., Buyrac Z., Unsal B., Aksoz K., Yorukoglu G. (2005). Etiological role of brucellosis in autoimmune hepatitis. *World J Gastroenterol*, 11(14), 2200-2202.
- Colmenero J.D., Reguera J.M., Martos F., Sanchez-de-Mora D., Delgado M., Causse M., Martin-Farfan A., Juarez C. (1996). Complications Associated with *Brucella melitensis* Infection: A Study of 530 Cases. *Medicine (Baltimore)*, 75(4), 195-211.
- Corbel M.J. (1997). Brucellosis: an Overview (1st International Conference on Emerging Zoonoses, Jerusalem, Israel). *Emerg Infect Dis.*, 3(2), 213-221.
- Corbel M.J. (1998). *Brucella*. In: Topley's and Wilson's Microbiology and Microbial Infections (Systematic Bacteriology), Vol 2, Chapter 35, 9th edition, (eds Balows A., Duerden B.I.), London:Arnold, , 829-852.
- Corbel M.J., Gill K.P.W., Thomas E.L. (1983). . Methods for the Identification of *Brucella*, Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, UK, , 3-65.
- Corbel M.J., MacMillan A.P. (1998). Brucellosis. In: Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections (Bacterial Infections), Vol 3, Chapter 41 9th edition, (eds Hausler Jr N.J. Sussman M.), London:Arnold, , 819-847.
- Cristano P., Paradisi F. (1982). Can cimetidine facilitate infections by oral route? (Letter). *Lancet*, I, 45.
- Dabdoob W.A., Abdulla Z.A. (2000). A panel of eight tests in the serodiagnosis and immunological evaluation of acute brucellosis. *East Med Health J*, 6(2/3), 304-312.
- Dajer A., Luna-Martinez E., Zapata D., Villegas S., Gutierrez E., Pena G., Gurria F., Nielsen K., Gall D. (1999). Evaluation of a fluorescence polarization assay for the diagnosis of bovine brucellosis in Mexico. *Prev Vet Med*, 40, 67-73.
- Dakdouk G.K., Araj G.F., Awar G.N. (2002). Buttock abscess brucellosis. *Scand J Infect Dis.*, 34(12), 934-936.
- Dandliker W.B., De Saussure V.A. (1970). Fluorescence Polarization in Immunochemistry. *Immunochemistry*, 7, 799-829.
- Daza R.M., Damaso D., Moreno M. (1981). Comparative study of different serological tests for the diagnosis of brucellosis. *Med Clin (Barc)*, 76(2), 57-60.
- De Klerk E., Anderson R. (1985). Comparative Evaluation of the Enzyme-Linked

Immunosorbent Assay in the Laboratory Diagnosis of Brucellosis. *J Clin Microbiol*, 21(3), 381-386.

De Ley J., Mannheim W., Segers P., Lievens A., Denjin M., Vanhoucke M., Gillis M. (1987). Ribosomal ribonucleic acid cistron similarities and taxonomic neighbourhood of *Brucella* and CDC Group VD. *Int J Syst Bacteriol*, 37, 35-42.

De Massis F., Di Girolamo A., Petrini A., Pizzigallo E., Giovannini A. (2005). Correlation between animal and human brucellosis in Italy during the period 1997-2002. *Clin Microbiol Infect*, 11, 632-636.

Delpino M.V., Fossati C.A., Baldi P.C. (2004). Occurrence and Potential Diagnostic Applications of Serological Cross-Reactivities between *Brucella* and Other Alpha - Proteobacteria. *Clin Diagn Lab Immunol*, 11(5), 868-873.

Dhar R., Lastimoza J.L., Hira P.R. (1988). A modified indirect fluorescent antibody test for the diagnosis of brucellosis. *Diag Microbiol Infect Dis*, 11(4), 189-194.

Diaz R., Maravi-Roma E., Rivero A. (1976). Comparison of counter-immunoelectrophoresis with other serological tests in the diagnosis of human brucellosis. *Bull Wld Hlth Org*, 53, 417-424.

Dokuzoguz B., Ergonul O., Baykam N., Esener H., Kilic S., Celikbas A., Eren S., Esen B. (2005). Characteristics of *B. melitensis* versus *B. abortus* bacteraemias. *J Infect*, 50, 41-45.

Dornand J., Gross A., Lafont V., Liautard J., Pliaro J., Liautard J.P. (2002). The innate immune response against *Brucella* in humans. *Vet Microbiol*, 90, 383-394.

El Miedany Y.M., El Gaafary M., Baddour M., Ahmed I. (2003). Human brucellosis: do we need to revise our therapeutic policy?. *J Rheumatol.*, 30(12), 2666-2672.

Elberg S.S. (1981). Editor. A guide to Diagnosis, Treatment and Prevention of Human Brucellosis, VPH/81.31 Rev. 1, WHO, Geneva.

Erdenebaatar J., Bayarsaikhan B., Yondondorj A., Watarai M., Shirahata T., Jargalsaikhan E., Kawamoto K., Makino S. (2004). Epidemiological and Serological Survey of Brucellosis in Mongolia by ELISA Using Sarcosine Extracts. *Microbiol Immunol*, 48(8), 571-577.

Ergonul O., Celikbas A., Tezeren D., Guvener E., Dokuzoguz B. (2004). Analysis of risk factors for laboratory-acquired brucella infections. *J Hosp Infect*, 56, 223-227.

Ertem M., Kurekei A.E., Aysev D., Unal E., Ikinciogullari A (2000). Brucellosis transmitted by bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant*, 26(2), 225-226.

Evans A.C. (1918). Further studies on *Bacterium abortus* and related bacteria. 11. A comparison of *Bacterium abortus* with *Bacterium bronchisepticus* and the organism which causes Malta Fever. *J Infect Dis*, 22, 580.

Evans A.C. (1927). Human infection with organisms of contagious abortion of cattle and hogs. *JAMA*, 88, 630.

Fekete A, Bantle J.A., Halling S.M., Sanborn M.R. (1990). Preliminary development of a diagnostic test for *Brucella* using polymerase chain reaction. *J Appl Bacteriol*, 69, 216-227.

Fekete A, Bantle J.A., Halling S.M., Stich W.R. (1992). Amplification fragment length polymorphism in *Brucella* strain by use of polymerase chain reaction with arbitrary primers. *J Bacteriol*, 23, 7778-7783.

Fiori P.L., Mastrandrea S., Rappelli P., Cappuccinelli P. (2000). *Brucella abortus* Infection Acquired in Microbiology Laboratories. *J Clin Microbiol*, 38(5), 2005-2006.

Flynn M.P. (1983). Human clinical bovine-type brucellosis not derived from milk. *Public Health (London)*, 97, 149-157.

Fox K.F., Fox A., Nagpal M., Steinberg P., Heroux K. (1998). Identification of *Brucella* by Ribosomal-Spacer-Region PCR and Differentiation of *Brucella canis* from other *Brucella* spp. Pathogenic for Humans by Carbohydrate Profiles. *J Clin Microbiol*, 36(11), 3217-3222.

Gad El-Rab M.O., Kambal A.M. (1998). Evaluation of a *Brucella* Immunoassay Test (ELISA) in Comparison with Bacteriological Culture and Agglutination. *J Infect*, 36, 197-201.

Gall D., Nielsen K., Forbes L., Davis D., Elzer P., Olsen S., Balsevicious S., Kelly L., Smith P., Tan S., Joly D. (2000). Validation of the Fluorescence Polarization Assay and comparison to other serological assays for the detection of serum antibodies to *Brucella abortus* in Bison. *J Wildlife Dis*, 36(3), 469-476.

Gandara B., Zheludkov M.M., Chernysheva M.I. (1994). An evaluation of the effectiveness of laboratory methods for brucellosis. *Zh Mikrobiol Epidemiol*

Immunobiol, 4, 55-58.

Gazapo E., Lahoz J.G., Subiza J.L., Baquero M., Gil J., Concha E.G. (1989). Changes in IgM and IgG Antibody Concentrations in Brucellosis Over Time: Importance for Diagnosis and Follow-Up. *J Infect Dis*, 159, 219-225.

Geyik M.F., Dikici B., Kokoglu O.F., Bosnak M., Celen M.K., Hosoglu S., Ayaz C. (2003). Therapeutic effect of spiramycin in brucellosis. *Pediatr Int.*, 45(1), 31-34.

Godfroid J., Cloeckert A., Liautard J.P., Kohler S., Fretin D., Walravens K., Garin-Bastuji B., Letesson J.J. (2005). From the discovery of the Malta fever's agent to the discovery of a marine mammal reservoir, brucellosis has continuously been a re-emerging zoonosis. *Vet Res*, 36, 313-326.

Godfroid J., Kasbohrer A. (2002). Brucellosis in the European Union and Norway at the turn of the twenty first century. *Vet Microbiol*, 90, 135-145.

Goossens H., Harcelis L., Dekeyser L., Butzier J. (1983). *Brucella melitensis*. Person-to-person transmission? (Letter). *Lancet*, 2, 773.

Greiner M., Gardner I.A. (2000). Epidemiologic issues in the validation of veterinary diagnostic tests. *Prev Vet Med*, 45, 3-22.

Greiner M., Pfeiffer D., Smith R.D. (2000). Principles and practical application of the receiver-operating characteristic analysis for diagnostic tests. *Prev Vet Med*, 45, 23-41.

Greiner M., Sohr D., Gobel P. (1995). A modified ROC analysis for the selection of cut-off values and the definition of intermediate results of serodiagnostic tests. *J Immunol Methods*, 185, 123-132.

Guihot A., Bossi P., Bricaire F. (2004). Bioterrorism with brucellosis. *Presse Med*, 31;33(2), 119-122.

Gundes S.G., Gundes H., Sarlak A., Willke A. (2005). Primary brucellar psoas abscess: presentation of a rare case of psoas abscess caused by *brucella melitensis* without any osteoarticular involvement. *Int J Clin Pract Suppl*, 147, 67-68.

Gür A., Geyik M.F., Dikici B., Nas K., Çevik R., Saraç J., Hosoglu S. (2003). Complications of Brucellosis in Different Age Groups: A Study of 283 Cases in Southeastern Anatolia of Turkey. *Yonsei Medical Journal*, 44(1), 33-44.

Hadjichristodoulou Ch., Soteriades E., Goutzianna G., Loukaidou M., Babalis T., Antoniou M., Delagramaticas J., Tselentis Y. (1999a). Surveillance of brucellosis in a rural area of Greece: Application of the Computerised Mapping Program. *Eur J Epidemiol*, 15, 283-299.

Hadjichristodoulou Ch., Papatheodorou Ch., Soteriades E., Panagakos G., Kastritis I., Goutziana G., Charvalos E., Tselentis Y. (1999b). Epidemiological study of brucellosis in eight Greek villages using a Computerized Mapping Program. *Eur J Epidemiol*, 15, 671-680.

Hagebusch O.E., Frei C.F. (1941). Undulant fever in children. *Am J Clin Pathol*, 11, 487-495.

Hall W.H., Manion R.E. (1953). Comparison of the Coomb's test with other methods for *Brucella* agglutinins in human serum. *J Clin Invest*, 32, 96-106.

Halling S.M., Tatum F.M., Bricker B.J. (1993). Sequence and characterization of an insertion sequence, IS711, from *Brucella ovis*. *Gene*, 133, 123-127.

Hatipoglu C.A., Yetkin A., Ertem G.T., Tulek N. (2004). Unusual Clinical Presentations of Brucellosis. *Scand J Infect Dis.*, 36(9), 694-697.

Hausler W.J., Moyer Jr N.P., Holcomb L.A. (1985). *Brucella*. In: *Manual of Clinical Microbiology*, Chapter 32, 4th Edition, (eds Lennette E.H., Balows A., Hausler Jr W.J., Shadomy H.J.), American Society Microbiology Press, Washington D.C., 382-386.

Heizmann W., Botzenhart K., Doller G., Schanz D., Hermann G., Fleischmann K. (1985). Brucellosis: serological methods compared. *J Hyg (Lond)*, 95(3), 639-653.

Henderson R.J., Hill D.M., Vickers A.A., Edwards J.M., Tillett H. (1976). Correlation between serological and immunofluorescence results in the investigation of brucellosis in veterinary surgeons. *J Clin Pathol*, 29, 35-38.

Herman L., De Ridder H. (1992). Identification of *Brucella* spp. by using the Polymerase Chain Reaction. *App Environ Microbiol*, 58(6), 2099-2101.

Herrero H., Beldran R., Martinez-Sancez A.M., Garcia E.J. (1989). Mediterranean Spotted Fever in Salamanca, Spain. Epidemiological study in patients and serosurvey in animal and human population. *Acta Trop*, 46, 335-350.

Hewitt W.G., Payne D.J.H. (1984). Estimation of IgG and IgM *Brucella* antibodies in

infected and non-infected persons by a radioimmune technique. *J Clin Pathol*, 37, 692-696.

Hoyer B.H., McCullough N.B. (1968). Homologues of deoxyribonucleic acids from *Brucella ovis*, canine abortion organisms and other *Brucella* species. *J Bacteriol*, 96, 1783-1790.

Hoyer B.H., McCullough N.B. (1968). Polynucleotide homologues of *Brucella* deoxyribonucleotic acids. *J Bacteriol*, 95, 444-448.

Hunter S.B., Bibb W.F., Shih C.N., Kaufman A.F., Mitchell J.R., McKinney R.M. (1986). Enzyme-Linked Immunosorbent Assay with Major Outer Membrane Proteins of *Brucella melitensis* to Measure Immune Response to *Brucella* species. *J Clin Microbiol*, 24(4), 566-572.

Hurtado Rocio (2001). Brucellosis - new and old issues regarding diagnosis and management. Lecture. Affiliated Infectious Disease Divisions. Joint Conference Fall/Winter 2000-2001. Harvard Medical School.

Jahans K.L., Foster G., Broughton E.S. (1997). The characterisation of *Brucella* strains isolated from marine mammals. *Vet Microbiol*, 57, 373-382.

Jamieson J.A., Rich G.E., Kyrkou M.R., Cargill ., Davos D.E. (1981). Outbreak of brucellosis at a South-Australian abattoir. Clinical and serological findings. *Med J Aust*, 2(11), 593-596.

Joint FAO/WHO Expert Committee ON Brucellosis (1986). . Technical Report 740, WHO, Geneva .

Jones L.M., Hendricks J.B., Berman D.T. (1963). The standardization and use of complement fixation test for the diagnosis of bovine brucellosis, with a review of the literature. *Am J Vet Res*, 24, 1143-1151.

Karapinar B., Yilmaz D., Vardar F., Demircioglu O., Aydinok Y. (2005). Unusual presentation of brucellosis in a child: acute blindness. *Acta Paediatr*, 94(3), 378-380.

Karimi A., Alborzi A., Rasooli M., Kadivar M.R., Nateghian A.R. (2003). Prevalence of antibody to *Brucella* species in butchers, slaughterers and others. *East Med Health J*, 9, Nos1/2, 1-6.

Kaufmann A.F., Fox M.D., Boyce J.M. (1980). Airborne spread of brucellosis. *Am NY Acad Sci*, 353, 105-114.

- Kaygusuz T.O., Kaygusuz I., Kilic S.S., Yalcin S., Felek S. (2005). Investigation of hearing loss in patients with acute brucellosis by standard and high-frequency audiometry. *Clin Microbiol Infect*, 11(7), 559-563.
- Kerr W.R., Coghlan J.D., Payne D.J.H., Robertson L. (1966). The Laboratory diagnosis of chronic brucellosis. *Lancet*, 11, 1181-1183.
- Kiel F.W., Khan M.Y. (1993). Brucellosis among hospital employees in Saudi Arabia. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 14, 268-272.
- Kizilkilic O., Turunc T., Yildirim T., Demiroglu Y.Z., Hurcan C., Uncu H. (2005). *J Infect*, 51, 77-80.
- Kocak I., Dundar M., Culhaci N., Unsal A. (2004). Relapse of brucellosis simulating testis tumor. *Int J Urol.*, 11(8), 683-685.
- Köse Ş., Kilic S., Ozbel Y. (2005). Identification of *Brucella* species isolated from proven brucellosis patients in Izmir, Turkey. *J Basic Microbiol*, 4, 323-327.
- Lago L.F., Diaz R. (1986). Demonstration of Antibodies against *Brucella melitensis* 16M Lipopolysaccharide and Native Hapten in Human Sera by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *J Clin Microbiol*, 24(1), 76-80.
- Laudat P., Van Der Mee-Marquet N., Loulergue J., Audurier A. (1995). Informative capacity of 8 serological tests in the diagnosis of human brucellosis. *Pathol Biol (Paris)*, 43(9), 754-759.
- Lee M.K.P., Fung K.S.C. (2005). A case of human brucellosis in Hong Kong. *Hong Kong Med J*, 11, 403-406.
- Lin J., Ficht T.A. (1995). Protein synthesis in *Brucella abortus* induced during macrophage infection. *Infect Immun*, 63, 1409-1414.
- Lopez-Merino A., Lopez-Santiago R. (1989). Immunology of brucellosis in humans. In: Monir Madkour M. (ed): *Brucellosis*. University Press, Cambridge, 244-249.
- Lubani M.M., Dudin K.I., Sharda D.C., Abu Sinna N.M., Al-Shab T., al-Refe'ai A.A., Labani S.M., Nasrallah A. (1988a). Neonatal brucellosis. *Eur J Pediatr*, 147(5), 520-522.
- Lubani M.M., Sharda D., Helin I. (1988b). Probable transmission of brucellosis from breast milk to a newborn. *Trop Geogr Med*, 40(2), 151-152.

Lucero N.E., Bolpe J.E. (1998). Buffered Plate Antigen Test as a Screening Test for Diagnosis of Human Brucellosis. *J Clin Microbiol*, 36(5), 1425-1427.

Lucero N.E., Escobar G.I., Ayala S.M., Paulo P.S., Nielsen K. (2003). Fluorescence polarization Assay for diagnosis of human brucellosis. *J Med Microbiol*, 52, 883-887.

Lucero N.E., Foglia L., Ayala S.M., Gall D., Nielsen K. (1999). Competitive Enzyme Immunoassay for Diagnosis of Human Brucellosis. *J Clin Microbiol*, 37(10), 3245-3248.

Madkour M.M. (1989). *Brucellosis*. University Press, Cambridge.

Madkour M.M. (2001). In: *Madkour's Brucellosis (Second Edition)*. Springer, London.

Mantur B.G., Mangalgi S.S. (2004). Evaluation of conventional castaneda and lysis centrifugation blood culture techniques for diagnosis of human brucellosis. *J Clin Microbiol*, 42(9), 4327-4328.

Mantur B.G., Mangalgi S.S., Mulimani B. (1996). *Brucella melitensis*: a sexually transmissible agent. *Lancet*, 347, 1763.

Marcos E. (1990). Serum apolipoproteins B and A-I and Naturally occurring fatty liver in dairy cows. *Lipids*, 25, 575-577.

Marmonier A., Sthal J.P., Micoud M., Le Noc P. (1981). Serological diagnosis of human brucellosis by means of an immunoenzymatic technique (ELISA). Comparison with four other usual reactions. *Pathol Biol (Paris)*, 29(2), 83-87.

Marrodan T., Nenova-Pliakova R., Rubio M., Ariza J., Clavijo E., Smits H.L., Diaz R. (2001). Evaluation of three methods to measure anti-*Brucella* IgM antibodies and interference of IgA in the interpretation of mercaptan-based tests. *J Med Microbiol*, 50, 663-666.

Marston J.L A. (1861). Report of fever (Malta). Great Britain Army Med Dept Rep, 486-521.

Martin-Mazuelos E., Nogales M.C., Florez C., Gomez-Mateos J.M., Lozano F., Sanchez A. (1994). Outbreak of *Brucella melitensis* among Microbiology Laboratory Workers. *J Clin Microbiol*, 32(8), 2035-2036.

Matar G.M., Khneisser I.A., Abdelnoor A.M. (1996). Rapid Laboratory Confirmation of Human Brucellosis by PCR Analysis of a Target Sequence on the 31-Kilodalton

- Brucella Antigen DNA. *J Clin Microbiol*, 34(2), 477-478.
- McDonald R., Cao T., Borschel R. (2001). Multiplexing for the detection of multiple biowarfar agents shows promise in the field. *Military Med*, 166, 237-239.
- McGiven J.A., Tucker J.D., Perrett L.L., Stack J.A., Brew S.D., McMillan A.P. (2003). Validation of FPA and cELISA for the detection of antibodies to *Brucella abortus* in cattle sera and comparison to SAT, CFT and iELISA. *J Immunol Methods*, 278, 171-178.
- Memish Z.A., Almuneef M., Mah M.W., Qassem L.A., Osoba A.o. (2002). Comparison of the *Brucella* Standard Agglutination Test with the ELISA IgG and IgM in patients with *Brucella* bacteremia. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 44, 129-132.
- Memish Z.A., Balkhy H.H. (2004). Brucellosis and international travel. *J Travel Med.*, 11(1), 49-55.
- Memish Z.A., Mah M.W., Al-Mahmoud S., Al-Shaalan M., Khan M.Y. (2000). *Brucella* Bacteremia: Clinical and Laboratory Observations in 160 Patients. *J Infect.*, 40, 59-63.
- Mercier E., Jumas-Bilak E., Allredt-Servent A., O'Callaghan D., Ramuz M. (1996). Polymorphism in *Brucella* Strains Detected by Studying Distribution of Two Short Repetitive DNA Elements. *J Clin Microbiol*, 34(5), 1299-1302.
- Mert A., as R., Tabak F., Bilir M., Yilmaz M., Kurt C., Ongoren S., Tanriverdi M., Ozturk R. (2003). The sensitivity and specificity of *Brucella* agglutination tests. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 46, 241-243.
- Minas A., Minas M., Stournara A., Tselepidis S. (2004). The "effects" of Rev-1 vaccination of sheep and goats on human brucellosis in Greece. *Prev Vet Med*, 64, 41-47.
- Minas A., Stournara A., Minas M., Papaioannou A., Krikelis V., Tselepidis S. (2005). Validation of fluorescence polarization assay (FPA) and comparison with other tests used for diagnosis of *B. melitensis* infection in sheep. *Vet Microbiol*, 111, 211-221.
- Minas A., Stournara A., Minas M., Stack J., Petridou E., Christodoulopoulos G., Krikelis V. (2007). Validation of a fluorescence polarization assay (FPA) performed in microplates and comparison with other tests used for diagnosing *B. melitensis* infection in sheep and goats. *J Immunol Methods*, 320, 94-103.

Mohler J.R. (1913). Infectious abortion of cattle. Am Rep US Brv of Animal Industry, 1913-1914.

Morata P., Queipo-Ortuno M.I., Colmenero J.D. (1998). Strategy for Optimizing DNA Amplification in a Peripheral Blood PCR Assay Used for Diagnosis of Human Brucellosis. J Clin Microbiol, 36(9), 2443-2446.

Morata P., Queipo-Ortuno M.I., Reguera J.M., Garcia-Ordonez M.A., Cardenas A., Colmenero J.D. (2003). Development and Evaluation of a PCR- Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Diagnosis of Human Brucellosis. J Clin Microbiol, 41(1), 144-148.

Morata P., Queipo-Ortuno M.I., Reguera J.M., Garcia-Ordonez M.A., Pichardo C., Colmenero J.D. (1999). Post treatment Follow-Up of Brucellosis by PCR Assay. J Clin Microbiol, 37(12), 4163-4166.

Morata P., Queipo-Ortuno M.I., Reguera J.M., Miralles F., Lopez-Gonzales J.J., Colmenero J.D. (2001). Diagnostic Yield of a PCR Assay in Focal Complications of Brucellosis. J Clin Microbiol, 39(10), 3743-3746.

Moreno E., Borowiak D., Mayer H. (1987). Brucella lipopolysaccharides and polysaccharides. AnnInst Pasteur Microbiol (Paris), 138, 102-105.

Moreno E., Pitt M.W. (1979). Purification and characterisation of smooth and rough lipopolysaccharide from Brucella abortus. J Bacteriol, 138, 361-369.

Moreno M.S., Esquerdo G.L., Gonzalez C.P., Orden V.R., Carbajosa G.S., Calvo del Olmo T., Cejudo R.D. (1992). Diagnosis of brucellosis in an endemic area. Evaluation of routine diagnostic tests. Med Clin (Barc), 98(13), 481-485.

Morgan W.J.B., MacKinnon D.J., Cullen G.A. (1969). The Rose Bengal plate agglutination test in the diagnosis of brucellosis. Vet Rec, 85, 636-641.

Moyer N.P., Evins G.M., Pigott N.E., Hudson J.D., Farshy C.E., Feely J.C., Hausler Jr W.J. (1987). Comparison of serologic screening tests for Brucellosis. J Clin Microbiol, 25(10), 1969-1972.

Moyer N.P., Holcomb L.A. (1995). Brucella. In: Manual of Clinical Microbiology, Chapter 44, Sixth Edition, (eds Murray P.R., Baron E. JO., Phaller M.A., Tenover F.C., Tenover R.H.), American Society Microbiology Press, 1325 Massachusetts Av, NW, Washington D.C., 549-555.

Mudaliar S., Bhore A., Pandit D. (2003). Detection of antibodies to *Brucella abortus* in animal handlers. *Indian J med Sci.*, 57(5), 181-186.

Namiduru M., Gungor K., Dikensoy O., Baydar I., Ekinçi E., Karaoglan I., Bekir N.a. (2003). Epidemiological, clinical and laboratory features of brucellosis: a prospective evaluation of 120 adult patients. *Int J Clin Pract.*, 57(1), 20-24.

Nasir M.S., Jolley M.E. (1999). Fluorescence Polarization: An Analytical Tool for Immunoassay and Drug Discovery. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, 2, 177-190.

Navarro E, Casao M.A., Solera J. (2004). Diagnosis of human brucellosis using PCR. *Expert Rev. Mol. Diagn.*, 4 (1), 115-123.

Navarro E., Fernandez J.A., Escribano J., Solera J. (1999). PCR Assay for Diagnosis of Human Brucellosis. *J Clin Microbiol*, 37(5), 1654-1655.

Nicoletti P. (1980). The epidemiology of bovine brucellosis. *Adv Vet Sci Comp Med*, 24, 69-98.

Nicoletti P., Muraschi T.F. (1966). Bacteriologic evaluation of serologic test procedures for the diagnosis of brucellosis in problem cattle herds. *Am J Vet Res*, 27, 689-694.

Nielsen K. (2002). Diagnosis of brucellosis by serology. *Vet Microbiol*, 90, 447-459.

Nielsen K., Gall D., Bermudez R., Renteria T., Moreno F., Corral A., Monroy O., Monge F., Smith P., Widdison J., Mardrueno M., Calderon N., Guerrero R., Tinoco R., Osuna J., Kelly W. (2002). Field Trial of the Brucellosis Fluorescence Polarization Assay. *J Immunoassay Immunochemistry*, 23(3), 307-316.

Nielsen K., Gall D., (2001a). Fluorescence Polarization Assay for the diagnosis of Brucellosis: a review. *J Immunoassay Immunochemistry*, 22(3), 183-201.

Nielsen K., Gall D., Jolley M., Leishman G., Balsevicious S., Smith P., Nicoletti P., Thomas F. (1996b). A homogenous fluorescence polarization assay for detection of antibody to *Brucella abortus*. *J Immunol Methods*, 195, 161-168.

Nielsen K., Gall D., Lin M., Massangill C., Samartino L., Perez B., Coats M., Hennager S., Dajer A., Nicoletti P., Thomas F. (1998). Diagnosis of bovine brucellosis using a homogenous fluorescence polarization assay. *Vet Immunol Immunopathol*, 66, 321-329.

Nielsen K., Gall D., Smith P., Balsevicious S., Thomas F., Tan S., Garrido F., Duran-Duran M., Biancifiori F., Davis D., Elzer P., Kenny K., Heneghan T., Simard C., Dajer a., Luna E., Samartino L. (1999a). Evaluation of the FPA for detection of ovine and caprine antibody to *Br. melitensis*, antibody to *B. abortus* in bison and application of the FPA to detection of bovine antibody in EDTA treated blood from a *B. abortus* infected herd. In: Canadian Fluorescence Polarization Report, Animal Diseases Research Institute, Canadian Food Inspection Agency, 1-6.

Nielsen K., Gall D., Smith P., Kelly W., Yeo J., Kenny K., Heneghan T., McNamara S., Maher P., O'Connor J., Walsh B., Carroll J., Rojas X., Rojas F., Perez B., Wuff O., Buffoni L., Salustio E., Grregoret R., Samartino L., Dajer A., Luna-Martinez E. (2001). Fluorescence polarization assay for the diagnosis of bovine brucellosis: adaptation to field use. *Vet Microbiol*, 80, 163-170.

Nielsen K., Gall D., Smith P., Vigliocco A., Perez B., Samartino L., Nicoletti P., Dajer A., Elzer P., Enright F. (1999b). Validation of the fluorescence polarization assay as a serological test for the presumptive diagnosis of porcine brucellosis. *Vet Microbiol*, 68, 245-253.

Nielsen K., Kelly L., Gall D., Balsevicious S., Bosse J., Kelly W., Nicoletti P. (1996). Comparison of enzyme immunoassays for the diagnosis of bovine brucellosis. *Prev Vet Med*, 26, 17-32.

Nielsen K., Smith P., Gall D., Perez B., Samartino L., Nicoletti P., Dajer A., Rojas X., Kolly W. (2001b). Validation of the fluorescence polarization assay for detection of milk antibody to *Brucella abortus*. *J Immunoassay Immunochemistry*, 22(3), 203-211.

Nielsen K., Thomas T. (1997). Validation studies and field trials of the fluorescence polarization assay for detection of bovine antibody to *brucella abortus*. USAHA Report, 1-13.

Nimri L.F. (2003). Diagnosis of recent and relapsed cases of human brucellosis by PCR assay. *BMC Infect Dis*, 3, 1-7.

Noviello S., Gallo R., Kelly M., Limberger R.J., DeAngelis K., Cain L., Wallace B., Dumas N. (2004). Laboratory-acquired brucellosis. *Emerg Infect Dis.*, 10(10), 1848-1850.

Ocon P., Reguera J.M., Morata P., Juares C., Alonso A., Colmenero J.D. (1994). Phagocytic cell function in active brucellosis. *Infect Immun*, 62(3), 910-914.

OIE (Office International des Epizoties) (2000). Bovine Brucellosis. In: Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, 4th ed, Chapter 2.3.1, Paris, 328-339.

OIE (Office International des Epizoties) (2004). Bovine Brucellosis. In: Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, 5th ed, Chapter 2.3.1, Paris, 328-339.

Olle-Goig J.E., Canela-Soler J. (1987). An Outbreak of *Brucella melitensis* Infection by Airborne Transmission among Laboratory Workers. *Am J Public Health*, 77(3), 335-338.

Orduna A., Almaraz A., Prado A., Gutierrez M.P., Garcia-Pascual A., Duenas A., Cuervo M., AbadR., Hernandez B., Lorenzo B., Bratos M.A., Torres A.R. (2000). Evaluation of an Immunocapture-Agglutination Test (Brucellacapt) for Serodiagnosis of Human Brucellosis. *J Clin Microbiol*, 38(11), 4000-4005.

Osoba A.O., Balkhy H., Memish Z. (2001). Diagnostic value of *Brucella* ELISA IgG and IgM in bacteremic patients with brucellosis. *J Chemother*, 13, 54-59.

Pappas G., Akritidis N., Bosilkovski M., Tsianos E. (2005). Brucellosis. *N Engl J Med*, 352(22), 2325-2336.

Pappas G., Panagopoulou P., Christou L., Akritidis N. (2006a). *Brucella* as a biological weapon. *Cell Mol Life Sci*, 63, 2229-2236.

Pappas G., Papadimitriou P., Akritidis N., Christou L., Tsianos E.V. (2006b). The new global map of human brucellosis. *Lancet Infect Dis*, 6, 91-99.

Park M.Y., Lee C.S., Choi Y.S., Park S.J., Lee J.S., Lee H.B. (2005). A Sporadic Outbreak of Human Brucellosis in Korea. *J Korean Med Sci*, 20, 941-946.

Patterson J.M., Deyoe B.L., Stone S.S. (1976). Identification of immunoglobulins associated with complement fixation, agglutination, and low pH buffered antigen tests for brucellosis. *Am J Vet Res*, 37, 319-324.

Polt S.S., Dismukes W.E., Flint A., Scafer J. (1982). Human brucellosis caused by *brucella canis*. *Ann Int Med*, 97, 717-719.

Probert W.S., Schrader K.N., Khuong N.Y., Bystrom S.L., Graves M.H. (2004). Real-Time Multiplex PCR Assay for Detection of *Brucella* spp., *Br. Abortus* and *Br. Melitensis*. *J Clin Microbiol*, 42(3), 1290-1293.

- Queipo-Ortuno M.I., Morata P., Ocon P., Manchado P., Colmenero J. de D. (1997). Rapid Diagnosis of Human Brucellosis by Peripheral-Blood PCR Assay. *J Clin Microbiol*, 35(11), 2927-2930.
- Redkar R., Rose S., Bricker B., DeVecchio V. (2001). Real-Time detection of *Brucella abortus*, *Brucella melitensis* and *Brucella suis*. *Molecular and Cellular Probes*, 15, 43-52.
- Richtzenhain L.J., Cortez A., Heinemann M.B. (2002). A multiplex PCR for the detection of *Brucella* spp. and *Leptospira* spp. DNA from aborted bovine fetuses. *Vet Microbiol*, 87, 139-147.
- Rijpens N.P., Jannes G., van Asbroeck M., Rossau R., Herman L.M.F. (1996). Direct detection of *Brucella* spp. In raw milk by PCR and reverse hybridization with 16S-23S rRNA spacer probes. *Appl Environ Microbiol*, 5, 1683-1688.
- Robichaud S., Libman M., Behr M., Rubin E. (2004). Prevention of laboratory-acquired brucellosis. *Clin Infect Dis.*, 38(12), E119-122.
- Romero C., Gamazo C., Pardo M., Lopez-Goni I. (1995). Specific Detection of *Brucella* DNA by PCR. *J Clin Microbiol*, 33(3), 615-617.
- Romero-Otero J., Martinez-Silva V., Pamplona-Casamayor M., Capitan-Manjon C., Piedra-Lara J., Leiva-Galvis O. (2005). Bilateral brucellosis psoas abscess: one case is related and literature review. *Actas Urol Esp*, 29(7), 704-707.
- Rose J.E., Roepke M.H. (1957). An acidified antigen for detection of nonspecific reactions in the plate-agglutination test for bovine brucellosis. *Am J Vet Res*, 18, 550-555.
- Rousban M.R.H., Gangi S.M.E., Abmadi S.A.A. (2004). Comparison of the efficacy of two months of treatment with cotrimoxazole plus doxycycline vs cotrimoxazole plus rifampicin in brucellosis. *Swiss Med Wkly*, 134, 564-568.
- Roux J. (1972). Les vaccinations dans les Bruceloses humaines et animales. *Bulletin de l'Institut Pasteur*, 70, 145-202.
- Roux J. (1979). Epidemiologie et prevention de la brucellose. *Bull Wld Hlth Org*, 57, 179-194.
- Ruben B., Band J.D., Wong P., Colville J. (1991). Person-to-person transmission of *Brucella melitensis*. *Lancet*, 337, 14-15.

Rubio Vallejo M., Del Pozo Leon J.L., Hernandez-Molina J.M., Dorronsoro Ibero I., Marrodan Ciordia T., Diaz Garcia R. (2002). Diagnosis of Human Brucellosis. Role of pH in the seroagglutination test and influence of pH on the agglutination activity of IgM, IgG and IgA antibodies.. *Enferm Infecc Microbiol Clin.*, 20(4), 144-149.

Ruiz J., Lorente I., Perez J., Simarro E., Martinez-Campos L. (1997). Diagnosis of Brucellosis by Using Blood Cultures. *J Clin Microbiol*, 35(9), 2417-2418.

Ruiz-Mesa J.D., Sanchez-Gonzalez J., Reguera J.M., Martin L., Lopez-Palmero S., Colmenero J.D. (2005). Rose Bengal test: diagnostic yield and use for the rapid diagnosis of human brucellosis in emergency departments in endemic areas. *Clin Microbiol Infect*, 11(3), 221-225.

Russell A.O., Patton C.M., Kaufmann A.F. (1978). Evaluation of the card test for diagnosis of human brucellosis. *J Clin Microbiol*, 7(5), 454-458.

Sabbaghian H. (1975). Fresh white cheese as a source of brucella infection. *Public Health (London)*, 89, 165-169.

Samartino L., Gregoret R., Gall D., Nielsen K. (1999). Fluorescence polarization assay: application to the diagnosis of bovine brucellosis in Argentina. *J Immunoassay*, 20, 115-126.

Sirmatel F., Akarsu E. (2004). A brucellosis case with subacute thyroiditis. *Mikrobiyol Bul.*, 38(1-2), 149-153.

Smits H.L., Cutler S.J. (2004). Contributions of biotechnology to the control and prevention of brucellosis in Africa. *African J Biotechnol*, 3(12), 631-636.

Sohn A., Probert W.S., Glaser C.A., Gupta N., Bollen A.W., Wong J.D., Grace E.M., McDonald W.C. (2003). Human Neurobrucellosis with Intracerebral Granuloma Caused by a Marine Mammal *Brucella* spp.. *Emerg Infect Dis.*, 9(4), 485-488.

Solera J. (2000). Treatment of Human Brucellosis. *J Med Liban.*, 48(4), 255-263.

Solera J., Geijo P., Largo J., Rodriguez-Zapata M., Gijon J., Martinez-Alfaro E., Navarro E., Macia M.A. (2004). A randomized double-blind study to access the optimal duration of doxycycline treatment for human brucellosis. *Clin Infect Dis.*, 39(12), 1776-1782.

Soloaga R., Salinas A., Poterallo M., Margari A., Suar B., Lucero N., Turcos M., Procopio A., Almuzara M. (2004). Bacteremia by *Brucella canis*. Isolation with the

Bact-Alert system. *Rev Argent Microbiol.*, 36(2), 81-84.

Solomon H.M., Jackson D. (1992). Rapid Diagnosis of *Brucella melitensis* in Blood: Some Operational Characteristics of the BACT/ALERT. *J Clin Microbiol*, 30(1), 222-224.

SOP (Specific Operating Procedures), Κτηνιατρικό Εργαστήριο Λάρισας, Εθνικό Εργαστήριο Αναφοράς Βρουκέλλας (2002).

Spink W., Hall J., Finstad J., Mallet E. (1962). Immunization with viable brucella organisms. *Bull Wild Hlth Org*, 26, 409-419.

Spink W.W., McCullough N.B., Hutchings L.M., Mingle C.K. (1954). A standardized antigen and agglutination technique for human brucellosis. Report No. 3 of the National Research Council. Committee on Public Health Aspects of Brucellosis. *Am J Clin Pathol*, 24, 496-498.

Staszkiwicz J., Lewis C.M., Colville J., Zervos M., Band J (1991). Outbreak of *Brucella melitensis* among Microbiology Laboratory Workers in a Community Hospital. *J Clin Microbiol*, 29(2), 287-290.

Stemshorn B.W., Forbes L.B., Eaglesome M.D., Nielsen K.H., Robertson F.J., Samagh B.S. (1985). A comparison of standard serological tests for the diagnosis of bovine brucellosis in Canada. *Can J Comp Med*, 49, 391-394.

Stoener H.G. and Lackman D.B. (1957). *Am J Vet Res.* 18:947 (Quoted by Meyer M.E. 1974) Vella E.E. (1983) Brucellosis (the Corps Disease). *J R Army Med Corps*, 129, 97-100.

Sumarokov A.A., Karinskaya G.A., Dranovskaya E.A. (1984). Comparative study of the safety reactogenicity and antigenic potency of chemical and live brucella vaccines under the conditions of a controlled epidemiological trial. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol*, 2, 58-63.

Syrjamaki C., Migliazzo A., Yarbough J., Meyer L.E. (1984). *Brucella abortus* endocarditis following ingestion of cow's blood. *Nebraska Med J*, 69, 141-142.

Taleski V., Zerva L., Kantardjiev T., Cvetnic Z., Erski-Biljic M., Nikolovski B., Bosnjakovski J., Katalinic-Jankovic V., Panteliadou A., Stojkoski S., Kirandziski T. (2002). An overview of the epidemiology and epizootiology of brucellosis in selected countries of Central and Southeast Europe. *Vet Microbiol*, 90, 147-155.

Taliani G., Bartoloni A., Tozzi A., Bartalesi F., Corti G., Paradisi F. (2004). Lumbar pain in a married couple who likes cheese: brucella strikes again !. *Clin Exp Rheumatol.*, 22(4), 477-480.

Troy S.B., Rickman L.S., Davis C.E. (2005). Brucellosis in San Diego Epidemiology and Species-Related Differences in Acute Clinical Presentations. *Medicine (Baltimore)*, 84, 174-187.

Tscherneva E., Rijpens N., Naydensky C., Herman L.M.F. (1996). Repetitive element sequence based polymerase chain reaction for typing of *Brucella* strains. *Vet Microbiol*, 51, 169-178.

Tscherneva E., Rijpens N., Jersek B., Herman L.M.F. (2000). Differentiation of *Brucella* species by random amplified polymorphic DNA analysis. *J Appl Microbiol*, 88, 69-80.

Tsolia M., Drakonaki S., Messaritaki A., Farmakakis Th., Kostaki M., Tsapra H., Karpathios Th. (2002). Clinical Features, Complications and Treatment Outcome of Childhood Brucellosis in Central Greece. *J Infect*, 44, 257-262.

Tumbay E., Hilmi S., Ang O. (1991). *Brucella* and Brucellosis in man and animals. Proceedings of FEMS Symposium.

Turkmani A., Ioannidis A., Christidou A., Psaroulaki A., Loukaides F., Tselentis Y. (2006). In vitro susceptibilities of *Brucella melitensis* isolates to eleven antibiotics. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, 5, 24, doi:10.1186/1476-0711-5-24.

Tunc M., Durukan H. (2004). Bilateral severe visual loss in brucellosis. *Ocul Immunol Inflamm.*, 12(3), 233-236.

Tuncer E.G., Tulek N., Yetkin M.A. (2004). Case report: subdural hemorrhage in neurobrucellosis. *Mikrobiyol Bul.*, 38(3), 253-256.

Verger J.M., Grimont F., Grimont P.A.D., Grayon M. (1985a). *Brucella* a monospecific genus as shown by deoxyribonucleic acid hybridisation. *Int J Syst Bacteriol*, 34, 292-295.

Verger J.M., Plommet M. (1985b). *Brucella melitensis*. Martinus Nijhoff Publishers.

Vrioni G., Gartzonika C., Kostoula A., Boboyianni C., Papadopoulou C., Levidiotou S. (2004). Application of a Polymerase Chain Reaction Enzyme Immunoassay in Peripheral Whole Blood and Serum Specimens for Diagnosis of Acute Human

Brucellosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.*, 23, 194-199.

WHO: http://www.paho.org/english/sha/be_v21n3-cases.htm (online).

WHO (1986). Joint FAO/WHO Expert Committee on Brucellosis, Sixth Report, WHO technical report series, Geneva, World Health Organization.

WHO (1993). Report of the WHO Working Group Meeting on Brucellosis Diagnosis and Research in Enzyme Immunoassay, WHO/CDS/93.125, Geneva (6-7 September), 1-14.

WHO Guidance (2003). Brucellosis in Humans and Animals: WHO Guidance.

WHO/MZCP (1998). Report on the Third Workshop on Human and Animal Brucellosis Epidemiological Surveillance in the MZCP Countries, Damascus, Syrian Arab Republic (4-5 May), 1-46.

Williams E. (1982). Brucellosis. *Practitioner*, 226, 1507-1517.

Williams Rhys A.T. (1980). Fluorescence Polarization. In: *Fluoroimmunoassay. A review of recent methods*, Perkin Elmer Limited, 3-10.

Wilson M.M., Merrifield E.V.O. (1951). The anti-globulin (Coomb's) test in brucellosis. *Lancet*, 2, 913-914.

Wise R.I. (1980). Brucellosis in the United States. Past, present and future. *JAMA*, 244, 2318-2322.

Wood E.E. (1955). Brucellosis as a hazard of blood transfusion. *Br Med J*, i, 27-28.

Wright A.E. and Semple D. (1897). On the employment of dead bacteria in the serum diagnosis of typhoid and Malta Fever. *Br Med J*, i, 1214.

Wright A.E. and Smith F. (1897). On the application of the serum test to the differential diagnosis of typhoid and Malta Fever. *Lancet*, i, 656.

Yagupsky P. (1999). Detection of Brucellae in Blood Cultures. *J Clin Microbiol*, 37(11), 3437-3442.

Yagupsky P., Baron E.J. (2005). Laboratory Exposures to Brucellae and Implications for Bioterrorism. *Emerg Infect Dis*, 11(8), 1180-1185.

Yagupsky P., Peled N., Riesenberk K., Banai M. (2000). Exposure of hospital personnel to *Brucella melitensis* and occurrence of laboratory - acquired disease in

an endemic area. *Scand J Infect Dis.*, 32(1), 31-35.

Young E.J. (1991). Serologic Diagnosis of Human Brucellosis: Analysis of 214 Cases by Agglutination Tests and Review of the Literature. *Reviews of Infectious Diseases*, 13, 359-372.

Young E.J. (1995). An Overview of Human Brucellosis. *Clin Infect Dis.*, 21, 283-290.

Young E.J., Corbel M.J. (1989). *Brucellosis: Clinical and Laboratory Aspects*. Florida: CRC press, inc 46.

Zammit T. (1905). A preliminary note on the examination of the blood of goats suffering from Mediterranean Fever. In: *Reports of the Royal Society of London, Mediterranean Fever Commission, Part III*. Harrison and Sons, London, 83.

Zerva L., Bourantas K., Mitka S., Kansouzidou A., Legakis N.J. (2001). Serum Is the Preferred Clinical Specimen for Diagnosis of Human Brucellosis by PCR. *J Clin Microbiol*, 39(4), 1661-1664.

Zygmunt M.S., Cloeckert A., Dubray G. (1994). *Brucella abortus* cell envelope protein and lipopolysaccharide epitopes involved in humoral responses of naturally and experimentally infected sheep. *J Clin Microbiol*, 32(10), 2514-2522.

Αντωνιάδου Α. (2002). Βρουκέλλωση στον άνθρωπο-Συμπτώματα-Διάγνωση-Θεραπεία. Πρακτικά Επιστημονικής Ημερίδας: Η Βρουκέλλωση των μικρών μηρυκαστικών. Σύγχρονες τάσεις και απόψεις. Αθήνα.

Αρσένη Α. (1994). *Brucella - Pasteurella - Francisella*. Κλινική Μικροβιολογία και Εργαστηριακή Διάγνωση Λοιμώξεων, Κεφάλαιο 22, Τόμος 2, 4η Έκδοση, Αθήνα, Ιατρικές Εκδόσεις ΖΗΤΑ, 613-627.

Κανσουζίδου-Κανακούδη Α., Δανιηλίδης Δ.Β. (1985). Μελέτη στελέχους *Brucella abortus* που απομονώθηκε από άνθρωπο. *Μικροβιολογικά Χρονικά*, 1, 159-164.

Κανσουζίδου-Κανακούδη Α., Δανιηλίδης Δ.Β. (1986). Βιολογικοί χαρακτήρες 345 στελεχών βρουκελλών που απομονώθηκαν από ανθρώπους. *Δελτίο της Ελληνικής Μικροβιολογικής Εταιρείας*, 31, 95-102.

Κανσουζίδου-Κανακούδη Α., Μήτκα Σ., Δανιηλίδης Δ.Β. Είδη και βιότυποι βρουκελλών που απομονώθηκαν από ανθρώπους. 17ο Εθνικό Συνέδριο Μικροβιολογίας - Ιατρικής Βιοπαθολογίας, Θεσ/νίκη, 26-28 Απριλίου 1996, Τόμος περιλήψεων, 37.

Κανσουζίδου-Κανακούδη Α., Υφαντίδου Α., Μήτκα Σ., Χαριτίδου Χ., Βάρνης Θ., Χαϊδούλη Ε. (2002). Αλλαγή στον βιότυπο της βρουκέλλας που προκαλεί νόσο στον άνθρωπο στη Βόρεια Ελλάδα. Δελτίο της Ελληνικής Μικροβιολογικής Εταιρείας, 47, 385-391.

Παπαπαναγιώτου Ι.Κ., Κυριαζοπούλου-Δαλαίνα Β. (2001). Βρουκέλλες. Ιατρική Μικροβιολογία και Ιολογία, Κεφάλαιο 12, University Studio Press, Θεσσαλονίκη, , 133-140.

Παππούς Χ., Χόντου Α. (1988). Ορολογικός έλεγχος αμνών εμβολιασμένων κατά της βρουκέλλωσης με εμβόλιο REV-1. Δελτίο Ελληνικής Κτηνιατρικής Εταιρείας, 39.

Σαρρής Κ. (2002). Βρουκέλλωση στον άνθρωπο-Συμπτώματα-Διάγνωση-Θεραπεία. Πρακτικά Επιστημονικής Ημερίδας: Η Βρουκέλλωση των μικρών μηρυκαστικών. Σύγχρονες τάσεις και απόψεις. Αθήνα.

Στεφάνου Λ., Παπαδοπούλου Κ.Α., Ναλμπάντη Χ., Γιαντζής Δ. (1978). Συγκριτική μελέτη επί της βρουκελλώσεως προβάτων μη εμβολιασθέντων και εμβολιασθέντων δια εμβολίου REV-1 Αμνάδου. Δελτίο Ελληνικής Κτηνιατρικής Εταιρείας, 29.

Χατζηχριστοδούλου Χ.Σ. (1997). Επιδημιολογική διερεύνηση επιτήρηση και πρόληψη της Βρουκέλλωσης σε γεωργοκτηνοτροφική περιοχή της Ελλάδας με την βοήθεια μηχανογραφημένης χαρτογράφησης. Διδακτορική Διατριβή, Ηράκλειο, 19-40.