

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ - ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ  
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ  
ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ & ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ  
ΥΓΙΕΙΝΗ:  
ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΥΔΑΤΩΝ ΚΑΙ  
ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ**

Ορολογική διάγνωση και παρακολούθηση κρουσμάτων  
βρουκέλλωσης στην περιοχή της Θεσσαλίας

Serologic diagnosis of brucellosis and follow up in the  
area of Thessaly, Greece.

**Μεταπτυχιακή Διατριβή**

Στυλιανή Ν. Καλονάκη

Πτυχιούχος Κτηνίατρος  
Τμήμα Κτηνιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

**Επιβλέπων καθηγητής:**  
Χατζηχριστοδούλου Χρήστος

Λάρισα, Φεβρουάριος 2016

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ - ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ  
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ  
ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ & ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ  
ΥΓΙΕΙΝΗ:  
ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΥΔΑΤΩΝ ΚΑΙ  
ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ**

Ορολογική διάγνωση και παρακολούθηση κρουσμάτων  
βρουκέλλωσης στην περιοχή της Θεσσαλίας

Serologic diagnosis of brucellosis and follow up in the  
area of Thessaly, Greece.

**Μεταπτυχιακή Διατριβή**

Στυλιανή Ν. Καλονάκη

Πτυχιούχος Κτηνίατρος  
Τμήμα Κτηνιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

**Επιβλέπων καθηγητής:**  
Χατζηχριστοδούλου Χρήστος

Λάρισα, Φεβρουάριος 2016



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ - ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ  
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ  
ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ & ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΥΓΙΕΙΝΗ:  
ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΥΔΑΤΩΝ ΚΑΙ ΔΗΜΟΣΙΑ  
ΥΓΕΙΑ

Ορολογική διάγνωση και παρακολούθηση κρουσμάτων βρουκέλλωσης  
στην περιοχή της Θεσσαλίας

Serologic diagnosis of brucellosis and follow up in the area of Thessaly,  
Greece.

### **Μεταπτυχιακή Διατριβή**

Στυλιανή Ν. Καλονάκη

#### **Τριμελής συμβουλευτική επιτροπή:**

1. Χατζηχριστοδούλου Χρήστος, Καθηγητής Ιατρικού Τμήματος  
Παν/μίου Θεσσαλίας
2. Τσακάλωφ Ανδρέας, Αναπληρωτής Καθηγητής Ιατρικού Τμήματος  
Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
3. Μαλισσίοβα Ελένη, Καθηγήτρια Εφαρμογών Τμήματος Τεχνολογίας  
Τροφίμων ΤΕΙ Θεσσαλίας

Copyright ©Στυλιανή Ν. Καλονάκη, 2016  
Με επιφύλαξη παντός δικαιώματος. All rights reserved.

Απαγορεύεται η αντιγραφή, αποθήκευση και διανομή της παρούσας εργασίας, εξ ολοκλήρου ή τμήματος αυτής, για εμπορικό σκοπό. Επιτρέπεται η ανατύπωση, αποθήκευση και διανομή για σκοπό μη κερδοσκοπικό, εκπαιδευτικής ή ερευνητικής φύσης, υπό την προϋπόθεση να αναφέρεται η πηγή προέλευσης και να διατηρείται το παρόν μήνυμα.

*To my teammate*

# Ευχαριστίες

---

Με την περάτωση της παρούσας εργασίας, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τους επιβλέποντες της διπλωματικής εργασίας για την άριστη συνεργασία και τις ουσιώδεις υποδείξεις και παρεμβάσεις, που διευκόλυναν την εκπόνηση της μεταπτυχιακής αυτής διατριβής. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους φίλους και συνεργάτες του Κτηνιατρικού Εργαστηρίου Λάρισας για την υποστήριξη και την δημιουργία ενός ευχάριστου και δημιουργικού κλίματος, για τις εύστοχες υποδείξεις τους και την συνεχή στήριξή τους. Τέλος, οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένεια και τους φίλους μου για την αμέριστη υποστήριξη και την ανεκτίμητη βοήθεια που μου παρείχαν τόσο κατά την διάρκεια των σπουδών μου όσο και κατά την εκπόνηση της μεταπτυχιακής αυτής διατριβής.

# Ορολογική διάγνωση και παρακολούθηση κρουσμάτων βρουκέλλωσης στην περιοχή της Θεσσαλίας

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η κλινική εικόνα της βρουκέλλωσης εμφανίζει ποικιλία συμπτωμάτων, ενώ κανένα από αυτά δεν θα μπορούσε να χαρακτηριστεί ως ειδικό για τη διάγνωση του νοσήματος. Για το λόγο αυτό κρίνεται απαραίτητη η εργαστηριακή διερεύνηση των ύποπτων περιστατικών με βάση το ιστορικό τους και την κλινική τους εικόνα καθώς σε καμία άλλη περίπτωση δεν μπορεί να αποκλειστεί το νόσημα από τη διαφορική διάγνωση. Τα τελευταία πειραματικά δεδομένα εμφανίζουν ως επικρατέστερες μεθόδους διάγνωσης τις ορολογικές δοκιμές ανίχνευσης αντισωμάτων με επικρατέστερες εργαστηριακές δοκιμές ρουτίνας αυτές του Ερυθρού της Βεγγάλης και της Σύνδεση Συμπληρώματος. Στην παρούσα μελέτη με τη συμμετοχή 102 συνολικά δειγμάτων ορού αίματος γίνεται σύγκριση των μεθόδων RB και FPA ως προς τη διαγνωστική τους αξία. Η σύγκριση των δοκιμών θα γίνει στα πλαίσια ανίχνευσης νέων κρουσμάτων χωρίς προηγούμενη έκθεση αλλά και κατά τη διενέργεια προγραμματισμένων επανεξετάσεων ασθενών με χρόνια μορφή της νόσου. Με βάση αυτό το διαχωρισμό δημιουργήθηκαν 2 ομάδες όπου αξιολογήθηκε η διαγνωστική αξία των δοκιμών κατά περίπτωση. Δείκτης θετικότητας της μελέτης ορίστηκε η δοκιμή CFT. Στην παρούσα μελέτη, η μέθοδος FPA παρουσίασε υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα τόσο σε οξείες μορφές (Ομάδα 1) όσο και σε χρόνιες μορφές της νόσου (Ομάδα 2). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της δοκιμής, την ταχύτητα και ευκολία της μεθόδου αλλά και της αντικειμενική ερμηνεία των αποτελεσμάτων, η FPA θα μπορούσε εύκολα να ενταχθεί στις μεθόδους ρουτίνας για τη διάγνωση της βρουκέλλωσης στον άνθρωπο.

**ΛΕΞΕΙΣ – ΚΛΕΙΔΙΑ:** Βρουκέλλωση, RB, FPA

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

---

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ .....	i
Κατάλογος γραφημάτων .....	iii
Κατάλογος πινάκων .....	iv
Συνομογραφίες .....	v
Κεφάλαιο 1 .....	1
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	
1.1 Περιγραφή του νοσήματος.....	1
1.2 Παθογένεια.....	2
1.3 Κλινικές μορφές.....	3
1.4 Ανοσολογική αντίδραση του οργανισμού.....	3
1.5 Διαγνωστικές τεχνικές.....	4
Κεφάλαιο 2.....	5
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ	
2.1 Στόχος και σχεδιασμός μελέτης .....	5
2.2 Μεθοδολογία.....	7
2.2.1 Δοκιμή ερυθρού της Βεγγάλης.....	7
2.2.2 Δοκιμή σύνδεσης συμπληρώματος.....	8
2.2.3 Δοκιμή πόλωσης του φθορίζοντος φωτός.....	9
Κεφάλαιο 3.....	11
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	
3.1 Ομάδα 1.....	11
3.2 Ομάδα 2.....	15
Κεφάλαιο 4 .....	19
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	
4.1 Σύγκριση με ανάλογες μελέτες.....	19
4.2 Συμπεράσματα μελέτης.....	19
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	22
Abstract .....	26



# ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ

---

Γράφημα 1.1 Κατανομή σχετικής συχνότητας νοσούντων με βάση το επάγγελμα (adapted from ΚΕΕΛΠΝΟ)

Γράφημα 2.1 Μέσης ετήσιας επίπτωσης της βρουκέλλωσης ανά γεωγραφικό διαμέρισμα κατοικίας ασθενούς στην Ελλάδα (adapted from ΚΕΕΛΠΝΟ)

# Κατάλογος πινάκων

---

- 3.1.1 Αποτελέσματα RB στην Ομάδα 1
- 3.1.2 Αποτελέσματα FPA στην Ομάδα 1
- 3.1.3 Αναλυτικά αποτελέσματα Ομάδας 1 στις δοκιμές RB, CFT και FPA
- 3.1.4 Συσχέτιση μεθόδου RB με τη μέθοδο CFT για την Ομάδα 1
- 3.1.5 Συσχέτιση μεθόδου FPA με τη μέθοδο CFT για την Ομάδα 1
- 3.2.1 Αποτελέσματα RB στην Ομάδα 2
- 3.2.2 Αποτελέσματα FPA στην Ομάδα 2
- 3.2.3 Αναλυτικά αποτελέσματα Ομάδας 2 στις δοκιμές RB, CFT και FPA
- 3.2.4 Συσχέτιση μεθόδου RB με τη μέθοδο CFT για την Ομάδα 2
- 3.2.5 Συσχέτιση μεθόδου FPA με τη μέθοδο CFT για την Ομάδα 2
- 4.2.1 Σύγκριση δοκιμών στην Ομάδα 1
- 4.2.2 Σύγκριση δοκιμών στην Ομάδα 2

# Συντομογραφίες

---

<b>ΚΕΕΛΠΝΟ</b>	Κέντρο Ελέγχου & Πρόληψης Νοσημάτων
<b>RB</b>	Rose Bengal (Ερυθρό της Βεγγάλης)
<b>CFT</b>	Complement Fixation Test (Δοκιμή Σύνδεσης Συμπληρώματος)
<b>FPA</b>	Fluorescence polarization assay (Δοκιμή πόλωσης του φθορίζοντος φωτός)
	PCR Polymerase Chain Reaction (Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης)
<b>PPV</b>	Positive Predictive Value (Θετική Προγνωστική Αξία)
<b>NPV</b>	Negative Predictive Value (Αρνητική Προγνωστική Αξία)
<b>Se</b>	Sensitivity (Ευαισθησία)
<b>Sp</b>	Specificity (Ειδικότητα)
<b>CI</b>	Confidence Interval (Διάστημα Εμπιστοσύνης)

# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1<sup>ο</sup>

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

---

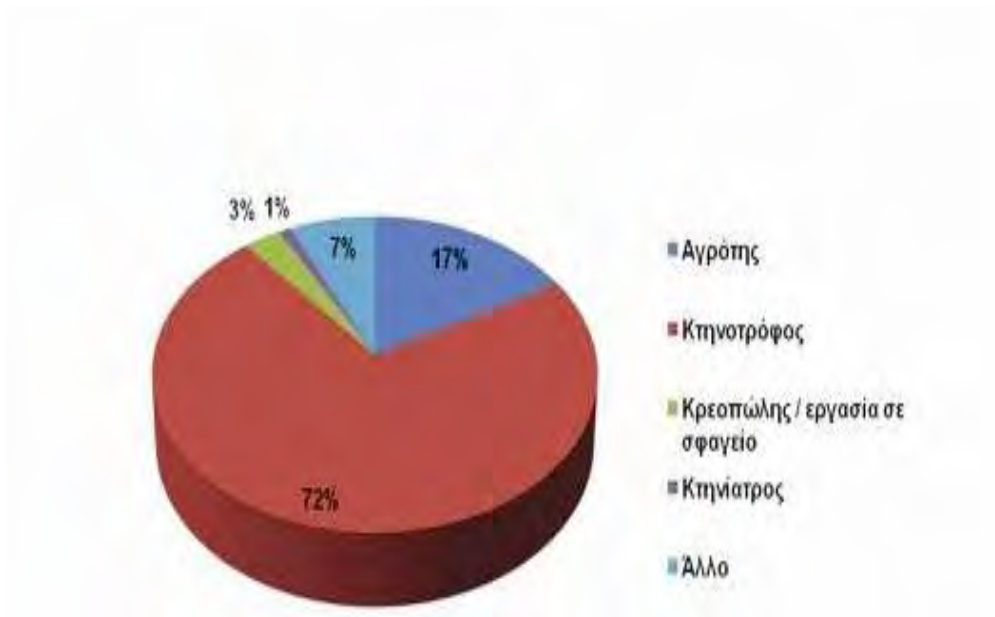
### 1.1 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΟΥ ΝΟΣΗΜΑΤΟΣ

Ζωονόσοι είναι λοιμώδη νοσήματα που μεταδίδονται μεταξύ των σπονδυλωτών ζώων και του ανθρώπου με φυσικό τρόπο (Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας , Γενεύη 1981)

Η βρουκέλλωση αποτελεί την πιο συχνή ζωονόσο καθώς αναφέρονται 500.000 νέες περιπτώσεις ανά έτος. Η θνητότητα της νόσου είναι μικρή ωστόσο οι ασθενείς ενδέχεται να εμφανίσουν σοβαρή ανικανότητα και αναπηρία ενώ συχνά η θεραπεία παρουσιάζει αποτυχίες και υποτροπές. Σημαντικό ρόλο για τη θεραπεία της νόσου κατέχει η έγκαιρη και ακριβής διάγνωση. ( Pappas et al)

Ως φυσική δεξαμενή του οργανισμού στο περιβάλλον και παράλληλα η κυριότερη πηγή μόλυνσης των ανθρώπων θεωρούνται τα βοοειδή, τα πρόβατα και οι αίγες. Κατ επέκταση, μεταξύ των ανθρώπων που νοσούν, το μεγαλύτερο ποσοστό τους ανήκει στις κατηγορίες των κτηνιάτρων, των τεχνολόγων ζωικής παραγωγής, των κτηνοτρόφων και των εργαζομένων σε μονάδες επεξεργασίας ζωικών προϊόντων.

Πράγματι, στο Γράφημα 1 φαίνεται η κατανομή των νοσούντων με βάση το επάγγελμά τους σύμφωνα με τα επιδημιολογικά δεδομένα που παρουσίασε το Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων (ΚΕΕΛΠΝΟ) για τα έτη 2005 -2011,



Γράφημα 1.1 Κατανομή σχετικής συχνότητας νοσούτων με βάση το επάγγελμα (adapted from ΚΕΕΛΠΝΟ)

## 1.2 ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ

Η βρουκέλλωση προκαλείται από τη μόλυνση του ανθρώπινου οργανισμού με βακτήρια του γένους *Brucella*. Πρόκειται για Gram αρνητικό, αερόβιο βακτήριο, ανακαλύφθηκε το 1887 από τον David Bruce και μέχρι πρότινος έχει διαχωριστεί στα εξής είδη:

1. *Brucella melitensis*
2. *Brucella abortus*
3. *Brucella suis*
4. *Brucella canis*
5. *Brucella neotomae*
6. *Brucella ovnis*
7. *Brucella marina* – *Brucella ceti*
8. *Brucella marina* – *Brucella pinnipedialis*
9. *Brucella microti*
10. *Brucella inopinata*

Από τα παραπάνω δέκα είδη μόνο τα πέντε είναι επιβεβαιωμένα παθογόνα για τον άνθρωπο και συγκεκριμένα τα *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. canis* και *B. marina*.

Ωστόσο από τα περισσότερα ανθρώπινα κρούσματα απομονώνονται κυρίως τα είδη *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis* τα οποία μάλιστα παρουσιάζουν ομοιομορφία στην αλληλουχία του γονιδιώματός τους.

Μετά τη μόλυνση του ανθρώπινου οργανισμού τα βακτήρια εγκαθίσταται κυρίως στο λεμφικό σύστημα και από εκεί έχουν τη δυνατότητα να προσβάλλουν διάφορα όργανα. Είναι δυνητικά ενδοκυττάριο βακτήριο γεγονός που καθιστά δύσκολη την αντιμετώπισή του.

## 1.3 ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΜΟΡΦΕΣ

### 1. ΟΞΕΙΑ ΝΟΣΟΣ

Χαρακτηρίζεται από κόπωση, εφίδρωση, κεφαλαλγία, εμπύρετο, μυαλγία, αρθραλγία, διόγκωση ήπατος, αποστήματα στον σπλήνα, γαστρεντερικές διαταραχές, πιθανότητα να καταλήξει ο ασθενής

### 2. ΥΠΟΞΕΙΑ ΝΟΣΟΣ

Έχει όμοια χαρακτηριστικά κλινικά ευρήματα με την οξεία νόσο ωστόσο σε πιο ήπια μορφή

### 3. ΧΡΟΝΙΑ ΝΟΣΟΣ

Πρόκειται για μορφή που εμφανίζουν ασθενής με εκτεταμένη πλέον ζημιά στο οστεοαρθρικό σύστημα ή στο ήπαρ. Χαρακτηριστικό της χρόνιας νόσου είναι πως οι ασθενείς στις ορολογικές εξετάσεις μπορεί να εμφανιστούν είτε οροθετικοί είτε ακόμα και οροαρνητικοί

### 4. ΥΠΟΚΛΙΝΙΚΗ ΝΟΣΟΣ

Απουσία συμπτωμάτων

## 1.4 ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥ

Μετά από την είσοδο του μικροοργανισμού στον ξενιστή ενεργοποιείται η παραγωγή αντισωμάτων. Πρόκειται για ειδικές πρωτεΐνες οι οποίες συνδέονται με το αντιγόνο του ξενιστή και δημιουργούν ανοσοσύμπλοκα.

Στη βρουκέλλωση τα αντισώματα που παίζουν καθοριστικό ρόλο στην προστασία του οργανισμού είναι τα IgG, IgM και IgA αντιγόνα. Η ενεργοποίηση της παραγωγής τους προκαλείται σε μεγαλύτερο βαθμό από τον λιποπολυσακχαρίτη (LPS) του

βακτηρίου της Βρουκέλλας και σε μικρότερο βαθμό από τις κυτταροπλασματικές του πρωτεΐνες.

Είναι γεγονός πως τα IgM αντισώματα που δρουν κατά του LPS είναι αυτά που πυροδοτούνται πρώτα, αμέσως μετά τη μόλυνση και παραμένουν σε υψηλά επίπεδα στην οξεία νόσο. Αντίθετα, τα IgG αντισώματα εμφανίζονται αρκετά μετέπειτα της μόλυνσης και ενεργοποιούνται από τις κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες του βακτηρίου.

## 1.5 ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

Οι κύριες μέθοδοι που χρησιμοποιούνται ευρέως για την άμεση ανίχνευση του μικροοργανισμού είναι η καλλιέργεια και η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).

Η αιμοκαλλιέργεια θεωρείται η μέθοδος επιλογής για την άμεση διάγνωση ωστόσο η λήψη δείγματος αίματος πρέπει να γίνει στα πρώτα στάδια της νόσου, πριν ο ασθενής ξεκινήσει θεραπευτική αγωγή ενώ σαν τεχνική θεωρείται χρονοβόρα λόγω του μεγάλου χρονικού διαστήματος επώασης που απαιτείται, από 2 έως και 7 ημέρες. Παράλληλα η καλλιέργεια παθογόνου μικροοργανισμού στο χώρο του εργαστηρίου εγκυμονεί τον κίνδυνο μόλυνσης του προσωπικού.

Από την άλλη πλευρά, η PCR, αν και θεωρείται εξαιρετικά αξιόπιστη μέθοδος, σε καμία περίπτωση δεν θα μπορούσε να ενταχθεί στις εξετάσεις ρουτίνας ενός εργαστηρίου για την άμεση διάγνωση της βρουκέλλωσης. Η διενέργεια της εξέτασης απαιτεί εξειδικευμένο προσωπικό και ειδικό εργαστηριακό εξοπλισμό.

Για τους παραπάνω λόγους, όσον αφορά την εργαστηριακή διερεύνηση των κρουσμάτων βρουκέλλωσης, έχουν επικρατήσει οι ορολογικές δοκιμές με σκοπό την ανίχνευση αντισωμάτων κατά του μικροοργανισμού. Οι κυριότερες από αυτές είναι:

- δοκιμή οροσυγκόλλησης,
- δοκιμή Coomb's,
- δοκιμή Elisa,
- δοκιμή του Ερυθρού της Βεγγάλης (RB),
- δοκιμή της Σύνδεσης του Συμπληρώματος (CFT),
- δοκιμή πόλωσης του φθορίζοντος φωτός (FPA)

# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2ο

## ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

---

### 2.1 ΣΤΟΧΟΣ ΚΑΙ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Ο στόχος της ακόλουθης πειραματικής μελέτης είναι η σύγκριση της διαγνωστικής αξίας των δοκιμών RB και FPA ως προς τη διάγνωση του νοσήματος της βρουκέλλωσης και συγκεκριμένα η αξιολόγηση των μεθόδων αυτών ξεχωριστά κατά τη διάγνωση νέων κρουσμάτων αλλά και κατά τον επανέλεγχο παλαιότερων περιστατικών.

Με βάση τον προαναφερόμενο στόχο, για τον σχεδιασμό της μελέτης, τα πιθανά νέα κρούσματα κατατάχθηκαν στην Ομάδα 1 ενώ τα δείγματα με προηγούμενη επιβεβαιωμένη μόλυνση στην Ομάδα 2.

Στην Ομάδα 1 συμμετείχαν περιστατικά με υποψία μόλυνσης από το βακτήριο του γένους *Brucella* χωρίς να έχουν προηγούμενη μόλυνση στο παρελθόν. Στην Ομάδα 2 αντίθετα περιλαμβάνονταν ασθενείς με επιβεβαιωμένη μόλυνση στο παρελθόν που πραγματοποιούν εξέταση ρουτίνας για επανέλεγχο και καταγράφονται με χρόνια μορφή της νόσου.

Σύμφωνα με τα επιδημιολογικά δεδομένα του ΚΕΕΛΠΝΟ, η υψηλότερη μέση ετήσια επίπτωση της βρουκέλλωσης για το διάστημα 2005-2011 καταγράφεται στη Θεσσαλία (8,0/100.000 πληθυσμού).



Μέση ετήσια επίπτωση (κρούσματα ανά 100,000 πληθυσμού) της βρουκέλλωσης ανά γεωγραφικό διαμέρισμα κατοικίας ασθενούς, Ελλάδα, 2005-2011.



Γράφημα 2.1 (adapted from ΚΕΕΛΠΝΟ)

Το παραπάνω γεγονός σε συνδυασμό με τη λειτουργία του Εθνικού Εργαστηρίου Αναφοράς της Βρουκέλλωσης στην πόλη της Λάρισας, καθιστούσε πιο εύκολο το έργο μας για εύρεση ύποπτων κρουσμάτων ως προς τη βρουκέλλωση .

Όλα τα δείγματα συλλέχτηκαν μετά από παραπομπή των ασθενών από ιδιώτες ιατρούς και νοσοκομεία της περιοχής της Θεσσαλίας.

Συγκεκριμένα, στο διάστημα από τον Σεπτέμβριο του 2015 έως και τον Ιανουάριο του 2016 συλλέξαμε συνολικά 102 δείγματα αίματος εκ των οποίων τα 74 ήταν πιθανά νέα κρούσματα και τα 28 ήταν προγραμματισμένες επανεξετάσεις μετά από εργαστηριακά επιβεβαιωμένη νόσο.

Ως κριτήριο θετικότητας για τη δοκιμή ορίστηκε το θετικό αποτέλεσμα στη δοκιμή CFT σε συνδυασμό με την κλινική εικόνα των ασθενών . Η μέθοδος CFT σε ανάλογες μελέτες για τη διάγνωση της βρουκέλλωσης σε ανθρώπινα δείγματα παρουσιάζει Ευαισθησία = 92% και Ειδικότητα = 99%. Σε επίπεδο εργαστηριακών εξετάσεων ρουτίνας που εφαρμόζονται για τη διάγνωση του νοσήματος, η CFT θεωρείται η πιο αξιόπιστη.

Πέραν της δοκιμής CFT, όλα τα δείγματα εξετάστηκαν με τις δοκιμές RB και FPA. Η διενέργεια των παραπάνω δοκιμών πραγματοποιήθηκε στο Κτηνιατρικό Εργαστήριο Λάρισας το οποίο είναι και Εθνικό Εργαστήριο Αναφοράς της Βρουκέλλωσης και διατηρεί διαπίστευση για τις μεθόδους RB και CFT.

## 2.2 ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

### 2.2.1 ΔΟΚΙΜΗ ΕΡΥΘΡΟΥ ΤΗΣ ΒΕΓΓΑΛΗΣ (RB)

Η δοκιμή RB διενεργείται με σκοπό την ανίχνευση στον ορό του αίματος αντισωμάτων που παράγονται μετά από μόλυνση με βακτήρια του γένους *Brucella*. Με την παραπάνω δοκιμή ανιχνεύεται η συγκόλληση κεχρωσμένου αντιγόνου, ρυθμισμένου ως προς το pH, με τα ειδικά αντισώματα του ορού, εφόσον υπάρχουν. Είναι δοκιμή ταχείας οροσυγκόλλησης και αναπτύχθηκε μετά τη διαπίστωση ότι η ικανότητα συγκόλλησης των μη ειδικών αντισωμάτων της κλάσεως IgM με το αντιγόνο μειώνεται σημαντικά, ενώ η αντίστοιχη των ειδικών αντισωμάτων δεν επηρεάζεται. Το αντιγόνο που χρησιμοποιείται είναι κύτταρα *Brucella* τα οποία έχουν αναμιχθεί με χρωστική Rose Bengal και με ρυθμιστικό διάλυμα ώστε να επιτυγχάνεται το χαμηλό pH.

Πριν την εξέταση, τα δείγματα αίματος φυγοκεντρώνονται προκειμένου να συλλεχθεί ο ορός του αίματος.

Τα δείγματα όπως και το αντιγόνο είναι σημαντικό να παραμείνουν τουλάχιστον για 30 λεπτά της ώρας σε θερμοκρασία δωματίου καθώς η ευαισθησία της δοκιμής μειώνεται σημαντικά αν το αντιγόνο χρησιμοποιηθεί αμέσως μετά την εξαγωγή του από το ψυγείο.

Κατά τη διενέργεια της δοκιμής τοποθετούμε 30μl ορό στις ειδικές γυάλινες πλάκες και τα αναμιγνύουμε με μια σταγόνα αντιγόνου. Μετά την ανάμιξη, η πλάκα τοποθετείται στον ανακινητή όπου και ανακινείται για 4 λεπτά.

Ως θετικό ορίζεται το αποτέλεσμα που εμφανίζει ίχνη συγκόλλησης.

Η θετικότητα των δειγμάτων εκφράζεται με σταυρούς, έναν έως τέσσερις, ανάλογα με το βαθμό συγκόλλησης που παρατηρείται, με τους τέσσερις σταυρούς (++++) να εκφράζουν τα δείγματα με τον πιο έντονο βαθμό συγκόλλησης.

## 2.2.2 ΔΟΚΙΜΗ ΣΥΝΔΕΣΗΣ ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΟΣ (CFT)

Πριν τη διενέργεια της δοκιμής, οι οροί προς εξέταση αδρανοποιούνται στο υδατόλουτρο για τριάντα λεπτά της ώρας στους 58°C .

Η δοκιμή εφαρμόζεται σε δυο στάδια. Στο πρώτο αναμειγνύονται ο αδρανοποιημένος υπό εξέταση ορός με το αντιγόνο και το συμπλήρωμα. Εφόσον στον ορό του ανθρώπινου αίματος υπάρχουν αντισώματα κατά των βακτηρίων του γένους *Brucella* σχηματίζεται σύμπλοκο με το αντιγόνο της δοκιμής, το οποίο και δεσμεύει το συμπλήρωμα.

Ουσιαστικά, η δοκιμή στηρίζεται στη δράση του συμπληρώματος το οποίο αποτελείται από μια σειρά πρωτεϊνικών παραγόντων. Η κύρια ιδιότητα του συμπληρώματος είναι η ικανότητά του να συνδέεται με σύμπλοκα που σχηματίζονται μεταξύ αντιγόνου και αντισώματος.

Ως δείκτης της σύνδεσης αυτής χρησιμοποιούνται ερυθρά αιμοσφαίρια προβάτου που έχουν προηγουμένως ευαισθητοποιηθεί με προσθήκη ειδικού άνοσο ορού, δηλαδή αιμολυσίνης. Συγκεκριμένα, στο δεύτερο στάδιο, προστίθεται το αιμολυτικό σύστημα που αποτελείται από εναιώρημα ευαισθητοποιημένων ερυθρών αιμοσφαιρίων.

Η διάκριση του θετικού αποτελέσματος γίνεται με την παρουσία ερυθρών αιμοσφαιρίων , τα οποία καθιζάνουν στον πυθμένα των βοθρίων της ειδικής πλάκας όπου εκτελείται η δοκιμή. Η παρουσία τους σε δείγμα θετικού ορού δικαιολογείται καθώς, λόγω της ύπαρξης αντισωμάτων, δημιουργούνται σύμπλοκα τα οποία δεσμεύουν το συμπλήρωμα και έτσι αυτό δεν είναι πια διαθέσιμο ώστε να προκαλέσει λύση των ερυθρών αιμοσφαιρίων.

Αντίθετα, κατά τη διάκριση αρνητικού αποτελέσματος, το συμπλήρωμα δρα στην κυτταρική μεμβράνη των ερυθρών αιμοσφαιρίων, προκαλεί ρήξη αυτής και απελευθέρωση της αιμοσφαιρίνης με αποτέλεσμα οι οροί που περιέχονται στα βοθρία της ειδικής πλάκας να αποκτήσουν ερυθρό χρωματισμό.

Τα αποτελέσματα της δοκιμής εκφράζονται σε Διεθνείς μονάδες CFT/ml (ICFTU/ml).

Οροί με τίτλο  $\geq 20$  (ICFTU/ml) θεωρούνται θετικοί.

## 2.2.3 ΔΟΚΙΜΗ ΠΟΛΩΣΗΣ ΤΟΥ ΦΘΟΡΙΖΟΝΤΟΣ ΦΩΤΟΣ (FPA)

Στη δοκιμή FPA προσδιορίζεται η μεταβολή της ταχύτητας αποπόλωσης του φθορίζοντος φωτός, εφόσον μεταβληθεί το μέγεθος του φθορίζοντος μορίου.

Η FPA βασίζεται στη θεωρία πως, όταν ένα μόριο, επισημασμένο με φθορίζουσα χρωστική, διεγερθεί από δέσμη πολωμένου φωτός, τότε εκπέμπει φθορίζουσα ακτινοβολία στο ίδιο επίπεδο πόλωσης με αυτό της διεγείρουσας ακτινοβολίας, εφόσον αυτό παραμένει ακίνητο.

Σε περίπτωση διαλύματος, όπως οι οροί αίματος, τα μόρια περιστρέφονται και όταν διεγερθούν από δέσμη πολωμένου φωτός, προκαλείται αποπόλωση των φθορίζοντων μορίων.

Η ταχύτητα αποπόλωσης της ακτινοβολίας εξαρτάται από το μέγεθος του μορίου. Συγκεκριμένα σε μόρια μικρού μεγέθους η ταχύτητα είναι ταχεία ενώ αντίθετα, σε μόρια μεγάλου μεγέθους η ταχύτητα είναι βραδύτερη.

Στην περίπτωση της βρουκέλλωσης, εφόσον το προς εξέταση δείγμα περιέχει αντισώματα, τότε αυτά προσκολλώνται στο επισημασμένο μόριο, μεταβάλλοντας το μέγεθός του και κατά συνέπεια και την ταχύτητα αποπόλωσής του.

Για τη διενέργεια της εξέτασης πραγματοποιούνται δυο μετρήσεις στον αναλυτή. Στην πρώτη μέτρηση, ο προς εξέταση ορός διαλύεται σε ρυθμιστικό διάλυμα και αφού προηγηθεί ήπια ανάδευση και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά της ώρας, μετράται η ταχύτητα αποπόλωσης του φθορίζοντος φωτός. Για τη δεύτερη μέτρηση, προστίθεται αντιγόνο στο υπάρχον διάλυμα και πραγματοποιείται μέτρηση μετά από επώαση για 5 λεπτά της ώρας.

Όλα τα ανθρώπινα δείγματα πριν τη διενέργεια της συγκεκριμένης εξέτασης υφίστανται φυγοκέντριση με σκοπό τη λήψη καθαρού ορού, με ιδιαίτερη προσοχή για την αποφυγή της στιβάδας λίπους. Στη συνέχεια ο ορός τοποθετείται σε ειδικά φιαλίδια erpendorf που περιέχουν αντιλιπιδικό παράγοντα και ακολουθεί εκ νέου φυγοκέντριση με σκοπό να καθιζάνει ο παράγοντας με το λίπος που θα έχει δεσμεύσει. Ο έτοιμος ορός προς εξέταση θα ληφθεί από το υπερκείμενο διάλυμα των συγκεκριμένων φιαλιδίων erpendorf.

Για τη διάκριση θετικού αποτελέσματος, εφόσον η τιμή των μονάδων μέτρησης ενός ορού είναι μεγαλύτερη από την οριακή τιμή που έχει καθοριστεί, τότε ο ορός αυτός θεωρείται θετικός.

Τα αποτελέσματα της δοκιμής εκφράζονται σε ειδικές μονάδες που καλούνται millipolarization units (mP).

Οροί με αποτέλεσμα  $\geq 20$  mP θεωρούνται θετικοί.

# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3<sup>ο</sup>

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

---

### 3.1 ΟΜΑΔΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ 1

Η Ομάδα 1 αποτελείται συνολικά από δείγματα 74 ανθρώπων.

Πραγματοποιήθηκε εξέταση 74 δειγμάτων με τη μέθοδο CFT για τη διάγνωση της βρουκέλλωσης. Τα 40 δείγματα από αυτά, εμφανίστηκαν θετικά στη δοκιμή ενώ τα υπόλοιπα 34 εμφανίστηκαν αρνητικά. Εφόσον στη μελέτη ορίσαμε κριτήριο θετικότητας της βρουκέλλωσης το θετικό αποτέλεσμα στη μέθοδο FPA, από τα 74 δείγματα που εξετάσαμε με τις μεθόδους RB και FPA, θεωρήσαμε τα 40 από αυτά ότι προέρχονται από ασθενείς και τα 34 από ανθρώπους που δεν εμφανίζουν βρουκέλλωση.

Κατά την εξέταση των δειγμάτων με τη μέθοδο RB για τη διάγνωση της βρουκέλλωσης, βρέθηκαν 35 θετικά και 39 αρνητικά δείγματα. Από τα θετικά δείγματα ανθρώπων στην RB, τα 33 εξ αυτών νοσούν ,είναι δηλαδή CFT θετικά, ενώ στα υπόλοιπα 2 απουσιάζει η νόσος, CFT αρνητικά. Από τα αρνητικά δείγματα ανθρώπων στην RB, τα 7 περιστατικά νοσούν ενώ τα υπόλοιπα 32 δεν εμφανίζουν βρουκέλλωση σύμφωνα με τα αντίστοιχα αποτελέσματα τους στην CFT. Τα αποτελέσματα διακρίνονται στον πίνακα 3.1 που ακολουθεί.

#### 3.1.1 Αποτελέσματα RB στην Ομάδα 1

Βρουκέλλωση			
Δοκιμή RB	ΝΑΙ	ΟΧΙ	Σύνολο
RB θετικά	33	2	35
RB αρνητικά	7	32	39
Σύνολο	40	34	74

Κατά την εξέταση των δειγμάτων με τη μέθοδο FPA για τη διάγνωση της βρουκέλλωσης, βρέθηκαν 41 θετικά και 33 αρνητικά δείγματα. Από τα θετικά δείγματα ανθρώπων στην FPA τα 40 ανήκουν σε περιστατικά που εμφανίζουν τη νόσο. Από τα αρνητικά δείγματα ανθρώπων στην FPA, όλα ανήκουν σε ανθρώπους που δεν εμφανίζουν τη νόσο. Τα αποτελέσματα διακρίνονται στον πίνακα 3.2 που ακολουθεί.

### 3.1.2 Αποτελέσματα FPA στην Ομάδα 1

<b>Βρουκέλλωση</b>			
<b>Δοκιμή FPA</b>	<b>ΝΑΙ</b>	<b>ΟΧΙ</b>	<b>Σύνολο</b>
<b>FPA θετικά</b>	40	1	41
<b>FPA αρνητικά</b>	0	34	34
<b>Σύνολο</b>	40	34	74

Τα αποτελέσματα των εξετάσεων για κάθε δείγμα ξεχωριστά περιλαμβάνονται στον πίνακα 3.3, όπου τα δείγματα κωδικοποιούνται με αύξοντα αριθμό από το 1 έως το 74. Το θετικό αποτέλεσμα εκφράζεται με τον αριθμό 1 και το αρνητικό αποτέλεσμα με τον αριθμό 2.

### 3.1.3 Αναλυτικά αποτελέσματα Ομάδας 1 στις δοκιμές RB, CFT και FPA

<b>A/A</b>	<b>RB</b>	<b>CFT</b>	<b>FPA</b>
<b>1</b>	1	1	1
<b>2</b>	1	1	1
<b>3</b>	1	1	1
<b>4</b>	2	2	2
<b>5</b>	2	2	2
<b>6</b>	1	1	1
<b>7</b>	1	2	2
<b>8</b>	2	2	2
<b>9</b>	2	2	2
<b>10</b>	1	1	1

11	1	1	1
12	1	1	1
13	1	2	2
14	1	1	1
15	2	2	2
16	2	2	2
17	1	1	1
18	1	1	1
19	1	1	1
20	1	1	1
21	2	2	2
22	1	1	1
23	1	1	1
24	2	2	2
25	1	1	1
26	2	2	2
27	1	1	1
28	1	1	1
29	1	1	1
30	2	2	2
31	2	2	2
32	1	1	1
33	1	1	1
34	1	1	1
35	1	1	1
36	1	1	1
37	1	1	1
38	2	2	2
39	1	1	1
40	2	2	2
41	1	1	1
42	2	2	2
43	1	1	1
44	2	2	2
45	1	1	1
46	2	2	2
47	1	1	1
48	2	2	2
49	2	2	2
50	2	2	2
51	1	1	1
52	2	2	2



53	1	1	1
54	2	2	2
55	1	1	1
56	2	2	2
57	2	2	2
58	2	2	2
59	2	1	1
60	2	1	1
61	2	1	1
62	2	2	2
63	2	2	2
64	1	1	1
65	2	2	2
66	2	1	1
67	2	2	2
68	2	1	1
69	2	2	1
70	2	2	2
71	2	1	1
72	2	2	2
73	2	2	2
74	2	1	1

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων με τη μέθοδο RB συνοψίζεται στον πίνακα 4.1

#### 3.1.4 Συσχέτιση μεθόδου RB με τη μέθοδο CFT για την Ομάδα 1

	%	95% CI
PPV	94,3	80,8-99,3
NPV	82,1	66,5-92,5
Se	82,5	67,2-92,7
Sp	94,1	80,3-99,3

kappa value	p-value
0,758	<0,001

PPV: θετική προγνωστική αξία, NPV: αρνητική προγνωστική αξία, Se: Ευαισθησία, Sp: Ειδικότητα, kappa value : δείκτης συμφωνίας

Αντίστοιχα, η ανάλυση των αποτελεσμάτων της μεθόδου FPA στην ομάδα 1, ακολουθεί στον πίνακα 4.2

### 3.1.5 Συσχέτιση μεθόδου FPA με τη μέθοδο CFT για την Ομάδα 1

	%	95% CI
<b>PPV</b>	97,6	87,1-99,9
<b>NPV</b>	100,0	89,4-100,0
<b>Se</b>	100,0	91,2-100,0
<b>Sp</b>	97,1	84,7-99,9

<b>kappa value</b>	<b>p-value</b>
0,973	<0,001

**PPV:** θετική προγνωστική αξία, **NPV:** αρνητική προγνωστική αξία, **Se:** Ευαισθησία, **Sp:** Ειδικότητα, **kappa value :** δείκτης συμφωνίας

## 3.2 ΟΜΑΔΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ 2

Η Ομάδα 2 αποτελείται συνολικά από δείγματα 28 ανθρώπων.

Πραγματοποιήθηκε εξέταση 28 δειγμάτων με τη μέθοδο CFT για τη διάγνωση της βρουκέλλωσης. Τα 11 δείγματα από αυτά, εμφανίστηκαν θετικά στη δοκιμή ενώ τα υπόλοιπα 17 εμφανίστηκαν αρνητικά. Με βάση και πάλι το θετικό αποτέλεσμα στη μέθοδο CFT, από τα 28 δείγματα που εξετάσαμε με τις μεθόδους RB και FPA, θεωρήσαμε τα 11 από αυτά ότι προέρχονται από ασθενείς και τα 17 από υγιείς ανθρώπους.

Κατά την εξέταση των δειγμάτων με τη μέθοδο RB για τη διάγνωση της βρουκέλλωσης, βρέθηκαν 5 θετικά και 23 αρνητικά δείγματα. Από τα θετικά δείγματα ανθρώπων στην RB, 5 εξ αυτών προέρχονται από περιστατικά που νοσούν. Από τα αρνητικά δείγματα ανθρώπων στην RB, τα 6 περιστατικά νοσούν ενώ τα υπόλοιπα 22 δεν εμφανίζουν βρουκέλλωση. Τα αποτελέσματα διακρίνονται στον πίνακα 3.3 που ακολουθεί.

### 3.2.1 Αποτελέσματα RB στην Ομάδα 2

<b>Βρουκέλλωση</b>			
<b>Δοκιμή RB</b>	<b>ΝΑΙ</b>	<b>ΟΧΙ</b>	<b>Σύνολο</b>
<b>RB θετικά</b>	5	0	5
<b>RB αρνητικά</b>	6	17	23
Σύνολο	11	17	28

Κατά την εξέταση των δειγμάτων με τη μέθοδο FPA για τη διάγνωση της βρουκέλλωσης, βρέθηκαν 12 θετικά και 16 αρνητικά δείγματα. Από τα θετικά δείγματα ανθρώπων στην FPA, τα 8 περιστατικά εμφανίζουν τη νόσο και τα υπόλοιπα 4 δεν την εμφανίζουν. Από τα αρνητικά δείγματα ανθρώπων στην FPA, 3 από αυτά τα περιστατικά νοσούν ενώ στα υπόλοιπα 13 απουσιάζει το συγκεκριμένο νόσημα. Τα αποτελέσματα διακρίνονται στον πίνακα 3.4 που ακολουθεί.

### 3.2.2 Αποτελέσματα FPA στην Ομάδα 2

<b>Βρουκέλλωση</b>			
<b>Δοκιμή FPA</b>	<b>ΝΑΙ</b>	<b>ΟΧΙ</b>	<b>Σύνολο</b>
<b>FPA θετικά</b>	8	4	12
<b>FPA αρνητικά</b>	3	13	16
Σύνολο	11	17	28

Τα αποτελέσματα των εξετάσεων για κάθε δείγμα ξεχωριστά περιλαμβάνονται στον πίνακα 3.6, όπου τα δείγματα κωδικοποιούνται με αύξοντα αριθμό από το 1 έως το 28. Το θετικό αποτέλεσμα εκφράζεται με τον αριθμό 1 και το αρνητικό αποτέλεσμα με τον αριθμό 2.

### 3.2.3 Αναλυτικά αποτελέσματα Ομάδας 2 στις δοκιμές RB, CFT και FPA

A/A	RB	CFT	FPA
1	1	1	1
2	2	2	2
3	2	2	2
4	2	2	2
5	2	2	2
6	2	1	1
7	1	1	1
8	1	1	1
9	2	2	2
10	2	2	2
11	2	2	2
12	2	2	2
13	1	1	1
14	2	1	1
15	2	2	2
16	2	2	2
17	2	1	1
18	2	2	2
19	2	1	1
20	2	2	2
21	2	1	1
22	2	1	1
23	2	2	2
24	2	2	2
25	2	2	1
26	2	2	2
27	1	1	1
28	2	2	2

Όσον αφορά την ομάδα δειγμάτων 2 , η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων με τη μέθοδο RB συνοψίζεται στον πίνακα 4.3 και η αντίστοιχη ανάλυση με την εφαρμογή της δοκιμής FPA στον πίνακα 4.4 οι οποίοι παρατίθενται ακριβώς από κάτω.

### 3.2.4 Συσχέτιση μεθόδου RB με τη μέθοδο CFT για την Ομάδα 2

	%	95% CI
PPV	100,0	47,8-100,0
NPV	73,9	51,6-89,8
Se	45,5	16,8-76,6
Sp	100,0	89,5-100,0

kappa value	p-value
0,503	0,002

PPV: θετική προγνωστική αξία, NPV: αρνητική προγνωστική αξία, Se: Ευαισθησία,  
Sp: Ειδικότητα, kappa value : δείκτης συμφωνίας

### 3.2.5 Συσχέτιση μεθόδου FPA με τη μέθοδο CFT για την Ομάδα 2

	%	95% CI
PPV	91,7	61,5-99,8
NPV	100,0	79,4-100,0
Se	100,0	71,5-100,0
Sp	94,1	71,3-99,9

kappa value	p-value
0,926	<0,001

PPV: θετική προγνωστική αξία, NPV: αρνητική προγνωστική αξία, Se: Ευαισθησία,  
Sp: Ειδικότητα, kappa value : δείκτης συμφωνίας

# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4<sup>ο</sup>

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

---

### 4.1 ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΜΕ ΑΝΑΛΟΓΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ

Η διαγνωστική αξία των δοκιμών RB και FPA αξιολογήθηκε κατά περίπτωση σύμφωνα με την Ευαισθησία (Eu) και την Ειδικότητα (Ei) που παρουσίασαν.

Η μέθοδος FPA έχει αξιολογηθεί στο παρελθόν σε ανάλογες μελέτες για τη διάγνωση της βρουκέλλωσης και παρουσίασε  $Eu = 93,5\%$  και  $Ei = 96,1\%$ . Αντίστοιχα, σε μελέτες που πραγματοποιήθηκαν για τη μέθοδο RB παρατηρήθηκε  $Eu = 87,4\%$  και  $Ei = 100\%$  ενώ υπήρξε μείωση της ευαισθησίας της μεθόδου σε περιστατικά χρόνιας μορφής που κυμαινόταν από 54 έως 61%. Κατά τη διεξαγωγή της παρούσας μελέτης υπήρξε συμφωνία με τα αποτελέσματα προηγούμενων μελετών αναφορικά με την ευαισθησία και την ειδικότητα της μεθόδου FPA. Μικρή απόκλιση και ειδικότερα μικρότερα ποσοστά ευαισθησίας και ειδικότητας εμφάνισε η εφαρμογή της RB στην παρούσα μελέτη. Ωστόσο υπήρξε πλήρης συμφωνία κατά τη σημαντική μείωση της ευαισθησίας της RB που παρατηρείται σε χρόνιες μορφές της νόσου, όπως αποδεικνύεται από προηγούμενες μελέτες.

### 4.2 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΜΕΛΕΤΗΣ

Στην ομάδα δειγμάτων 1, όπου συμμετείχαν περιστατικά ανθρώπων χωρίς προηγούμενη μόλυνση, η μέθοδος FPA εμφανίζει μεγαλύτερη διαγνωστική αξία με  $Eu = 100\%$  και  $Ei = 97,1\%$ . Η εφαρμογή της διαγνωστικής μεθόδου RB στην ίδια ομάδα δειγμάτων παρουσίασε  $Eu = 82,5\%$  και  $Ei = 94,1\%$ . Με βάση λοιπόν τα στοιχεία της συγκεκριμένης πειραματικής μελέτης καταλήγουμε στο συμπέρασμα πως η FPA φαίνεται ως η πιο αξιόπιστη μέθοδος για τη διάγνωση νέων κρουσμάτων βρουκέλλωσης στον άνθρωπο σε σχέση με τη μέθοδο RB. Η σύγκριση της ευαισθησίας και της ειδικότητας των μεθόδων για την Ομάδα 1 παρουσιάζεται στον πίνακα 4.2.1 που ακολουθεί.

#### 4.2.1 Σύγκριση δοκιμών στην Ομάδα 1

Δοκιμές	Ευαισθησία (%)	Ειδικότητα (%)
<b>RB</b> GROUP 1	82,5	94,1
<b>FPA</b> GROUP 1	100,0	97,1

Αναφορικά με την ομάδα 2 όπου εμπεριέχονται περιστατικά βρουκέλλωσης με επιβεβαιωμένη μόλυνση στο παρελθόν, για τη μέθοδο RB παρατηρήσαμε σημαντική πτώση της ευαισθησίας της μεθόδου. Συγκεκριμένα, στην ομάδα 2 η RB παρουσίασε Ευ = 45,5 % έναντι Ευ = 82,5 % που παρατηρήθηκε στην Ομάδα 1. Σε υπόλοιπες μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί, η ευαισθησία της μεθόδου εμφανίζει μεγάλο εύρος. Το γεγονός ότι στην ομάδα 2 περιλαμβάνονται ασθενείς με τη χρόνια μορφή της βρουκέλλωσης επηρεάζει την ευαισθησία της RB διότι έχει ταυτοποιηθεί η ανίχνευση από αυτή των IgM μαζί με τα IgG αντισώματα. Στις χρόνιες μορφές της νόσου τα IgG αντισώματα παραμένουν σε υψηλά επίπεδα ενώ τα IgM μειώνονται με αποτέλεσμα να μειώνεται και η ευαισθησία της μεθόδου. Ακόμη έχει καταγραφεί από ερευνητές ότι σε χρόνιες μορφές της νόσου, η επώαση και ανάδευση στην ειδική πλάκα ανάγνωσης αποτελεσμάτων RB για το χρονικό διάστημα 4 λεπτών παρουσίασε χαμηλή ευαισθησία σε σχέση με την επώαση για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα. Τέλος, έχει αναφερθεί ότι ορισμένες περιπτώσεις ανθρώπων απαιτούν μεγαλύτερο χρόνο επώασης για να δώσουν θετικό αποτέλεσμα στη μέθοδο RB. Σύμφωνα με τα παραπάνω λοιπόν θα μπορούσαμε να δικαιολογήσουμε τη σημαντική πτώση της ευαισθησίας της RB στην ομάδα 2. Η σύγκριση της ευαισθησίας και της ειδικότητας των μεθόδων για την Ομάδα 2 παρουσιάζεται στον πίνακα 4.2.2 που ακολουθεί.

#### 4.2.2 Σύγκριση δοκιμών στην Ομάδα 2

Δοκιμές	Ευαισθησία (%)	Ειδικότητα (%)
<b>RB</b> GROUP 2	45.5	100.0
<b>FPA</b> GROUP 2	100.0	94.1

Στην Ομάδα 2 συμπεριλήφθησαν περιστατικά για τα οποία γίνεται παρακολούθηση της πορείας των αποτελεσμάτων των ορολογικών δοκιμών που εφαρμόζονται από το Εθνικό Εργαστήριο Αναφοράς της Βρουκέλλωσης. Πράγματι θα ανέμενε κανείς τα αποτελέσματα των εργαστηριακών δοκιμών των ασθενών που έχουν ολοκληρώσει τη θεραπευτική τους αγωγή να είναι αρνητικά. Τα θεραπευτικά πρωτόκολλα των ασθενών δεν ήταν διαθέσιμα ώστε να συμπεριληφθούν στη μελέτη. Ωστόσο αξίζει να αναφερθούμε σε αντίστοιχη μελέτη που πραγματοποιήθηκε στην Αίγυπτο, Marei et al, όπου με βάση την απομόνωση του βακτηρίου *Brucella* με τη μέθοδο PCR, αποδεικνύεται η παρουσία του τόσο κατά τη διάρκεια όσο και μετά το πέρας της

θεραπείας. Το γεγονός αυτό δικαιολογεί τα θετικά αποτελέσματα των ορολογικών δοκιμών στην Ομάδα 2, αφού η παρουσία του βακτηρίου στον οργανισμό ενεργοποιεί την παραγωγή αντισωμάτων. Σε αντίστοιχη μελέτη που πραγματοποιήθηκε στην Ελλάδα, εφαρμόστηκε η μέθοδος PCR σε ασθενείς που είχαν ολοκληρώσει τη φαρμακευτική τους αγωγή και παρατηρήθηκε βακτηριαιμία ακόμη και σε χρονικό διάστημα 1 έτους από τη θεραπεία.

Τόσο στην εφαρμογή των δοκιμών RB και FPA στην Ομάδα 1 όσο και στην Ομάδα 2, η τιμή της  $p$  – value ήταν μικρότερη του 0,05. Συνεπώς δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στη σχέση της κάθε δοκιμής με το κριτήριο θετικότητας του νοσήματος και στις 2 ομάδες που εφαρμόστηκαν οι δοκιμές.

Η ανάλυση kappa έδειξε ότι η μέθοδος FPA έρχεται σε πολύ υψηλό βαθμό συμφωνίας με την κατάσταση παρουσίας του νοσήματος και συγκεκριμένα με τη μέθοδο CFT. Στην Ομάδα 1 η μέθοδος FPA είχε kappa value = 0,973 και στην Ομάδα 2 είχε kappa value = 0,926, με τις τιμές kappa που κυμαίνονται από 0,8 έως 1 να ερμηνεύονται ως πολύ ισχυρή συμφωνία.

Αξίζει να σημειωθεί ότι τουλάχιστον σε 3 περιπτώσεις, παραπέμφθηκαν προληπτικά για εξέταση άτομα που στο παρελθόν συγγενικό τους πρόσωπο είχε μολυνθεί, χωρίς τα ίδια να εμφανίζουν έντονα συμπτώματα πλην κεφαλαλγίας ή οσφυαλγίας. Το αποτέλεσμα των δοκιμών ήταν θετικό και στις 3 αυτές περιπτώσεις.

Όσον αφορά τη διαδικασία διεξαγωγής των δοκιμών για τη συγκεκριμένη μελέτη, η RB υπερτερεί κατά πολύ σε σχέση με τις υπόλοιπες δοκιμές. Συγκεκριμένα, η RB είναι μια ταχεία δοκιμή, χαμηλού κόστους και εξαιρετικά απλή στην εφαρμογή της σε αντίθεση με την πολύπλοκη δοκιμή CFT όπου μάλιστα απαιτείται ποικιλία αντιδραστηρίων και τιτλοποίηση αυτών. Η μέθοδος FPA είναι επίσης μια σύντομη και εύκολη δοκιμή και απαιτεί μόνο σχολαστικότητα κατά την προετοιμασία των δειγμάτων.

Συμπερασματικά, η μέθοδος FPA είναι αξιόπιστη και έχει υψηλή διαγνωστική αξία για το νόσημα της βρουκέλλωσης τόσο σε οξείες όσο και σε χρόνιες μορφές. Η διαδικασία εφαρμογής της μεθόδου δεν εμφανίζει βαθμό δυσκολίας ενώ παρακάμπτεται το εμπόδιο της υποκειμενικής ανάγνωσης των αποτελεσμάτων που συναντάμε στις τεχνικές RB και CFT, καθώς γίνεται υπολογισμός των τιμών με χρήση ηλεκτρονικού αναλυτή. Ακόμη, η μέθοδος εξυπηρετεί την ανάλυση πολυάριθμων δειγμάτων σε ημερήσια βάση ενώ το κόστος της μεθόδου δεν είναι απαγορευτικό. Συμπεραίνουμε λοιπόν, με βάση προηγούμενες αναφορές αλλά και με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, ότι η μέθοδος FPA θα μπορούσε να ενταχθεί σε επίπεδο ρουτίνας στις τεχνικές διάγνωσης του νοσήματος της βρουκέλλωσης.



# ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

---

## ΞΕΝΗ

**Al Dahouk S, Tomaso H, Nockler K, Neubauer H, Frangoulidis D (2003)** Laboratory-based diagnosis of brucellosis--a review of the literature. Part II: serological tests for brucellosis. *Clin Lab* 49: 577-589.

**Aliskan H.** The value of culture and serological methods in the diagnosis of human brucellosis. *Mikrobiyol Bull. (Turkey)* 2008; 423(1): 185–195.

**Alton, G. G., Jones, L. M., Angus, R. D. & Verger, J. M. (1988).** Serological methods. In Techniques for the Brucellosis Laboratory, Paris: *Institut National de la Recherche Agronomique*.

**Alton GG, Jones LM, Angus RD, Verger JM (1998).** Techniques for the brucellosis laboratory. *Institut National de la Recherche Agronomique, Paris*

**Alton GG, Jones LM, Pietz DE (1975)** *Laboratory techniques in brucellosis, 2nd edition*. World Health Organization Monograph Series No. 55. Geneva:WHO

**Assad AM, Alqahtani JM (2012)** Serological and molecular diagnosis of human brucellosis in Najran, Southwestern Saudi Arabia. *J Infect Public Health* 5: 189-194.

**Ayman Marei, Ghada Boghdadi, Nahla Abdel-Hamed, Rasha Hessin, Theresia Abdoel, Henk Smits, and Fayza Fathey (2011)** Laboratory diagnosis of human brucellosis in Egypt and persistence of the pathogen following treatment *J Infect Dev Ctries* 2011; 5(11):786-791.

**Casanova A, Ariza J, Rubio M, Masuet C, Dí'az R (2009)** Brucellacapt vs. classical tests in the serological diagnosis and management of human brucellosis. *Clin Vaccine Immunol* 16: 844–851.

**Cassar P. (1991)** History of human brucellosis in Malta. Prevention of Brucellosis in the Mediterranean Countries – Proceedings of a International Seminar. Malta. **CIHEAM Publication No. 1, 1992**

**Celli J (2006)** Surviving inside a macrophage: the many ways of *Brucella*. *Res Microbiol* 157: 93-98.

**Corbell MJ (1975)** The serological relationship between *Brucella* species, *Yersinia enterocolytica* serotype IX and *Salmonella* serotypes of Kaufmann-White group. *J Hyg (Lond)* 75: 151-171.

**Corbell MJ** (1989) *Microbiology of the genus Brucella*. In: *Brucellosis: Clinical and laboratory aspects*. E.J. Young and M.J. Corbel (editors) : CRC Press. Inc. Boca Raton, Florida

**Diaz-Aparicio E, Martin C, Alonso-Urmeneta B, Aragon V, Perez-Ortiz S, Pardo M, Blasco JM, Diaz R, Moriyon I** (1994) Evaluation of serological tests for diagnosis of *Brucella melitensis* infection of goats. **J Clin Microbiol** **32**: 1159-1165.

**Elżbieta Monika Galińska, Jerzy Zagórski** (2013) Brucellosis in humans – etiology, diagnostics, clinical forms. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine** **2013, Vol 20, No 2, 233–238**

**Franco MP, Mulder M, Gilman RH, Smits HL** (2007) Human brucellosis. **Lancet Infect Dis** **7**: 775–786.

**Go´mez MC, Nieto JA, Rosa C, Geijo P, Escribano MA, et al.** (2008) Evaluation of seven tests for the diagnosis of human brucellosis in an endemic area. **Clin Vaccine Immunol** **15**: 1031–1033.

**Gul ST, Khan A** (2007) Epidemiology and epizootology of brucellosis: a review. **Pak Vet J** **27**: 145-151.

**Halling SM, Peterson-Burch BD, Bricker BJ, Zuerner RL, Quing Z, Li LL, et al.** Completion of the genome sequence of the *Brucella abortus* and comparison to the highly similar genomes of *Brucella melitensis* and *Brucella suis*. **J Bacteriol.** **2005; 187**: 2715–2726.

**Hadjichristodoulou Ch, Soteriades E, Goutzianna G, Loukaidou M, Babalis Th, Antoniou M, Delagramaticas J, Tselentis Y** (1999) Surveillance of brucellosis in a rural area of Greece: application of the Computerised Mapping Programme. **Eur J Epidemiol** **15**:277–283

**Irmak H, Buzgan T, Evirgen O, Akdeniz H, Demiroz AP, Abdoel TH, Smits HL** (2004) Use of the *Brucella* IgM and IgG flow assays in the serodiagnosis of human brucellosis in an area endemic for brucellosis. **Am J Trop Med Hyg** **70**: 688-694

**Jordi Serra, Miquel Viñas** (2004). Laboratory diagnosis of brucellosis in a rural endemic area in northeastern Spain, **International Microbiology**

**Konstantinidis A, Minas A, Pournaras S, Kansouzidou A, Papastergiou P, et al.** (2007) Evaluation and comparison of fluorescence polarization assay with three of the currently used serological tests in diagnosis of human brucellosis. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis** **26**: 715–721.

**Liang L, Leng D, Burk C, Sasaki RN, Kayala MA, Atluri VL, Pablo J, Unal B, Ficht TA, Gotuzzo E, Saito M, Morrow WJ, Liang X, Baldi P, Gilman RH, Vinetz JM, Tsolis RM, Felgner PL** (2010) Large scale immune profiling of infected humans and goats reveals differential recognition of *Brucella melitensis* antigens. **PloS Negl Trop Dis** **4**: e673. doi:10.1371/journal.pntd.0000673.

**Lucero NE, Escobar GI, Ayala SM, Paulo PS, Nielsen K (2003)** Fluorescence polarization assay for diagnosis of human brucellosis. **J Med Microbiol** **52:883–887**

**Maichomo MW, McDermott JJ, Arimi SM, Gathura PB (1998)** Assessment of the Rose-Bengal plate test for the diagnosis of human brucellosis in health facilities in Narok district, Kenya. **East Afr Med J** **75: 219–222.**

**Mantecon Mde L, Gutierrez MP, Zarrosa Mdei P, Fernandez-Lago L, Colmenero Jde D, Vircaino N, et al.** Influence of brucellosis history on serological diagnosis and evolution of patients with acute brucellosis. **J Infect.** **2008; 57(5): 397–403.**

**Mohamed G Elfaki, Alwaleed Abdullah Alaidan, Abdullah Abdulrahman Al-Hokail (2015)** Host response to *Brucella* infection: review and future perspective. **J Infect Dev Ctries** **2015; 9(7):697-701. doi:10.3855/jidc.6625**

**Nidia E. Lucero, Gabriela I. Escobar, Sandra M. Ayala, Patricia Silva Paulo, Klaus Nielsen (2003)** Fluorescence polarization assay for diagnosis of human brucellosis, **J. Med. Microbiol.**

**Nielsen, K, Gall D. (2001):** Fluorescence Polarization assay for the diagnosis of brucellosis : A review. **Journal of Immunoassay and Immunochemistry.** **22:183-201**

**Nielsen, K., Lin, M., Gall, D. & Jolley, M. (2000).** Fluorescence polarization immunoassay: detection of antibody to *Brucella abortus*. **Methods**

**Pappas, G., N. Akritidis, M. Bosilkovski, and E. Tsianos. (2005).** Brucellosis. **N. Engl. J. Med.** **352:2325–2336.**

**Ramo'n D'íaz, Aurora Casanova, Javier Ariza, Ignacio Moriyo'n (2011)** The Rose Bengal Test in Human Brucellosis: A Neglected Test for the Diagnosis of a Neglected Disease. **PLoS Negl Trop Dis** **5(4): e950. doi:10.1371/journal.pntd.0000950**

**Ruiz-Mesa JD, Sa´nchez-Gonza´lez J, Reguera JM, Marti´n L, Lo´pez-Palmero S, et al. (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: 221–225.**

**Sisirak M, Hukic M (2009)** Evaluation and importance of selected microbiological methods in the diagnosis of human brucellosis. **Bosn J Basic Med Sci** **9: 198–203.**

**Seimenis A, Morelli D, Mantovani A (2006)** Zoonoses in the Mediterranean region. **Ann Ist Super Sanita** **42: 437–445.**

**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**

## **ΔΙΑΔΥΚΤΙΑΚΕΣ ΠΗΓΕΣ**

<http://www2.keelrno.gr> / προσπελάστηκε 12/10/2015

<http://www.who.int/en> προσπελάστηκε 12/10/2015

# **Serologic diagnosis of brucellosis and follow up in the area of Thessaly, Greece**

## **ABSTRACT**

The clinical image of brucellosis as a human disease is much varied and non-specific, creating great diagnostic problems. Therefore, laboratory investigation is required among with patients' history and symptoms, otherwise brucellosis cannot be ruled out of the differential diagnosis. Serological methods seem to be very useful in diagnosing brucellosis as far as recent studies recommend, especially Rose Bengal Test and Complement Fixation Test. During the following trial we determine the diagnostic value of methods Rose Bengal and Fluorescence Polarization Assay Test by using 102 serum samples received from potential patients. More specific, we evaluated the serological methods in the diagnosis of human brucellosis in newly infected patients and in follow up reexamination of patients with chronic forms. For our purpose, we formed 2 Groups and each method was evaluated separately for each Group. As positive controls, all samples were tested by Complement Fixation Test. In this study, FPA was highly sensitive and highly specific in acute (Group1) and long evolution brucellosis cases (Group 2). According to our results, the speed and simplicity of the method and the objectivity of results interpretation, FPA could easily take place as a routine diagnostic method of human brucellosis

**Keywords:** brucellosis, RB, FPA