

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΥΓΙΕΙΝΗΣ ΚΑΙ ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΥΓΙΕΙΝΗ**

**«Ανασκόπηση των δοκιμών για την ανίχνευση αντισωμάτων κατά
Brucella spp σε γάλα βοοειδών»**

**Αθανάσιος Μαυρίδης,
του Κωνσταντίνου**

Κτηνίατρος

2017

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΥΓΙΕΙΝΗΣ ΚΑΙ ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΥΓΙΕΙΝΗ

**«Ανασκόπηση των δοκιμών για την ανίχνευση αντισωμάτων κατά
Brucella spp σε γάλα βοοειδών»**

Αθανάσιος Μαυρίδης, DVM

Τριμελής Επιτροπή:

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια:

Πεξαρά Ανδρέα: Επίκουρη καθηγήτρια, Υγιεινή Τροφίμων Ζωική Προέλευσης,
Τμήμα Κτηνιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Μέλη Τριμελούς Επιτροπής:

Σολωμάκος Νικόλαος: Επίκουρος καθηγητής Υγιεινή Τροφίμων Ζωική Προέλευσης,
Τμήμα Κτηνιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Δρ. Στουρνάρα Αθανασία: Διδάκτωρ μικροβιολογίας, Εθνικό Εργαστήριο Αναφοράς
Βρουκέλλας, Λάρισα.

Στους γονείς μου,
Αλεξάνδρα και Κωνσταντίνο

Στον αδερφό μου,
Λάζαρο

Στην Κική

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΥΓΙΕΙΝΗΣ ΚΑΙ ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΥΓΙΕΙΝΗ

«Ανασκόπηση των ορολογικών δοκιμών για την ανίχνευση αντισωμάτων κατά *Brucella* spp σε γάλα βοοειδών»

Αθανάσιος Μαυρίδης, Κτηνίατρος

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η βρουκέλλωση είναι λοιμώδης νόσημα με παγκόσμια εξάπλωση. Προκαλείται από βακτήρια του γένους *Brucella*. Έχουν αναγνωριστεί 11 είδη του βακτηρίου, ενώ ορισμένα από αυτά έχουν διαφορετικούς βιοτύπους. Έχουν την τυπική μορφή και δομή των Gram αρνητικών βακτηρίων και δεν φέρουν πλασμίδια. Το κυτταρικό τους τοίχωμα φέρει μία σειρά συστατικών που δρουν ως αντιγόνα (λιποπολυσακχαρίτης, πολυσακχαρίτης Β, απτένια, λιπίδια). Καταστρέφονται από κοινά απολυμαντικά, την παστερίωση, τους φάγους και τα αντιβιοτικά, ενώ αντίθετα εμφανίζουν ανθεκτικότητα σε συνθήκες pH>4, χαμηλή θερμοκρασία, υψηλή υγρασία και προστασία από την άμεση ηλιακή ακτινοβολία.

Λίγες είναι οι περιοχές που έχουν χαρακτηριστεί ως ελεύθερες βρουκέλλωσης και περιλαμβάνουν τη βόρεια, κεντρική και ανατολική Ευρώπη, την Αυστραλία, τον Καναδά, την Ιαπωνία και την Νέα Ζηλανδία. Η νόσος έως και σήμερα απαντάται στην Βόρεια Ιρλανδία, σε όλες τις χώρες της Μεσογείου, καθώς και στα Βαλκάνια. Στην Ελλάδα το νόσημα έχει ενδημικό χαρακτήρα.

Οι κυριότερες αποθήκες-πηγές της *Brucella* είναι τα βοοειδή (*B. abortus*), τα πρόβατα και οι αίγες (*B. melitensis*) καθώς και οι χοίροι (*B. suis*). Τα μολυσμένα ζώα απελευθερώνουν τον παθογόνο παράγοντα στο περιβάλλον με εκκρίσεις του γεννητικού συστήματος (ιστό μήτρας, λόχεια, αποβληθέντα υλικά, κολπικές εκκρίσεις), ούρα και τα κόπρανα. Η άμεση ή έμμεση επαφή ενός ξενιστή με τα υλικά αυτά έχει σαν αποτέλεσμα την μόλυνση του. Ο άνθρωπος μολύνεται με την κατανάλωση μολυσμένης τροφής και νερού, μέσω λύσεων συνεχείας τους δέρματος ή μέσω των βλεννογόνων.

Η βρουκέλλωση είναι επαγγελματική νόσος. Περισσότερο κινδυνεύουν τα άτομα που έρχονται σε επαφή με μολυσμένη ζώα ή μολυσμένα υλικά (κτηνίατροι, κτηνοτρόφοι, εκδοροσφαγείς, σπερματεγχύτες). Η μετάδοση από άνθρωπο σε άνθρωπο σπάνια παρατηρείται. Πρόκειται για πολυσυστηματική νόσο με μεγάλο εύρος κλινικών συμπτωμάτων, ενώ υπάρχουν και ασυμπτωματικά περιστατικά. Μόλυνση κατά την εγκυμοσύνη μπορεί να οδηγήσει σε αποβολή του εμβρύου, τόσο στον άνθρωπο όσο και στα ζώα.

Επειδή η βρουκέλλωση είναι ένα νόσημα υψηλής σημασίας για την δημόσια υγεία δεν προβλέπεται θεραπεία στα παραγωγικά ζώα. Αντίθετα, αυτά οδηγούνται στο σφαγείο. Η θεραπεία στον άνθρωπο και τα ζώα συντροφιάς, περιλαμβάνει τη χρήση διαφορετικών σχημάτων αντιβιοτικών.

Λόγω της σημασίας της βρουκέλλωσης για τη δημόσια υγεία οι τρόποι πρόληψης του νοσήματος είναι ζωτικής σημασίας. Έτσι χρησιμοποιούνται εμβόλια για την ενεργητική ανοσοποίηση των παραγωγικών ζώων. Τα εμβόλια που χρησιμοποιούνται είναι ζωντανά κύτταρα ελαττωμένης λοιμογόνου δύναμης ενώ παράλληλα τίθενται σε ισχύ προγράμματα ελέγχου και εκρίζωσης της νόσου στα βοοειδή και τα αιγοπρόβατα.

Οι μέθοδοι διάγνωσης της νόσου χωρίζονται σε δύο κατηγορίες. Η πρώτη περιλαμβάνει τις μεθόδους άμεσης ανίχνευσης του βακτηρίου (μικροσκόπηση, καλλιέργεια, βιοχημικές και μοριακές μέθοδοι), και η δεύτερη περιλαμβάνει όλες τις μεθόδους έμμεσης ανίχνευσης του αιτιολογικού παράγοντα (ορολογικές δοκιμές-δοκιμή του δακτυλίου στο γάλα, έμμεση ανοσοενζυμική δοκιμή, δοκιμή ερυθρού της Βεγγάλης, σύνδεση συμπληρώματος), με την ανίχνευση των αντισωμάτων στον ορό αίματος και γάλακτος. Η μόνη αδιαμφισβήτητη μέθοδος για την διάγνωση της νόσου, είναι η απομόνωση των βακτηρίων μετά από καλλιέργεια και η επιβεβαίωση μέσω βιοχημικών δοκιμών. Αντίθετα οι ορολογικές δοκιμές μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παρακολούθηση της νόσου (screening), ενώ η χρήση δύο ή περισσότερων δοκιμών αυξάνουν την αξιοπιστία της διάγνωσης.

UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCES
FACULTY OF MEDICINE
POST-GRADUATE STUDIES PROGRAM IN
APPLIED PUBLIC HEALTH AND ENVIRONMENTAL HYGIENE

“Review of serological tests for detection of *Brucella* spp antibodies in bovine milk”

Athanasios Mavridis, Doctor of Veterinary Medicine

SUMMARY

Brucellosis is an infectious disease with worldwide spread. It is caused by bacteria of the *Brucella* genus. 11 species of the bacterium have been identified so far, while some of them have various biotypes. They have the typical form and structure of Gram negative bacteria, and they do not carry plasmids. The cell wall has a number of components that act as antigens (lipopolysaccharide, polysaccharide B, haptens, lipids). They are destroyed by common disinfectants, pasteurization, phages and antibiotics, while they are resistant to pH > 4, low temperature, high humidity and protection from direct sunlight.

Few areas in the world are free of brucellosis and those include northern, central and eastern Europe, Australia, Canada, Japan and New Zealand. The disease still occurs in Northern Ireland, in all Mediterranean countries, and in the Balkans. In Greece the disease is endemic.

The main reservoirs of *Brucella* are cattle (*B. abortus*), sheep and goats (*B. melitensis*) and pigs (*B. suis*). The contaminated animals release the pathogen in the environment by secretions of the genital system (uterine tissue, stools, aborted materials, vaginal secretions), urine and faeces. Direct or indirect contact of a host with these materials results in infection of the host. Humans are infected by eating contaminated food and water, through skin breakdowns or mucous membranes.

Brucellosis is as an occupational disease. It is more likely that people will be infected if they contact with infected animals or contaminated materials (veterinarians, breeders, butchers, inseminators). Human to human transmission is rare. This is a multi-systemic disease with a wide range of clinical symptoms, and there are asymptomatic cases as well. Infection during pregnancy may lead to miscarriage, both in humans and animals.

Because brucellosis is a major health issue for the public health, no treatment is given to productive animals. Instead, they are led to the slaughterhouse. Treatment on the other hand, in humans and animals, involves the use of multiple antibiotics.

Due to the importance of brucellosis for the public health, any ways of preventing the disease are vital. Thus, vaccines are used for the immunization of productive animals. Those vaccines are live cells of reduced virulence while control and eradication programs of the disease are put in place, both for bovine and ovine species.

The methods of diagnosing the disease are divided into two categories. The first one includes the direct detection of the bacteria (microscopy, culture, biochemical and molecular methods), and the second includes all methods of indirect detection of the causative agent (serological tests- Milk ring test, indirect Enzyme Linked Immunosorbent Assay, Rose Bengal Test, Complement Fixation Test) by detecting antibodies in blood and milk serum. The only undeniable method for the diagnosis of the disease is the isolation of the bacteria after the use of culture and then the use of biochemical methods to confirm the biotype. On the other hand, serological tests may be used for screening, while the use of two or more methods increase the reliability of the diagnosis.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

A. ΠΡΟΛΟΓΟΣ	i
B. ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΠΙΝΑΚΩΝ ΚΑΙ ΕΙΚΟΝΩΝ	iv
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1	1
ΒΡΟΥΚΕΛΛΩΣΗ: ΑΙΤΙΟ ΚΑΙ ΝΟΣΗΜΑ	1
1.1 ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ.....	1
1.2 ΤΟ ΓΕΝΟΣ	4
1.2.1 Ταξινόμηση	4
1.2.2 Δομή και μορφή.....	6
Πρωτεΐνες της εξωτερικής	9
1.3 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΟΥ ΒΑΚΤΗΡΙΟΥ	10
1.3.1 Μεταβολισμός	10
1.3.2 Ανθεκτικότητα.....	11
1.3.3 Ευαισθησία.....	12
1.4 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ, ΕΠΙΖΩΟΤΙΟΛΟΓΙΑ-ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ.....	13
1.4.1 Επιδημιολογία.....	13
1.4.2 Πηγές μόλυνσης.....	14
1.4.3 Τρόποι μετάδοσης.....	14
1.4.4 Παθογένεια	15
1.4.5 Ανοσολογική απάντηση	17
1.5 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ	18
1.5.1 Η νόσος στον άνθρωπο	18
1.5.2 Η νόσος στα ζώα.....	19
1.6 ΘΕΡΑΠΕΙΑ.....	21
1.6.1 Παραγωγικά ζώα (βοοειδή, αιγοπρόβατα, χοίροι).....	21
1.6.2 Ζώα συντροφιάς (σκύλοι) και θαλάσσια θηλαστικά, άνθρωποι.....	22
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2	23
ΒΡΟΥΚΕΛΛΩΣΗ ΚΑΙ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ: ΠΡΟΛΗΨΗ ΚΑΙ ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ	23
2.1 ΠΡΟΛΗΨΗ ΚΑΙ ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ	24
2.1.1 Εμβόλια	24
2.1.2 Εμβόλια από <i>B. abortus</i> , στέλεχος S19.....	24
2.1.3 Εμβόλια από <i>B. abortus</i> , στέλεχος RB51	24
2.1.4 Εμβόλια από <i>B. melitensis</i> , στέλεχος REV-1	25
2.1.5 Εμβόλια από <i>B. suis</i> , στέλεχος S2	25
2.2 ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΑ ΕΛΕΓΧΟΥ ΚΑΙ ΕΚΡΙΖΩΣΗΣ	25
2.2.1 Πρόγραμμα αιγοπροβάτων	25
2.2.2 Πρόγραμμα βοοειδών	26

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3	28
ΜΕΘΟΔΟΙ ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ.....	28
3.1 Άμεση διάγνωση.....	28
3.1.1 Μικροσκόπηση	28
3.1.2 Καλλιέργεια.....	28
3.1.3 Βιοχημικές δοκιμές	29
3.1.4 Μοριακές μέθοδοι.....	33
3.2 Έμμεση διάγνωση.....	33
3.2.1 Δοκιμή του Ερυθρού της Βεγγάλης (Rose Bengal Test).....	34
3.2.2 Δοκιμή οροσυγκόλλησης ρυθμιστικού διαλύματος σε πλάκα (Buffered plate agglutination test).....	34
3.2.3 Δοκιμή οροσυγκόλλησης σε σωλήνα (Serum Tube Agglutination Test/Wright Test) 35	
3.2.4 Αναγωγικά μέσα (Reducing Agents)	35
3.2.5 Δοκιμή του δακτυλίου στο γάλα (Milk Ring Test).....	35
3.2.6 Δοκιμές καθίζησης (Precipitin Tests)	36
3.2.7 Δοκιμή σύνδεσης του συμπληρώματος (Complement Fixation Test)	36
3.2.8 Έμμεση ανοσοενζυμική δοκιμή (Indirect ELISA, iELISA).....	37
3.2.9 Ανταγωνιστική ανοσοενζυμική δοκιμή (Competitive ELISA, cELISA)	37
3.2.10 Δοκιμή πόλωσης του φθορίζοντος φωτός (Fluorescence Polarization Assay, FPA) 38	
3.2.11 Άλλες δοκιμές, λιγότερο διαδεδομένες	38
3.2.12 Σύγκριση μεθόδων	39
3.2.13 Συμπεράσματα.....	41
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	42

A. ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η βρουκέλλωση είναι λοιμώδης νόσημα με παγκόσμια εξάπλωση που προκαλείται από βακτήρια του γένους *Brucella*. Στο γένος αυτό έχουν αναγνωριστεί έντεκα είδη, τα οποία ενώ προσβάλλουν συγκεκριμένα είδη ζενιστών, κάτω από κατάλληλες συνθήκες μπορούν να μολύνουν πολλαπλά είδη. Από το γένος αυτό, τα πιο σημαντικά είδη είναι τα *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis* καθώς είναι ευρέως διαδεδομένα στο κόσμο και μεταδίδονται εύκολα και στον άνθρωπο (WHO, 2006).

Το βακτήριο *Brucella* spp υπάρχει στον πλανήτη από τα προϊστορικά χρόνια. Έρευνες απέδειξαν ότι το βακτήριο μόλυνε ανθρωποειδή στην περιοχή της Αφρικής πριν από 5 εκατομμύρια χρόνια (Anastasio, 2009). Η πρώτη, ιστορικά, αναφορά στο νόσημα έγινε από τον Ιπποκράτη το 450 Π.Χ., ο οποίος περιέγραψε περιστατικά εμπύρετης νόσου με χαρακτηριστικά κυματοειδούς πυρετού σε άτομα που κατοικούσαν στα παράλια της Μεσογείου (Radford, et al., 2004). Η απομόνωση του βακτηρίου όμως πραγματοποιήθηκε από τον βρετανό χειρουργό David Bruce και τον μικροβιολόγο Giuseppe Scicluna, το 1887 στη Μάλτα (Bruce, 1887).

Λίγες είναι οι περιοχές ελεύθερες βρουκέλλωσης. Αυτές περιλαμβάνουν τη βόρεια, κεντρική και ανατολική Ευρώπη, την Αυστραλία, τον Καναδά, την Ιαπωνία και την Νέα Ζηλανδία. Η νόσος ακόμα απαντάται στην Βόρεια Ιρλανδία, σε όλες τις χώρες της Μεσογείου, καθώς και στα Βαλκάνια (Anses, 2014). Από τις χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης, τα 18 κράτη μέλη είναι επίσημα απαλλαγμένα. Σε τέσσερα κράτη υπάρχουν περιοχές που είναι ελεύθερες βρουκέλλωσης (Ιταλία, Πορτογαλία, Ισπανία, Ηνωμένο Βασίλειο), ενώ έξι μόνο μέλη θεωρούνται ενδημικά βρουκέλλωσης, ανάμεσα τους και η Ελλάδα (European Commission, 2014).

Η βρουκέλλωση έχει ιδιαίτερη σημασία για τη δημόσια υγεία. Προσβάλλει τον άνθρωπο, προκαλώντας χρόνια νόσο για την αντιμετώπιση της οποίας απαιτείται μακροχρόνια χορήγηση αντιβιοτικών. Στα ζώα, η νόσος προκαλεί οικονομικές απώλειες, καθώς μειώνεται η παραγωγή των ζώων, το ζωϊκό κεφάλαιο και σπαταλώνται μεγάλα ποσά για την διάγνωση της (WHO, 2006, CDC, 2012).

Έχουν γίνει πολλές προσπάθειες για να απαλλαχθεί η χώρα από την ασθένεια αυτή, χωρίς όμως επιτυχία εξαιτίας των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών του βακτηρίου και των οδών μετάδοσης του. Ένας από τους τρόπους μετάδοσης του βακτηρίου στον άνθρωπο, είναι η κατανάλωση νωπού μολυσμένου γάλατος. Με τον συνδυασμό των παραπάνω είναι εύλογο να δίνεται ιδιαίτερη σημασία στην υγιεινή του γάλατος που προέρχεται από τις ελληνικές εκτροφές, καθώς η βρουκέλλωση αποτελεί ζήτημα δημόσιας υγείας. Έτσι, σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η παρουσίαση του νοσήματος αυτού και οι μέθοδοι

διάγνωσης του, ιδιαίτερα στο γάλα βοοειδών, όπου χρησιμοποιούνται κυρίως ορολογικές μέθοδοι (δοκιμή δακτυλίου, έμμεση ανοσοενζυμική δοκιμή, πόλωση του φθορίζοντος φωτός (Nielsen & Yu, 2010). Για την καλύτερη κατανόηση του ζητήματος, η εργασία χωρίστηκε σε τρία μέρη.

Στο πρώτο κεφάλαιο γίνεται περιγραφή του αιτιολογικού παράγοντα και του νοσήματος που αυτό προκαλεί. Αρχικά αναφέρονται λεπτομερώς όλα τα ιστορικά στοιχεία που σχετίζονται με τον αιτιολογικό παράγοντα, η μέθοδος ταξινόμησης του μικροοργανισμού, η δομή, η μορφή και η αντιγονική δομή του βακτηρίου. Ακολουθούν τα μεταβολικά χαρακτηριστικά, καθώς και οι συνθήκες ανθεκτικότητας και ευαισθησίας του βακτηριακού κυττάρου. Έπειτα αναφέρεται η επιδημιολογία του νοσήματος, με έμφαση στις συνθήκες που επικρατούν στην Ευρωπαϊκή Ένωση, οι πηγές μόλυνσης, οι τρόποι μετάδοσης και η παθογένεια της νόσου καθώς και η ανοσολογική απόκριση του οργανισμού, μετά από μόλυνση με τον βακτηριακό παράγοντα. Τέλος περιγράφεται η κλινική εικόνα της νόσου σε ανθρώπους και ζώα καθώς και η προτεινόμενη θεραπεία-αντιμετώπιση για τα διάφορα είδη οργανισμών.

Στο δεύτερο κεφάλαιο αναφέρονται οι τρόποι προάσπισης της δημόσιας υγείας στο σύνολο της. Γίνεται περιγραφή των εμβολίων που χρησιμοποιούνται στα είδη των ζώων που εκτρέφονται στην Ελλάδα, ενώ παραθέτονται αναλυτικά τα προγράμματα ελέγχου και εκρίζωσης της νόσου, που βρίσκονται σε ισχύ, στα μηρυκαστικά.

Στο τρίτο κεφάλαιο περιγράφονται όλες οι μέθοδοι διάγνωσης του νοσήματος, τόσο στο γάλα που είναι μείζονος σημασίας για την δημόσια υγεία, όσο και στο αίμα. Αναφέρεται αναλυτικά η αρχή, τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματα της εκάστοτε δοκιμής, η μεθοδολογία των ευρέως χρησιμοποιούμενων δοκιμών και ο τρόπος εκτέλεσής τους. Τέλος γίνεται σύγκριση των ορολογικών μεθόδων διάγνωσης.

Για την εκπόνηση της εργασίας αυτής, καθοριστική ήταν η συμβολή της επίκουρης καθηγήτριας Υγιεινής Τροφίμων Ζωικής Προέλευσης κας Ανδρεάνας Πεξαράς για την επίμονη καθοδήγηση της, ενώ επιπρόσθετα συνέβαλε στη βελτίωση του τελικού κειμένου. Της εκφράζω τις θερμές ευχαριστίες μου.

Θερμές ευχαριστίες εκφράζω επίσης στον Επίκουρο Καθηγητή Υγιεινής Τροφίμων Ζωικής Προέλευσης κ. Νικόλαο Σολωμάκο και υπεύθυνη του εθνικού εργαστηρίου αναφοράς βρουκέλλωσης Δρ. Αθανασία Στουρνάρα για τις εύστοχες παρατηρήσεις που συνέβαλαν στην ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας. Ευχαριστώ ακόμα τον συνάδελφο και φίλο Σεραφείμ Χαϊντούτη, για τις καθοριστικές υποδείξεις και συμβουλές του.

Αισθάνομαι την υποχρέωση να ευχαριστήσω εκ βάθους καρδιάς τους γονείς μου και τον αδερφό μου, χωρίς τους οποίους δεν θα έφτανα σε αυτό το σημείο. Τέλος,

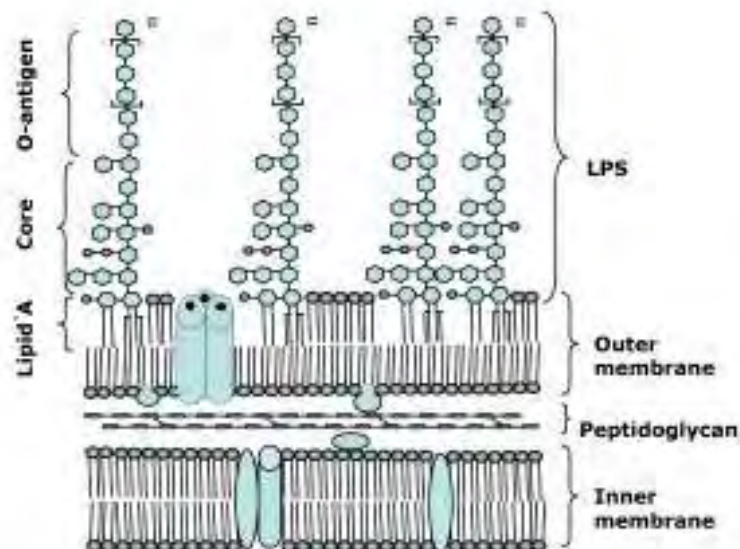
ευχαριστώ βαθύτατα την σύντροφο και φίλη μου Κυριακή Τσικαλά για την υποστήριξη και την αμέριστη συμπαράσταση της όλα τα χρόνια των σπουδών μου, τόσο στη κτηνιατρική σχολή όσο και στο μεταπτυχιακό.

Β. ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΠΙΝΑΚΩΝ ΚΑΙ ΕΙΚΟΝΩΝ

Πίνακας 1: Η ταξινόμηση των ειδών του γένους *Brucella* (Bergey & Holt, 1994),

Βασίλειο	<i>Bacteria</i>
Φύλο	<i>Proteobacteria</i>
Κλάση	<i>A- Proteobacteria</i>
Τάξη	<i>Rhizobiales</i>
Οικογένεια	<i>Brucellaceae</i>
Γένος	<i>Brucella</i>
Είδη	<i>B. melitensis</i>
	<i>B. abortus</i>
	<i>B. suis</i>
	<i>B. ovis</i>
	<i>B., neotomae</i>
	<i>B. canis</i>
	<i>B. pinnipedialis</i>
	<i>B. ceti</i>
	<i>B. microti</i>
	<i>B. inopinata</i>
<i>B. parvionis</i>	

σελίδα 4



Εικόνα 1: Δομή της εξωτερικής μεμβράνης των λείου τύπου στελεχών

Brucella (Cardoso, et al., 2006), σελίδα 7

Πίνακας 2: Είδη, βιότυποι, γεωγραφική εξάπλωση και πιθανοί ξενιστές (Nicoletti, 1989a, Raquet et al., 2001, ICSP, 2006, CFSPHa, 2009, CFSPHb, 2009, CFSPHc, 2009, CFSPHd, 2009, Whatmore et al., 2014), σελίδα 5

Είδος	Βιότυπος	Κύριος Ξενιστής	Γεωγραφική κατανομή	Άλλοι ξενιστές
1. <i>B. melitensis</i>	1,2,3	Πρόβατα, αίγες, άγρια μηρυκαστικά	Χώρες της Μεσογείου, Κεντρική Ασία, Μέση Ανατολή, Περσικός Κόλπος, Ινδία	Βοοειδή, καμήλες, σκύλοι, άλογα, χοίροι, άνθρωπος
2. <i>B. abortus</i>	1,2,3,4,5,6,7,9	Βοοειδή, καμήλες, ελάφια	Ευρώπη, Αμερική, Ασία, Νέα Ζηλανδία	Άλογα, αιγοπρόβατα, χοίροι ρακούν, σκύλοι, λύκοι, αλεπούδες, άνθρωπος
3. <i>B. suis</i>	1,2,3	Χοίροι, Αγριόχοιροι	Παγκόσμια εξάπλωση	Βοοειδή, αλεπούδες, λύκοι, άλογα, αιγοπρόβατα, άνθρωπος
	4	Ελάφια	Αλάσκα, Ρωσία, Καναδάς	
	5	Τρωκτικά	Χώρες της πρώην Σοβιετικής Ένωσης	
4. <i>B. ovis</i>		Αιγοπρόβατα	Αυστραλία, Νέα Ζηλανδία, Αμερική, νότια Αφρική, Ευρώπη	Μόνο πειραματική μόλυνση έχει αναφερθεί
5. <i>B. neotomae</i>		Τρωκτικά	Δυτικές ΗΠΑ	Δεν έχουν αναφερθεί
6. <i>B. canis</i>		Σκύλοι	Παγκόσμια εξάπλωση	Άνθρωπος
7. <i>B. pinnipedialis</i>		Φώκιες	Βόρειος Ατλαντικός ωκεανός, Μεσόγειος θάλασσα	Πιθανή μόλυνση οργανισμών της ξηράς. Πειραματική μόλυνση σε αιγοπρόβατα και ινδικά χοιρίδια
8. <i>B. ceti</i>		Δελφίνια, Φάλαινες		
9. <i>B. microti</i>		Αρουραίοι	Απομόνωση στη Τσεχία	Δεν έχουν αναφερθεί
10. <i>B. inopinata</i>		Άγνωστο, πιθανώς τρωκτικά	Απομόνωση από ανθρώπους	Άνθρωπος
11. <i>B. rapionis</i>		Μπαμπούνοι	Εργαστηριακή απομόνωση στις ΗΠΑ	Δεν έχουν αναφερθεί

Πίνακας 3: Είδη, βιότυποι και στελέχη αναφοράς του γένους *Brucella* (ICSP, 2006, Foster, et al., 2007, Scholz, et al., 2008, Scholz, et al., 2010, Whatmore, et al., 2014), σελίδα 5

Είδος	Βιότυπος	Όνομα στελέχους	Στελέχη αναφοράς
1. <i>B. melitensis</i>	1	16M	NCTC 10094, ATCC 23456
	2	63/9	NCTC 10508, ATCC 23457
	3	Ether	NCTC 10509, ATCC 23458
2. <i>B. abortus</i>	1	544	NCTC 10093, ATCC 23448
	2	86/8/59	NCTC 10501, ATCC 23449
	3	Tulya	NCTC 10502, ATCC 23450
	4	292	NCTC 10503, ATCC 23451
	5	B3196	NCTC 10504, ATCC 23452
	6	870	NCTC 10505, ATCC 23453
	7	63/75	NCTC 10506, ATCC 23454
	8	Διαγράφηκε το 1978 από την υποεπιτροπή ταξινόμησης	
	9	C68	NCTC 10507, ATCC 23455
3. <i>B. suis</i>	1	1330	NCTC 10316, ATCC 23444
	2	Thomsen	NCTC 10510, ATCC 23445
	3	686	NCTC 10511, ATCC 23446
	4	40	NCTC 11364, ATCC 23447
	5	513	NCTC 11996
4. <i>B. ovis</i>		63/290	NCTC 10512, ATCC 25840
5. <i>B. neotomae</i>		5K33	NCTC 10084, ATCC 23459
6. <i>B. canis</i>		RM6/66	NCTC 10854, ATCC 23365
7. <i>B. pinnipedialis</i>		BCCN 94-73	NCTC 12890
8. <i>B. ceti</i>		BCCN 94-74	NCTC 12891
9. <i>B. microti</i>		CCM 4915	BCCN 07-01, CAPM 6434
10. <i>B. inopinata</i>		BO1	BCCN 09-01, CAPM 6436
11. <i>B. papionis</i>		F8/08-60	NCTC 13660, CIRMBP 0958

Πίνακας 4: Ανθεκτικότητα των βακτηρίων του γένους *Brucella* στους διάφορους βιοτικούς και αβιοτικούς παράγοντες (Nicoletti, 1980, Alton, 1985, FAO/WHO, 1986, Μπουρτζή-Χατζοπούλου, 2008), σελίδα 12

Περιβάλλον	Συνθήκες	Χρόνος επιβίωσης
Νερό	-4 °C	4 μήνες
Νερό (εργαστήριο)	20 °C	2,5 μήνες
Νερό (λίμνη)	37 °C, pH=7,2	<24 ώρες
Νερό (λίμνη)	8 °C, pH=6,5	>2 μήνες
Ηλιακή ακτινοβολία	<31°C	4 ώρες και 30 λεπτά
Έδαφος	Αφυδατωμένο στο εργαστήριο	<4 ημέρες
	Σε υγρό περιβάλλον	>2 μήνες
	Φθινόπωρο (90% υγρασία)	48-72 ημέρες
Βοσκότοπος	Ηλιακή ακτινοβολία	<5 ημέρες
	Σκιά	>6 ημέρες
Εύλινοι τοίχοι ή οροφές	-	4 μήνες
Φρέσκο γάλα	25-37°C	24 ώρες
	8°C	48 ώρες
	-40°C	2,5 χρόνια
Ορός γάλακτος	5°C	>6 ημέρες
	17-24°C	<5 ημέρες
Τυρόγαλο	17-24°C	<5 ημέρες
	5°C	>6 ημέρες
Τυρί		4 ημέρες-6 μήνες
Τυρί Φέτα	pH 4-9	1-8 εβδομάδες
Βούτυρο		142 ημέρες
Μαλλί	Αποθήκη	4 μήνες
Σκόνη	-	3-4 ημέρες
Ζωοτροφές/ Σανός	-	Μέρες έως μήνες
Υγρή κοπριά	Καλοκαίρι	24 ώρες
	Χειμώνας	2 μήνες
	25°C	1 μήνας
	8°C	1 χρόνος
	-3°C	3 μήνες
Ούρα	37°C, pH=8,5	16 ώρες
	8°C, pH=6,5	6 ημέρες

Πίνακας 5: Επιδημιολογικά στοιχεία της βρουκέλλωσης για την Ευρωπαϊκή Ένωση και τις χώρες που σχετίζονται με αυτήν, (European Commission, 2014, EFSA/ECDC, 2014), σελίδα 14

A/Σ: ανεπαρκή επίσημα στοιχεία

Κράτη-μέλη της Ε.Ε.	Καθεστώς για την βρουκέλλωση	Πληθυσμός	Αναλογία ανά 100.000 κατοίκους
Αυστρία	Απαλλαγμένη	8,767,919 (2016)	0,01
Βέλγιο	Απαλλαγμένη	11,342,835 (2016)	0,01
Βουλγαρία	Ενδημική	7,153,784 (2015)	0,03
Κροατία	Ενδημική	4,190,669 (2015)	0,00
Κύπρος	Ενδημική	847,000 (2014)	0,02
Τσεχία	Απαλλαγμένη	10,564,866 (2016)	0,00
Δανία	Απαλλαγμένη	5,745,526 (2016)	A/Σ
Εσθονία	Απαλλαγμένη	1,315,944 (2016)	0,00
Φιλανδία	Απαλλαγμένη	5,502,284 (2016)	0,02
Γαλλία	Απαλλαγμένη	66,842,000 (2016)	0,02
Γερμανία	Απαλλαγμένη	82,175,700 (2015)	0,06
Ελλάδα	Ενδημική	10,858,018 (2015)	1,24
Ουγγαρία	Ενδημική	9,830,485 (2016)	0,00
Ιρλανδία	Απαλλαγμένη	4,757,976 (2016)	0,07
Ιταλία	Κατά περιοχές απαλλαγμένη	60,592,547 (2016)	A/Σ
Λετονία	Απαλλαγμένη	1,955,700 (2016)	0,00
Λιθουανία	Απαλλαγμένη	2,856,350 (2016)	0,00
Λουξεμβούργο	Απαλλαγμένη	572,200 (2015)	0,00
Μάλτα	Ενδημική	429,344 (2014)	0,00
Ολλανδία	Απαλλαγμένη	17,067,100 (2016)	0,01
Πολωνία	Απαλλαγμένη	38,426,809 (2016)	0,00
Πορτογαλία	Κατά περιοχές απαλλαγμένη	10,341, 330 (2015)	0,43
Ρουμανία	Απαλλαγμένη	19,760,000 (2016)	0,01
Σλοβακία	Απαλλαγμένη	5,426,252 (2015)	0,00
Σλοβενία	Απαλλαγμένη	2,064,241 (2016)	0,00
Ισπανία	Κατά περιοχές απαλλαγμένη	46,812,000 (2016)	0,13
Σουηδία	Απαλλαγμένη	9,954,420 (2016)	0,17
Ηνωμένο Βασίλειο	Κατά περιοχές απαλλαγμένη	65,110,000 (2015)	0,02
Υποψήφιες χώρες			
Αλβανία	Ενδημική	2,886,026 (2016)	A/Σ
Π. Γ.Δ.Μ.	Ενδημική	2,071,278 (2015)	A/Σ
Μαυροβούνιο	Ενδημική	621,810 (2014)	A/Σ
Σερβία	Ενδημική	7,076,372 (2016)	A/Σ
Τουρκία	Ενδημική	78,741,053 (2015)	A/Σ
Χώρες με την υπόσχεση να μπουν στην Ε.Ε. όταν θα είναι έτοιμες			
Βοσνία-Ερζεγοβίνη	Ενδημική	3,531,159 (2013)	A/Σ
Κόσσοβο	Ενδημική	1,836,978 (2016)	A/Σ
Χώρες που ανήκουν στην ευρύτερη οικονομική ζώνη			
Ισλανδία	Απαλλαγμένη	337,610 (2016)	0,00
Λιχτενστάιν	Απαλλαγμένη	37,623 (2015)	A/Σ
Νορβηγία	Απαλλαγμένη	5,252,166 (2016)	0,04
Ελβετία	Απαλλαγμένη	8,364,100 (2016)	0,04

+: θετικό αποτέλεσμα

-:αρνητικό αποτέλεσμα

(+)/(-): Περισσότερο θετικά/αρνητικά αποτελέσματα

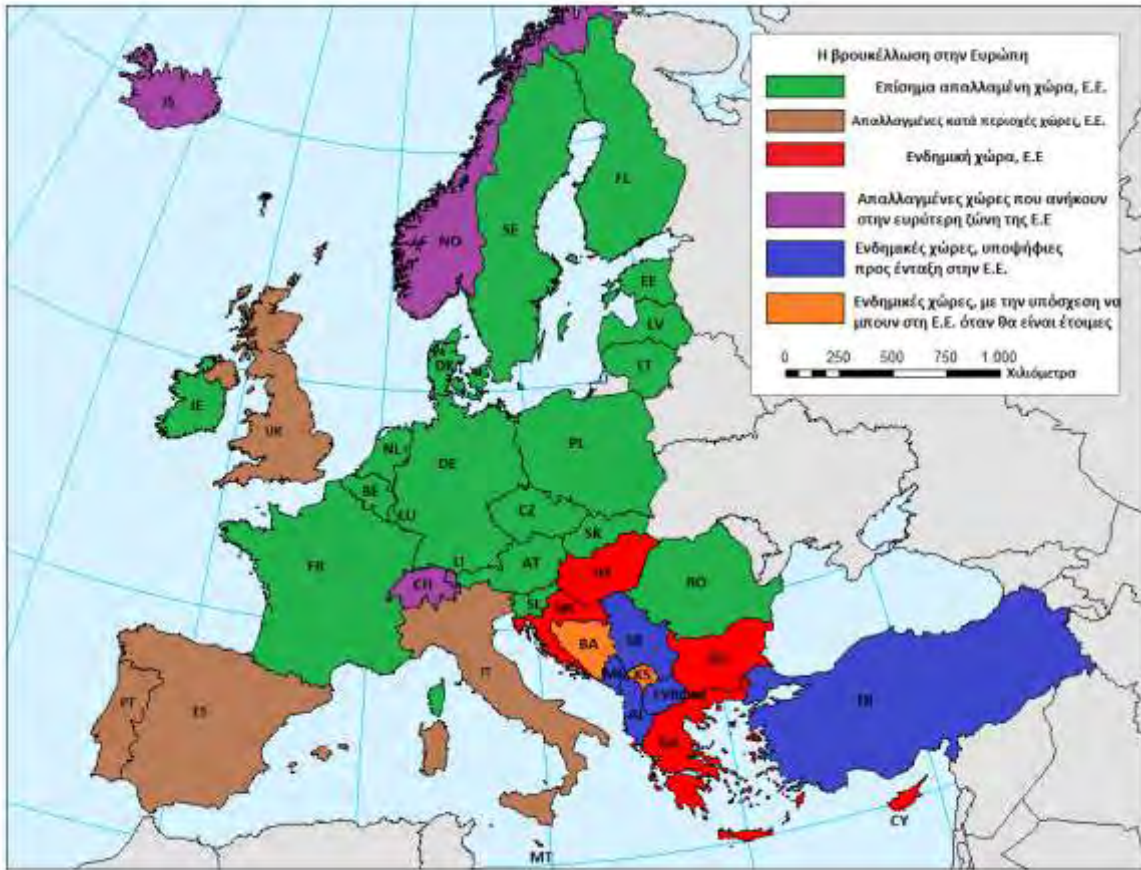
S: Smooth-Λείου τύπου

R: Rough- Αδρού τύπου

Είδος	Βιότυπος	Μορφολογία αποικιών	Ουρεάση	Οξειδάση	Καταλάση	Συγκόλληση με ορούς			Ανάπτυξη σε CO ₂	Παραγωγή υδρόθειου	Ανάπτυξη σε χρωστική Serum Dextrose Agar (20μg/ml)		VP	Ινδόλη, κιτρικά, methyl red, κινητικότητα, ONPG	Νιτρικά
						A	M	R			Θειονίνη	Φουξίνη			
<i>B. melitensis</i>	1	S	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-
	2	S	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-
	3	S	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-
<i>B. abortus</i>	1	S	(+)	(+)	+	+	-	-	(+)	+	-	+	-	-	-
	2	S	(+)	(+)	+	+	-	-	(+)	+	-	-	-	-	-
	3	S	(+)	(+)	+	+	-	-	(+)	+	+	+	-	-	-
	4	S	(+)	(+)	+	-	+	-	(+)	+	-	(+)	-	-	-
	5	S	(+)	(+)	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-
	6	S	(+)	(+)	+	+	-	-	-	(-)	+	+	-	-	-
	7	S	(+)	(+)	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-
9	S	(+)	(+)	+	-	+	-	+/-	+	+	+	-	-	-	
<i>B. suis</i>	1	S	+	+	+	+	-	-	-	+	+	(-)	-	-	-
	2	S	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
	3	S	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-
	4	S	+	+	+	+	+	-	-	-	+	(-)	-	-	-
	5	S	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>B. ovis</i>		R	-	-	+	-	-	+	+	-	+	(-)	-	-	+
<i>B. neotomae</i>		S	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>B. canis</i>		R	+	+	+	-	-	+	-	-	+	(-)	-	-	+
<i>B. pinnipedialis</i>		S	+	(+)	+	(+)	(-)	-	(+)	-	+	(+)	-	-	+
<i>B. ceti</i>		S	+	(+)	+	+	(-)	-	(-)	-	(+)	(+)	-	-	+
<i>B. microti</i>		S	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+
<i>B. inopinata</i>		S	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+
<i>B. rapionis</i>		S	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-

Πίνακας 7: Μέθοδοι διάγνωσης της νόσου, πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα αυτών (Nielsen, et al., 2000, Nielsen, 2002, OIE, 2009, Godfroid, et al., 2010, Nielsen, et al., 2010, Anses, 2014, OIEb, 2016), σελίδες 29

Μέθοδος	Τύπος δείγματος	Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα
Μικροσκοπήση	Εμβρυικοί υμένες, πλακούντας, κοτυληδόνες	Εύκολη, σχετικά γρήγορη	Χαμηλότερη ευαισθησία στα γαλακτοκομικά προϊόντα, διασταυρούμενες μολύνσεις, απαιτείται επιβεβαίωση
Καλλιέργεια		Χρυσός κανόνας-πλήρης επιβεβαίωση της νόσου	Χρονοβόρα διαδικασία
Μοριακές μέθοδοι	Οτιδήποτε περιέχει γενετικό υλικό	Γρήγορη, αξιόπιστη, διαφοροποίηση φυσικής μόλυνσης-εμβολιακών στελεχών	Μεγάλο κόστος εξοπλισμού και εξειδικευμένο προσωπικό
Βιοχημικές δοκιμές	Αποικίες από τις καλλιέργειες	Βιοτύπηση του βακτηρίου	Ειδικός εξοπλισμός και υψηλό κόστος για κάποιες δοκιμές
Δοκιμή δακτυλίου στο γάλα	Ορός γάλατος	Γρήγορη, εύκολη, απλή, κατάλληλη για screening	Επηρεάζεται από μαστίτιδα, πρωτόγαλα και το γάλα στο τέλος της κυοφορίας
Έμμεση ανοσοενζυμική δοκιμή/iELISA	Ορός αίματος/γάλατος	Σχετικά εύκολη, μέθοδος προτίμησης για επιβεβαίωση στο γάλα	Κόστος, δεν μπορεί να διαχωρίσει τον εμβολιασμό από τη φυσική μόλυνση
Πόλωση του φθορίζοντος φωτός		Εύκολη, απλή, δυνατότητα φορητότητας σε επίπεδο εκτροφής	Κόστος υλικών
Δοκιμή πλευρικής ροής			
Ερυθρό της Βεγγάλης-Οροσυγκόλληση ρυθμιστικού διαλύματος σε πλάκα		Γρήγορη, εύκολη, κατάλληλη για screening, φτηνή	Περαιτέρω επιβεβαίωση των θετικών δοκιμών
Οροσυγκόλληση σε σωλήνα/Wright Test		Ευρέως διαδεδομένη μέθοδος για την διάγνωση στον άνθρωπο	Ανιχνεύει κυρίως IgM και λιγότερο IgG
Αναγωγικά μέσα		Επιβεβαιωτικές δοκιμές	Αυξημένη περίπτωση ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων
Δοκιμές καθίζησης	Ορός αίματος	διαφοροποίηση φυσικής μόλυνσης-εμβολιακών στελεχών, επιβεβαιωτικές δοκιμές	Χαμηλή ευαισθησία, δεν χρησιμοποιούνται πλέον για διαγνωστικούς σκοπούς
Σύνδεση του Συμπληρώματος		Μέθοδος εκλογής για επιβεβαίωση της μόλυνσης στα ζώα	Εξειδικευμένο προσωπικό, πολύπλοκη, μεγάλο κόστος υλικών, δεν μπορεί να διαχωρίσει τον εμβολιασμό από τη φυσική μόλυνση
Ανταγωνιστική ανοσοενζυμική δοκιμή/cELISA		Μπορεί να διαχωρίσει τα εμβολιακά στελέχη από τη φυσική μόλυνση	Κόστος υλικών
Δοκιμή της αντισφαιρίνης /Coombs Test		Ευρέως διαδεδομένη μέθοδος για την διάγνωση στον άνθρωπο μαζί με την δοκιμή Wright	Δεν μπορεί να διαχωρίσει τον εμβολιασμό από τη φυσική μόλυνση
Ενδοδερμική δοκιμή	Δέρμα	Απλή, εύκολη, ιδιαίτερης σημασίας για επιδημιολογικές μελέτες	Δεν αντιδρούν όλα τα μολυσμένα ζώα, μειωμένη ειδικότητα μετά από εμβολιασμό, απαιτείται χρήση άλλων δοκιμών για επιβεβαίωση
Ραδιοανοσοπροσδιορισμός		Δημιουργούν κατάλοιπα ραδιοϊσοτόπων, δεν χρησιμοποιούνται	



Εικόνα 2: Η επιδημιολογία της βρουκέλλωσης στην Ευρώπη, σελίδα 14

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΒΡΟΥΚΕΛΛΩΣΗ: ΑΙΤΙΟ ΚΑΙ ΝΟΣΗΜΑ

1.1 ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ

Η βρουκέλλωση είναι μία από τις αρχαιότερες και πιο διαδεδομένες ζωοανθρωπονόσους. Η παλαιοπαθολογική εξέταση (paleopathology) οστών που ανήκαν στον *Australopithecus africanus*, τα οποία βρέθηκαν στην περιοχή Sterkfontein της νοτίου Αφρικής, υποδήλωσαν ότι η *Brucella* μόλυνε τους ανθρώπους ακόμα και πριν από εκατομμύρια χρόνια. Τα οστά αυτά πιστεύεται ότι προέρχονται από τα τέλη της Πλειόκαινου εποχής (Pliocene, 5,3-2,5 εκατομμύρια χρόνια πριν). Οι αλλοιώσεις διαφόρων τμημάτων του σκελετού (λυτικές εστίες στους οσφυϊκούς σπονδύλους L4 και L5) που βρέθηκαν είναι παθολογικές της βρουκέλλωσης (Anastasio, et al., 2009). Η παραπάνω υπόθεση ενισχύεται από το γεγονός ότι η βρουκέλλωση σχετίζεται με την κατανάλωση πρωτεϊνών ζωικής προέλευσης, και ο *A. africanus* θα μπορούσε να μολυνθεί από την κατανάλωση επίτοκων απορρίψεων, εμβρυικών μεμβρανών ή από το κρέας αντιλόπης (Godfroid, 2002). Μέχρι τώρα δεν υπάρχει παλαιοπαθολογική απόδειξη για την ύπαρξη της βρουκέλλωσης κατά την μέση και τελευταία περίοδο της Παλαιολιθικής εποχής (2,5 εκατομμύρια έως 10,000 χρόνια πριν) (Anastasio, et al., 2011).

Στην Ισπανία, στην περιοχή των Βάσκων, γίνεται αναφορά για ανακάλυψη οστών, της εποχής του χαλκού (5,000 περίπου π.Χ.) με αλλοιώσεις που υποδηλώνουν μόλυνση από *Brucella* (Etxeberria, 1994). Η μετέπειτα, χρονολογικά, εμφάνιση της βρουκέλλωσης είναι κατά την πρώιμη μπρούτζινη εποχή (3,600-600 π.Χ.). Γίνεται αναφορά για πιθανή βρουκέλλωση σε ένα δείγμα από την Ιεριχώ (Ισραήλ), όπου ανακαλύφθηκε σκελετός με φλεγμονή στην οσφυϊκή μοίρα της σπονδυλικής στήλης (Brothwell, 1965). Στην Ιορδανία και το Μπαχρέιν γίνονται αναφορές για πιθανή βρουκέλλωση σε δείγματα που χρονολογούνται στην μπρούτζινη εποχή (Rashidi, 2001, Ortner, et al., 2007).

Μία αναφορά για την διερεύνηση ακόμα μίας περίπτωσης βρουκέλλωσης, η οποία χρονολογείται γύρω στο 3,100 Π.Χ., στην περιοχή της Ιορδανίας γίνεται το 2003. Εκεί εντοπίστηκε σπονδυλική στήλη, η οποία εμφάνιζε τυπικές αλλοιώσεις στους οσφυϊκούς σπονδύλους (Ortner, 2003). Η πρώτη, ιστορικά, αναφορά της βρουκέλλωσης έγινε από τον Ιπποκράτη το 450 π.Χ., ο οποίος στο βιβλίο του «επιδημίες» περιγράφει

περιστατικά εμπύρετης νόσου με χαρακτηριστικά κυματοειδούς πυρετού σε άτομα που κατοικούσαν στα παράλια της Μεσογείου (Radford, et al., 2004).

Είναι γνωστό ότι η έκρηξη του Βεζουβίου και η καταστροφή των πόλεων της Πομπηίας, της Ηρακλείας και της Σταβίας έγινε το 79 μ. Χ. Στις παραλίες της Ηρακλείας ανακαλυφθήκαν οστά ανθρώπων που θάφτηκαν ζωντανοί από τις στάχτες του ηφαιστείου. Μετά από μελέτη των οστών τους, παρατηρήθηκαν αλλοιώσεις που σχετίζονταν με την σπονδυλίτιδα που προκαλεί η βρουκέλλα, με μεγαλύτερη συχνότητα στους άνδρες (Carasso, 1999). Τα δεδομένα από την Ηράκλεια, έδειξαν μία πρώτη συσχέτιση της νόσου με την κατανάλωση γαλακτοκομικών προϊόντων. Έτσι, τρία χρόνια αργότερα, πάλι ο Carasso, κάνει αναλύσεις σε θαμμένα τυριά που βρέθηκαν στην περιοχή της Ηρακλείας, τα οποία αργότερα αποθηκεύτηκαν στο μουσείο Boscoreale της Νάπολης. Με την χρήση του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου ανιχνεύτηκαν δύο τύποι βακτηριακών καταλοίπων. Το πρώτο είχε μορφή και σχήμα που παρέπεμπε σε βακτήρια της οικογένειας *Lactobacillaceae*. Τα χαρακτηριστικά του δεύτερου, παρέπεμπαν σε βακτήρια των ειδών *Brucella* και *Streptococcus*. Παρόλη τη δυσκολία διαχωρισμού ανάμεσα σε αυτά τα δύο, για πρώτη φορά ανακαλύφτηκε ότι τα τρόφιμα μπορεί να είναι ένα μέσο για την πρόκληση ασθενειών στους ανθρώπους (Carasso, 2002). Πράγματι υπάρχουν ιστορικές πηγές που αναφέρουν την μεγάλη κατανάλωση πρόβειου γάλατος από τους Ρωμαίους, το οποίο δεν επεξεργαζόταν θερμικά και δεν δεχόταν άλλη μορφή εξυγίανσης, όπως επίσης και γαλακτοκομικών προϊόντων. Αυτό εξηγεί την μεγάλη συχνότητα εμφάνισης της βρουκέλλωσης κατά τους ρωμαϊκούς χρόνους (Varro, II, 5,4; Cicero, *De Natura Deorum*, II, 159; Pliny the Elder, VIII, 180).

Συνεχίζοντας χρονικά, η επόμενη περίπτωση βρουκέλλωσης περιγράφεται στην Γαλλία. Εκεί έγινε ανάλυση οστών, τα οποία ξεθάφτηκαν στην περιοχή Raucourt, και χρονολογούνται γύρω στα τέλη του 7^{ου} αιώνα. Το δείγμα ανήκε σε γυναίκα, ηλικίας 35 των και παρουσίαζε αλλοιώσεις στην θωρακική μοίρα της σπονδυλικής στήλης, στην αριστερή πτέρνα και στο αριστερό πέμπτο μετατόρσιο (Soulie, 1982). Στην περιοχή Alava της Ισπανίας ανακαλύπτονται δύο σκελετοί ανδρών που χρονολογούνται στο Μεσαίωνα (5^{ος}-15^{ος} αιώνας). Ο ένας σκελετός ανακαλύφτηκε στην νεκρόπολη Los Castros de Lastra και ο δεύτερος στην νεκρόπολη Santa Eulalia. Και οι δύο εμφάνιζαν χαρακτηριστικές αλλοιώσεις των οστών που προκαλεί η μόλυνση από βρουκέλλα (Etxeberria, 1994).

Σε νεότερη εποχή ανήκουν δύο περιπτώσεις σπονδυλίτιδας που βρέθηκαν σε οστά στην αρχαιολογική περιοχή Tysfjord της Νορβηγίας. Ο πρώτος σκελετός ανήκε σε άνδρα ηλικίας 19 ετών και ο δεύτερος σε γυναίκα ηλικίας 20-25 ετών, πιθανολογώντας

ότι ανήκαν στη φυλή Lapp, εμφανίζοντας χαρακτηριστικές αλλοιώσεις βρουκέλλωσης στα οστά τους (Ortner, 2003).

Για την ήπειρο της Αμερικής εμφανίζεται μία αναφορά για πιθανή βρουκέλλωση στην περιοχή Merida του Μεξικού. Ο σκελετός που βρέθηκε, ανήκε σε γυναίκα 40 ετών και έφερε αρκετές αλλοιώσεις των οστών της. Ο συγγραφέας παραθέτοντας την διαφορική διάγνωση, προτείνει τελικά την βρουκέλλα ως πιθανό αίτιο, ανάμεσα σε μυκητιασική μόλυνση, εχινοκοκκίαση και μεταστατικό καρκίνωμα (Ortner, 2003).

Το 1751 ο Cleghorn, βρετανός χειρουργός στην Μινόρκα της Ισπανίας (νησί στην Μεσόγειο) περιγράφει αρκετές περιπτώσεις υποτροπιάζουσας ασθένειας και την συνδέει με αντίστοιχες αναφορές του Ιπποκράτη 2000 χρόνια πριν από αυτόν (Cleghorn, 1751). Το 1861, τρεις χειρουργοί, ανέφεραν παρόμοια περιστατικά, στην Μάλτα. Ο Marston δίνει μία ακριβή περιγραφή της νόσου στον άνθρωπο χωρίς όμως να απομονώσει τον αιτιολογικό παράγοντα (Marston, 1861).

Το 1887 ο βρετανός χειρουργός David Bruce και ο μικροβιολόγος Giuseppe Scicluna απομόνωσαν τον μικροοργανισμό από τον σπλήνα πέντε ασθενών που είχαν απεβιώσει και τον ονόμασαν *Micrococcus melitensis* (Bruce, 1887). Δέκα χρόνια αργότερα ο ML Hughes, εισήγαγε τον όρο κυματοειδής πυρετός και δημοσίευσε μονογραφία περιγράφοντας τα κλινικά χαρακτηριστικά της νόσου που εμφάνισαν 844 ασθενείς (Hughes, 1897). Το ίδιο έτος ο Δανός κτηνίατρος Bernhard Bang απομόνωσε έναν μικροοργανισμό από αποβληθέντα έμβρυα και πλακούντες βοοειδών, και τον ονόμασε *Bacillus abortus* (Bang, 1897).

Το 1905 ο Themistocles Zammit, μέλος της Επιτροπής του Πυρετού της Μεσογείου (Mediterranean Fever Commission-MFC), ανακάλυψε ότι τα βακτήρια της *Brucella* περιέχονταν στο γάλα αιγών, αφού προηγουμένως τα είχε απομονώσει από καλλιέργειες αίματος και γάλατος αιγών (Wyatt, 2005). Το 1914, ο Traum, ανακάλυψε στις ΗΠΑ το είδος *Brucella suis*, το οποίο απομόνωσε από έμβρυο χοίρου και το διαφοροποίησε από το *B. abortus* (Traum, 1914). Η Evans το 1917, ανακάλυψε ότι ο μικροοργανισμός που είχε απομονώσει ο Bang είχε πανομοιότυπα χαρακτηριστικά με αυτόν που προκαλούσε τον κυματοειδή πυρετό στον άνθρωπο, όπως ανακαλύφθηκε από τον Bruce. Αυτός ο μικροοργανισμός είναι υπεύθυνος και για την πρόκληση λοίμωξης στα βοοειδή, αιγοπρόβατα και μπορεί να οδηγήσει σε αποβολές (Nicoletti, 1980, Meador, et al., 1988). Το 1920 ο Karl Meyer, κτηνίατρος από το Σαν Φρανσίσκο, για να τιμήσει τον David Bruce πρότεινε το νέο γένος βακτηρίων να ονομαστεί *Brucella* (Meyer, et al., 1920).

Το 1942 οι Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής, ανέπτυξαν την *B. suis*, ως βιολογικό όπλο, επειδή το είδος αυτό είναι εύκολο να μεταδοθεί με αερολύματα (αεροζόλ), και

προκαλεί χρόνια ασθένεια που απαιτεί συνδυασμό αντιβιοτικών για την αντιμετώπισή της. Τέθηκε υπό δοκιμή σε πληθυσμούς ζώων το 1944 και το 1945. Εξαιτίας όμως της μικρής θνησιμότητας και της εμφάνισης νέων παραγόντων που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως βιολογικά όπλα, το πρόγραμμα αυτό τερματίστηκε το 1969 με απόφαση του προέδρου Richard Nixon. (Department of the Army, 1977, Pappas, et al., 2006).

Το 1952 οι McFarlane, Osborne και Jebson, απομόνωσαν το είδος *Brucella ovnis* από πρόβατα στη Νέα Ζηλανδία (McFarlane, et al., 1952). Το 1957, απομονώθηκε στις ΗΠΑ το είδος *Brucella neotomae* από αρουραίους της ερήμου (Stoenner, et al., 1957). Το 1968, απομονώθηκε, πάλι στις ΗΠΑ, το είδος *Brucella canis*, από αποβληθέν έμβρυο σκύλου (Carmichael, et al., 1968). Το 2007 ο Foster και οι συνεργάτες του απομόνωσαν στη Σκωτία δύο νέα είδη, την *Brucella. pinnipedialis* και *Brucella. ceti*, οι οποίες βρέθηκαν σε σπλήνα φώκιας και αλλοιώσεις δέρματος σε δελφίνια-φάλαινες αντίστοιχα (Foster, et al., 2007). Το 2008 ο Scholz και οι συνεργάτες του παρουσίασαν το είδος *Brucella microti*, το οποίο απομονώθηκε από ήπαρ αρουραίου στην Τσεχία (Scholz, et al., 2008). Το 2010 παρουσιάστηκε από τον Scholz και τους συνεργάτες του ένα νέο είδος, η *Brucella inopinata*, η οποία απομονώθηκε από μόλυνση που προκλήθηκε από εμφυτεύματα στήθους (Scholz, et al., 2010), ενώ τον ίδιο χρόνο ανιχνεύτηκε και σε βιοψία πνεύμονα σε ασθενή με χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια (Tiller, et al., 2010). Τέλος, το 2014 ο Whatmore και οι συνεργάτες του παρουσίασαν το νέο είδος *Brucella rapionis*, το οποίο απομονώθηκε από θνησιγενές έμβρυο μαμμουίνου (Whatmore, et al. 2014).

1.2 ΤΟ ΓΕΝΟΣ

1.2.1 Ταξινόμηση

Σκοπός της συστηματικής ταξινόμησης (taxonomy) είναι να κατηγοριοποιήσει τον τεράστιο αριθμό των οργανισμών και κατ' επέκταση να παρέχει το πλαίσιο ώστε να προσδιοριστεί η ταυτότητα του εκάστοτε οργανισμού. Βασίζεται σε τρία θέματα: ταυτοποίηση, ονοματολογία και ταξινόμηση (classification). Η τελευταία είναι μία πηγή πληροφοριών, η οποία χρησιμοποιεί ιεραρχικές κατηγορίες ή τάξεις (Βασίλειο, Φύλο, Κλάση, Τάξη, Οικογένεια, Γένος, Είδος).

Το γένος *Brucella* ανήκει στην οικογένεια *Brucellaceae*, στην τάξη *Rhizobiales*, στην κλάση *Alphaproteobacteria*, στο φύλο *Proteobacteria*, στο βασίλειο των βακτηρίων (Bergey, et al., 1994) (Πίνακας 1). Φυλογενετικά σχετίζονται, με παθογόνα φυτών και συμβιωτικά όπως το *Rhizobium* και *Agrobacterium*, με ενδοκυτταρικά

παράσιτα όπως η *Bartonella* και η *Rickettsia* και με ελεύθερα ζώντα βακτήρια όπως το *Ochrobactrum* και *Caulobacter* (De Ley, et al., 1987; Moreno, et al., 1990; Velasco, et al., 1998).

Τα χαρακτηριστικά των ειδών του γένους *Brucella* που τα καθιστούν διαφορετικά από τα υπόλοιπα γένη είναι η ικανότητά τους να μολύνουν κύτταρα των θηλαστικών, το γεγονός ότι είναι προαιρετικά ενδοκυτταρικό παθογόνο, το βελτιωμένο γονιδίωμα τους σε σχέση με τα παθογόνα των φυτών, και η ικανότητα να αξιοποιεί κύτταρα των φυτών για τις μεταβολικές της ανάγκες (Paulsen, et al., 2002). Το μεγάλο γονιδίωμα της *Brucella* υποδηλώνει την ικανότητα της να αναπτύσσεται σε διάφορα περιβάλλοντα και να προσαρμόζεται σε διάφορα είδη ξενιστών.

Η ταξινόμηση της *Brucella* spp βασίστηκε σε έξι είδη της (*B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. neotomae*, *B. ovis* και *B. canis*), καθένα από τα οποία προσβάλλει συγκεκριμένο ξενιστή, έχοντας τη δυνατότητα όμως να μολύνει και άλλους ξενιστές (π.χ. *B. melitensis* σε βοοειδή, και *B. abortus* σε αιγοπρόβατα) (Πίνακας 2). Τα κριτήρια για τον διαχωρισμό του μικροοργανισμού στα διάφορα είδη είναι: το είδος του ξενιστή που μολύνει, η ποικιλομορφία των αποικιών κατά την αρχική απομόνωση του βακτηρίου, οι διαφορετικές απαιτήσεις κάθε είδους σε ορό αίματος, διοξειδίου του άνθρακα (CO₂) ή οξυγόνο, τα διαφορετικά μεταβολικά χαρακτηριστικά που παρουσιάζει, η διαφορετική απαίτηση σε συγκεντρώσεις θειονίνης και φουξίνης για την ανάπτυξή του, το πλήθος των βιοτύπων μεταξύ των ειδών, και η ευαισθησία του κάθε είδους σε βακτηριοφάγους (Meyer, 1961, Phillipon, 1968, Corbel, et al., 1984, Meyer, 1990, Cherwonogrodzky, et al., 1990, Στουρνάρα, 2008).

Το κάθε είδος διακρίνεται περαιτέρω σε βιοτύπους. Με τον όρο βιότυπο εννοούμε έναν πληθυσμό μικροοργανισμών που έχουν κοινό γενετικό υλικό, όμως διαφέρουν μεταξύ τους σε κάποια καλλιεργητικά χαρακτηριστικά. Τα κριτήρια για τον διαχωρισμό των ειδών *Brucella* σε βιοτύπους, κατά την ανάπτυξή τους σε θρεπτικά υποστρώματα, είναι: η παρουσία ή μη διοξειδίου του άνθρακα (CO₂), η αναστολή ή η ανάπτυξή του σε θρεπτικά υποστρώματα που περιέχουν χρωστικές θειονίνη και φουξίνη, η παραγωγή υδρόθειου (H₂S), και ο μεταβολισμός ειδικών αμινοξέων και σακχάρων (Pickett, et al., 1963). Οι βιότυποι και τα στελέχη αναφοράς που έχουν προσδιοριστεί για το κάθε είδος και βιότυπο παρουσιάζονται στον **πίνακα 3**.

Η ταξινόμηση της *Brucella* spp αμφισβητήθηκε το 1985 από ερευνητές, οι οποίοι μέσω της μεθόδου υβριδισμού DNA–DNA, υποστήριξαν ότι τα είδη που υπήρχαν τότε, δεν ήταν ξεχωριστά, αλλά ήταν βιότυποι ενός κοινού είδους (π.χ. *B. melitensis* biovar *abortus*, *B. melitensis* biovar *suis*) (Verger, et al., 1985). Το σύστημα αυτό έγινε δεκτό από την υπό-Επιτροπή για την ταξινόμηση της *Brucella*

(Subcommittee on the Taxonomy of *Brucella*) το 1986. Από τότε όμως ανακαλύφθηκαν και άλλα είδη βρουκέλλας, ειδικά εκείνων των θαλάσσιων θηλαστικών, τα οποία δεν εκπλήρωναν τις απαραίτητες προϋποθέσεις για να θεωρηθούν ως βιότυποι ενός μοναδικού είδους. Έτσι προτάθηκε να επιστρέψει το σύστημα ταξινόμησης στο παλαιό, προκειμένου να αποφευχθούν οι συγχύσεις (Anonymous, 1986), κάτι το οποίο συνέβη στο Διεθνές Συνέδριο Έρευνας της Βρουκέλλωσης (International Brucellosis Research Conference) στην Ισπανία το 2003 (Osterman, et al., 2006).

1.2.2 Δομή και μορφή

Γενικά

Τα κύτταρα του γένους *Brucella* είναι Gram-αρνητικά βακτήρια. Πρόκειται για προαιρετικούς ενδοκυτταρικούς κοκκοβάκιλλους με μέγεθος 0,5 με 0,7 μm σε διάμετρο και 0,5 με 1,5 μm σε μήκος. Είναι ακίνητοι, δεν διαθέτουν μαστίγια, και δεν σχηματίζουν έλτρο και σπόρια. (Anses, 2014). Διατάσσονται στο χώρο σε ζεύγη, σε μικρά αθροίσματα ή μπορεί να είναι μεμονωμένα. Βάφονται κόκκινα με την τεχνική της τροποποιημένης Ziehl Neelsen (Anses, 2014), ενώ κατά την καλλιέργεια τους σε θρεπτικά υποστρώματα, σχηματίζουν ανάλογα με το είδος, δύο ειδών αποικίες, λείου (S) και αδρού (R) τύπου.

Το κυτταρικό τοίχωμα έχει την τυπική χαρακτηριστική δομή του κυτταρικού τοιχώματος όλων των Gram αρνητικών βακτηρίων (Corbel, et al., 1975). Το κυτταρικό περίβλημα, πάχους 9nm, αποτελείται από την εσωτερική και εξωτερική μεμβράνη, οι οποίες περικλείουν τον περιπλασματικό χώρο, πάχους από 3-30nm, ανάλογα με τον τύπο του κυττάρου. Ο χώρος αυτός περιλαμβάνει ένα πλέγμα πεπτιδογλυκάνης και διαλυτά συστατικά (Ignacio, et al., 1998). Στο κυτταρόπλασμα υπάρχει το πυρηνοειδές, κενोटόπια, κοκκία πολυσακχαριτών, και ριβοσώματα.

Σε γενικές γραμμές, το γονιδίωμα των ειδών του γένους βρουκέλλα είναι ίδιο, με μικρά τμήματα μόνο να είναι ξεχωριστά για το κάθε είδος (Halling, et al., 2005). Το γονιδίωμα περιλαμβάνει δύο κυκλικά χρωμοσώματα, με το ένα να περιέχει 2,1 εκατομμύρια ζεύγη βάσεων, και το άλλο 1,17 εκατομμύρια ζεύγη βάσεων, κωδικοποιώντας περίπου 3200 ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης (γονίδια). Γονίδια που σχετίζονται με τον διπλασιασμό, τη μεταγραφή, και τη μετάφραση του γενετικού υλικού, καθώς και με τον μεταβολισμό και την βιοσύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος, εντοπίζονται και στα δύο χρωμοσώματα (DeVecchio, et al., 2002). Τέλος τα είδη του γένους *Brucella* δεν φέρουν πλασμίδια.

Αντιγονική δομή του κυττάρου

Στο κυτταρικό τοίχωμα των βακτηρίων του γένους *Brucella*, έχουν αναγνωριστεί ένας αριθμός συστατικών που δρουν ως αντιγόνα. Αυτά αναγνωρίζονται από το ανοσοποιητικό σύστημα των διάφορων ξενιστών, το οποίο ενεργοποιείται και προκαλεί την παραγωγή αντισωμάτων. Πρόκειται για πρωτεΐνες, λιπίδια, απτένια, τα οποία βρίσκονται είτε στο εξωτερικό είτε στο εσωτερικό του κυττάρου (**Εικόνα 1**).

Λιποπολυσακχαρίτης

Η χρήση ειδικών τεχνικών έχει δείξει ότι στα βακτήρια Βρουκέλλας λείου τύπου, υπάρχει ένας λιποπολυσακχαρίτης στην εξωτερική μεμβράνη του κυττάρου (Díaz, et al., 1968). Ο σακχαρίτης αυτός, αποτελεί τον κύριο αντιγονικό παράγοντα και είναι ζωτικής σημασίας για την βιολογική δραστηριότητα του κυττάρου. Δομικά αποτελείται, από μέσα προς τα έξω, από: το λιπίδιο A, το πυρήνα ολιγοσακχαρίτη και την O-αλυσίδα (γνωστή και ως O-αντιγόνο).

Το λιπίδιο A, περιέχει 2,3-διαμινο-2,3-διδεοξύ-D-γλυκόζη (διαμινογλυκόζη) με δεσμούς στις θέσεις 1,6 ως βάση, αμίδια και με εστέρα συνδεδεμένα λιπαρά οξέα, τα οποία είναι μακράς αλυσίδας κορεσμένα ή υδροξυλιωμένα (Moreno, et al., 1990, Qureshi, et al., 1994, Velasco, 1997). Η υδροφοβική περιοχή του λιπιδίου A αποτελεί κυρίως το εξωτερικό στρώμα της εξωτερικής μεμβράνης και είναι υπεύθυνο για πολλές από τις τοξικές ιδιότητες που αποδίδονται στον λιποπολυσακχαρίτη (Raetz, 1996). Διάφορες τεχνικές υποστηρίζουν την ύπαρξη ενός δισακχαριδίου, το οποίο έχει δεσμούς ώστε να σχηματίζει δομή β 1-6 (Ramos-Sánchez, et al., 1992, Rojas, et al., 1994). Το λιπίδιο A περιέχει ισχυρώς προσδεμένα τμήματα με τις πρωτεΐνες της εξωτερικής μεμβράνης. Δεν έχει βρεθεί αιθανολαμίνη και αραβινοσαμίνη, όπως έχει βρεθεί στο λιπίδιο A που έχουν τα εντεροβακτηριοειδή.

Το λιπίδιο A δεν παρουσιάζει σταθερή δομή, κάτι το οποίο οφείλεται κυρίως στην απουσία θεμελιωδών συστατικών (εκτός των λιπιδίων) και στην ύπαρξη καταλοίπων ακυλ-οξυακυλίου (Freer, et al., 1995, Velasco, 1997). Εξαιτίας αυτής της απουσίας, ο λιποπολυσακχαρίτης είναι το πιο συχνό αντιγόνο του βακτηριακού κυττάρου που σχετίζεται με τη φυσική μόλυνση αλλά και με τον εμβολιασμό. Για το λόγο αυτό ο λιποπολυσακχαρίτης καθώς και μόρια που σχετίζονται με αυτόν, χρησιμοποιούνται εκτενώς σε ανοσολογικές μελέτες καθώς και στην ορολογική διάγνωση της βρουκέλλωσης (Díaz-Aparicio, et al., 1993).

Ο πυρήνας ολιγοσακχαρίτη αποτελείται από μανόζη, γλυκόζη, 2-αμινο-2,6-δυδεοξύ-D-γλυκόζη (κινοβοσαμίνη), 2-αμινο-2-δεοξυ-D-γλυκόζη (γλυκοζαμίνη, η οποία δεν ανιχνεύεται στο λιπίδιο A) (Freer, et al., 1995). Επιπρόσθετα υπάρχει το 3-deoxy-D-manno-2-octulosonic acid (KDO) (Patrícia, et al., 2006), το οποίο πιθανώς να

συνδέεται μέσω μη αναγωγικού διασακχαρίτη με το λιπίδιο A. Η κιννοβοσαμίνη να αποτελεί τη γέφυρα ανάμεσα στον πυρήνα και την Ο-αλυσίδα (Freer, et al., 1995, Ignacio, et al., 1998,).

Η Ο-αλυσίδα είναι ένα ομοιοπολυμερές χωρίς διακλαδώσεις, του 4,6-dideoxy-4-formamido- α -D-mannopyranosyl με δεσμούς στις θέσεις 1,2. Το μήκος της αλυσίδας ποικίλλει από 96 έως 100 γλυκοσιδικές υπομονάδες (Bundle, et al., 1989, Perry, et al., 1990). Επιπλέον, η Ο-αλυσίδα των λείων αποικιών, περιέχει ένα σάκχαρο, το 4,6-dideoxy-4 formamido- α -D-mannopyranoside (περοσαμίνη). Αυτό εκφράζεται είτε ως ομοιοπολυμερές σχηματίζοντας δεσμούς στις θέσεις 1,2 (τύπος A) είτε ως ένας επαναλαμβανόμενος γραμμικός πεντασακχαρίτης αποτελούμενος από κατάλοιπα περοσαμίνης (τύπος M) (Meikle, et al., 1989, Paquet, et al., 2001). Οι τύποι αυτοί σακχάρων ονομάζονται επίτοποι. Η αναλογία των A και M επιτόπων, ποικίλλει στα διάφορα είδη και βιοτύπους του γένους της *Brucella* (Hoover, et al., 1997).

Ειδικότερα οι βιότυποι 1 των *B. abortus* και *B. melitensis*, εκτός από τους αποκλειστικούς A και M επιτόπους αντίστοιχα, διαθέτουν και έναν κοινό επίτοπο, τον C. Ο επίτοπος αυτός θεωρείται υπεύθυνος για την διασταυρούμενη αντίδραση ανάμεσα στους βιοτύπους, των δύο αυτών διαφορετικών ειδών. Ειδικότερα σχετίζεται με την ικανότητα δηλαδή, του βιοτύπου 1-A επιτόπου της *B. abortus* να ανιχνεύει, μετά από μόλυνση, αντισώματα που παράγονται από τον βιότυπο 1 του *B. melitensis*-M επιτόπου (Redfeam, et al., 1960).

Στις αποικίες αδρού τύπου (R), το λιπίδιο A είναι πλούσιο σε λιπαρά οξέα, ο πυρήνας του ολιγοσακχαρίτη αποτελείται από μανόζη και γλυκόζη, ενώ η Ο-αλυσίδα απουσιάζει (Moriyon, 2002).

Πολυσακχαρίτης B

Εκτός από τον λιποπολυσακχαρίτη, στο κυτταρικό τοίχωμα βακτηρίων αδρού τύπου βακτηρίων έχει βρεθεί η ύπαρξη σακχαριτών (γλυκάνες) μικρού μοριακού βάρους, που λειτουργούν ως αντιγόνα. Στους σακχαρίτες αυτούς αποδόθηκε το όνομα πολυσακχαρίτες-B (poly-B). Απομονώθηκαν με τη χρήση τριχλωροοξικού οξέος, από κύτταρα στελεχών *B. melitensis* 16M (Diaz, et al., 1968), μέσω της εφαρμογής μεθόδων ήπιου διαχωρισμού. Οι πολυσακχαρίτες B, είναι μία οικογένεια κυκλικών πολυμερών της β -D-γλυκοπυρανόζης, με δεσμούς στις θέσεις 1,2. Τα πολυμερή αυτά αποτελούνται από 17 έως 24 γλυκοσιδικές μονάδες. Γλυκάνες με παρόμοια δομή έχουν βρεθεί και σε άλλους μικροοργανισμούς, όπως *Rhizobium*, *Agrobacterium* (Bundle, et al., 1987).

Οι πολυσακχαρίτες-B, ως αντιγόνα, μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην διάγνωση της βρουκέλλωσης, αλλά και για στην διαφοροποίηση αντισωμάτων που παράγονται μετά από φυσική μόλυνση ή εμβολιασμό (Lord, et al., 1997).

Απτένια

Τα απτένια είναι πολυσακχαρίτες, που ανιχνεύονται στην επιφάνεια του κυτταρικού τοιχώματος των βακτηρίων. Ανευρίσκονται στα κύτταρα λείου τύπου, σε αντίθεση με τα πολυπεπίδια-B που υπάρχουν στα κύτταρα αδρού τύπου (Arago, et al., 1996). Είναι πολυσακχαρίτες που δεν σχετίζονται με τους σακχαρίτες του λιποπολυσακχαρίτη της εξωτερικής μεμβράνης. Πιστεύεται ότι παραμένουν στη θέση τους, επειδή σχηματίζουν ομοιοπολικούς δεσμούς με την Ο-αλυσίδα. Κάποιοι ερευνητές μάλιστα, υποστηρίζουν ότι τα απτένια είναι πρόδρομες μορφές της Ο-αλυσίδα (Moreno, et al., 1981).

Τα απτένια είναι δυνατόν να απομονωθούν με υδρόλυση, η οποία υφίσταται κατά την διαδικασία εκχύλισης του λιποπολυσακχαρίτη (Tsai, et al., 1982). Μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως αντιγόνα για την διάγνωση της βρουκέλλωσης. Ειδικότερα, έχει βρεθεί ότι σε ορούς αίματος μολυσμένων ζώων, τα απτένια καθιζάνουν εύκολα. Αντίθετα τα απτένια σε ορό αίματος εμβολιασμένων ζώων δεν καθιζάνουν με τον ίδιο ρυθμό. Κατά συνέπεια, τα μόρια αυτά μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την διαφοροποίηση μεταξύ μολυσμένων και εμβολιασμένων ζώων (Urmeneta, et al., 1988).

Λιπίδια

Στο κυτταρικό τοίχωμα της *Brucella* υπάρχουν λιπίδια τα οποία είναι ελεύθερα. Δεν διαθέτουν αντιγονική δράση, όμως συντελούν στην εξέλιξη της παθογένειας του βακτηρίου, με το να προστατεύουν μερικώς το κύτταρο από την ανοσολογική απάντηση του ξενιστή (Chaves, et al., 2011).

Με τη χρήση εκχυλιστικών τεχνικών, βρέθηκε ότι τα λιπίδια αυτά χωρίζονται σε δύο κατηγορίες. Στη πρώτη ανήκουν εκείνα τα οποία εκχυλίζονται εύκολα με τη χρήση χλωροφορμεθανόλης, και είναι κυρίως λιπαρά οξέα και φωσφολιπίδια. Στην δεύτερη κατηγορία ανήκουν τα λιπίδια, τα οποία είναι ισχυρά συνδεδεμένα στο τοίχωμα του βακτηρίου και ανευρίσκονται ενωμένα με υδατάνθρακες ή άλλες πρωτεΐνες. Τα λιπίδια συνολικά αποτελούν συνήθως το 18% του κυτταρικού τοιχώματος του βακτηρίου (Bobo, et al., 1968).

Πρωτεΐνες της εξωτερικής μεμβράνης

Οι κυριότερες πρωτεΐνες της εξωτερικής μεμβράνης (PEM), ταυτοποιήθηκαν για πρώτη φορά το 1980 και ταξινομήθηκαν σε τρεις ομάδες, ανάλογα με το μοριακό τους βάρος. Η ομάδα 1 αποτελείται από πρωτεΐνες με μοριακό βάρος 88-96 kDa, η ομάδα 2

από 36–38 kDa, και η ομάδα 3 από 31–34 καθώς και 25–27 kDa (Winter, 1987). Οι πρωτεΐνες αυτές, εκτός από την αντιγονική τους δράση, πιστεύεται ότι μπορούν να χρησιμοποιηθούν και ως μέσα μοριακής τυποποίησης (Stableforth, et al., 1963).

Οι πρωτεΐνες της ομάδας 1 δεν έχουν ακόμα ταυτοποιηθεί. Υπάρχει μία ποικιλομορφία στα γονίδια των κυριότερων ΠΕΜ στα διάφορα είδη, βιοτύπους και στελέχη, τα οποία έχουν αξία ταξινομική και επιδημιολογική (Ignacio, et al., 1998).

Παρατηρήθηκε ότι οι πρωτεΐνες της ομάδας 2 είναι πουρίνες καθώς και μία λιποπρωτεΐνη, η οποία είναι παρόμοια με την λιποπρωτεΐνη Braun του κυτταρικού τοιχώματος της *Escherichia coli* (Sowa, 1990). Δύο είναι τα κύρια γονίδια στην ομάδα αυτή, τα *omp2a* και *omp2b*, τα οποία κωδικοποιούν τις πουρίνες, και εμφανίζουν μεγάλο βαθμό ομοιογένεια (πάνω από 85%) (Ficht, et al., 1989). Οι πουρίνες της ομάδας αυτής συνδέονται στενά με λιποπρωτεΐνες και λιπίδια του κυτταρικού τοιχώματος (Moriyon, et al., 1983).

Οι πρωτεΐνες της ομάδας 3, με μοριακό βάρος 25 και 31 kDa κωδικοποιούνται από τα γονίδια *omp25* και *omp31* αντίστοιχα (Cloekaert, et al., 1996) και παρουσιάζουν μεταξύ τους ομοιογένεια σε ποσοστό 34% (Winter, 1987). Φαίνεται ότι οι πρωτεΐνες αυτές φέρουν περισσότερους επιτόπους στην επιφάνεια του κυτταρικού τοιχώματος σε σχέση με τις πουρίνες (Gamazo, et al., 1993). Οι πρωτεΐνες 31 kDa απουσιάζουν από την *B. abortus* αλλά εμφανίζονται σε άλλα είδη του γένους (Cloekaert, et al., 1996). Οι πρωτεΐνες αυτές μπορούν να σχηματίσουν ολιγομερή, τα οποία έχουν παρόμοια δράση με εκείνη των πουρινών.

Εσωτερικά Αντιγόνα

Τα κυριότερα αντιγόνα των βακτηρίων της *Brucella* βρίσκονται στο κυτταρικό τοίχωμα. Εκτός αυτών όμως έχουν αναφερθεί και αντιγόνα τα οποία βρίσκονται στο εσωτερικό του κυττάρου. Τα αντιγόνα αυτά είναι πρωτεΐνες που βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα. Οι πρωτεΐνες αυτές έχουν μοριακό βάρος 15 kDa, 17 kDa, 18 kDa. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε ορολογικές δοκιμές για την διάγνωση της βρουκέλλωσης (Goldbaum, et al., 1999).

1.3 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΟΥ ΒΑΚΤΗΡΙΟΥ

1.3.1 Μεταβολισμός

Ο μεταβολισμός των κυττάρων της *Brucella* spp χαρακτηρίζεται από έντονη οξειδωτική δραστηριότητα. Είναι αερόβια βακτήρια. Έχει παρατηρηθεί όμως πως κάποια στελέχη απαιτούν διοξείδιο του άνθρακα, σε ποσοστό 5%-10% της συνολικής

ατμόσφαιρας, για την αρχική ανάπτυξη τους. Αυτό πιθανόν να συμβαίνει επειδή το διοξείδιο του άνθρακα, εισάγει τον μοριακό άνθρακα στον κύκλο του Krebs, κάτι το οποίο δικαιολογείται από το γεγονός ότι κάποια στελέχη χρησιμοποιούν το γλουταμινικό οξύ ως μοναδική πηγή αζώτου και ενέργειας, σε παρουσία διοξειδίου του άνθρακα (Banai, et al., 2010).

Η αναπνοή πραγματοποιείται με το οξυγόνο να είναι ο τελικός δέκτης ηλεκτρονίων ενώ οι υδρογονάσες, τα ένζυμα που καταλύουν την οξειδωση του μοριακού υδρογόνου, να είναι οι δότες. Επίσης έχει βρεθεί ότι ηλεκτρόνια λαμβάνονται από την αναπνευστική αλυσίδα κατά τον καταβολισμό της ερυθριτόλης (Sperry, et al., 1975, Rest, et al., 1975). Η τελευταία παράγεται σε μεγάλες ποσότητες από τους τροφοβλάστες (η εξωτερική στιβάδα της βλαστοκύστης του εμβρύου), Στην ερυθριτόλη των τροφοβλαστών αποδίδεται η προτίμηση της *Brucella* για την κυοφορούσα μήτρα, την οποία όταν προσβάλει οδηγεί σε αποβολές των εμβρύων (Smith, et al., 1962).

Πηγές αζώτου του βακτηρίου αποτελούν το θειικό αμμώνιο, τα θειοθειικά άλατα και το θείο, ενώ πηγές άνθρακα, για την παραγωγή ενέργειας, είναι η γλυκόζη. Τα κυτοχρώματα (πρωτεΐνες που παίζουν σημαντικό ρόλο στη μεταφορά ενέργειας στα κύτταρα) α, α3, b, c και ο έχουν συσχετιστεί με την ανάπτυξη του βακτηρίου στην λογαριθμική φάση. Οι βιταμίνες θειαμίνη (B1), νικοταμίνδη (B3), βιοτίνη (B7), παντοθενικό οξύ (B5) είναι απαραίτητες για την ανάπτυξη του βακτηρίου (Corbel, et al., 1975).

1.3.2 Ανθεκτικότητα

Η ανθεκτικότητα των βακτηρίων του γένους *Brucella*, έχει ιδιαίτερη σημασία στην επιδημιολογία του νοσήματος. Σε κατάλληλες συνθήκες τα κύτταρα έχουν την ικανότητα να επιβιώνουν εκτός του οργανισμού των ξενιστών για μεγάλο χρονικό διάστημα, κάτι που δικαιολογεί την μεγάλη γεωγραφική εξάπλωση τους, καθιστώντας τα από τα πιο ανθεκτικά Gram αρνητικά, μη σπορογόνα βακτήρια (Μπουρτζή-Χατζοπούλου, 2008).

Σε ευνοϊκές συνθήκες, όπως $pH > 4$, χαμηλή θερμοκρασία, υψηλή υγρασία και προστασία από άμεση ηλιακή ακτινοβολία, τα κύτταρα της *Brucella* επιζούν και διατηρούν τη λοιμογόνο τους δύναμη για μεγάλο χρονικό διάστημα. Στα αποβληθέντα έμβρυα, στους εμβρυικούς υμένες και στα λόχεια, όπως επίσης στο τρίχωμα των νεογέννητων, στο νερό, στα κόπρανα, στα χόρτα, στη σκόνη, στο έδαφος, στους τοίχους των στάβλων και στα ενδύματα, μπορούν να επιβιώσουν για αρκετούς μήνες.

Στα γαλακτοκομικά προϊόντα ο χρόνος επιβίωσης του μικροοργανισμού επηρεάζεται από παράγοντες που έχουν σχέση με το τύπο του προϊόντος, όπως η

ωρίμανση, η μεταβολή του pH, η υγρασία κ.ά. Σε γάλα, που διατηρείται στους 4°C, επιβιώνει για 10 μέρες, ενώ στο γάλα που διατηρείται σε χαμηλότερη θερμοκρασία, επιβιώνει για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα. Ο χρόνος που χρειάζεται για να εξυγιανθεί το τυρί, κατά την ωρίμανσή του, θεωρείται ότι είναι οι τρεις μήνες (CFSPH, 2007). Ο μικροοργανισμός επιβιώνει για εβδομάδες στα παγωτά και για λίγους μήνες στο βούτυρο. Στα κατεψυγμένα κρέατα τα βακτήρια επιζούν για χρόνια, ενώ στο νωπό κρέας για εξαιρετικά μικρό χρονικό διάστημα (CFSPH, 2007).

Η ανθεκτικότητα της *Brucella* spp στα αντιβιοτικά, δεν είναι ακόμα ζήτημα υψηλής σημασίας, καθώς δεν έχει παρατηρηθεί ανθεκτικότητα σε αυτά (μεμονωμένα ή συνδυασμός αυτών) που χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπισή της. Η ανθεκτικότητα των βακτηρίων του γένους *Brucella* στους διάφορους βιοτικούς και αβιοτικούς παράγοντες παρουσιάζονται στον **Πίνακα 4**.

1.3.3 Ευαισθησία

Τα είδη του γένους *Brucella* καταστρέφονται από τα πιο κοινά απολυμαντικά όπως, υποχλωριώδη διαλύματα, αιθανόλη, ισοπροπανόλη, φαινολικά απολυμαντικά, φορμαλδεΰδη, γλουταραλδεΰδη και ξυλόλη (ξυλένιο). Απολυμαντικά που χρησιμοποιούνται για την απολύμανση των επιφανειών, όπως υποχλωριώδες νάτριο 2,5%, καυστική σόδα 2-3%, φορμαλδεΰδη 2% καταστρέφουν τα βακτήρια μέσα σε μία ώρα. Η μείωση θερμοκρασίας και η οργανική ύλη μειώνουν τη δράση των απολυμαντικών (Μπουρτζή-Χατζοπούλου, 2008).

Αυτόκαυστα (υγρή θερμότητα στους 121°C για τουλάχιστον 15 λεπτά) καταστρέφουν τα βακτήρια σε εξοπλισμό, που έχει μολυνθεί. Τα κύτταρα καταστρέφονται σε ξηρή θερμότητα (160°C για τουλάχιστον μία ώρα). Η ξυλόλη και το ασβεστοκυαναμίδιο καταστρέφουν τα βακτήρια σε υγρή κοπριά μετά από 2-4 εβδομάδες (CFSPH, 2007).

Ανάλογα με το είδος και το βιότυπο του βακτηρίου, κατά την ανάπτυξη τους σε θρεπτικά υποστρώματα τρυπτόζης, εμφανίζεται ευαισθησία ή και ανθεκτικότητα σε χρωστικές όπως η θειονίνη και η φουξίνη (Morgan, 1961). Επίσης τα βακτήρια καταστρέφονται άμεσα με την παστερίωση του γάλακτος, το βρασμό σε λίγα λεπτά, την έκθεση στην ηλιακή ακτινοβολία και την έκθεση σε ακτινοβολία γάμμα. Ευαισθησία εμφανίζουν στις τετρακυκλίνες (δοξυκυκλίνη), στις αμινογλυκοσίδες (γενταμικίνη, στρεπτομυκίνη), στη ριφαμπικίνη, στη τριμεθοπρίμη/ σουλφαμεθοξαζόλη, και στις κινολόνες (Pauletti, et al., 2015).

Όλα τα βακτήρια *Brucella* spp καταστρέφονται από ιούς, οι οποίοι ονομάζονται φάγοι. Ο πρώτος φάγος, που προσβάλλει τα είδη του γένους *Brucella*, ανακαλύφθηκε το

1960 και ήταν ο φάγος Tb (Tbilisi) (Drozevkina, 1963). Από τότε ανακαλήφθηκαν και άλλοι φάγοι, οι οποίοι είναι: Fi (Firenze), Wb (Weybridge), Bk2 (Berkley), R (Rough), R/O (Rough Ovis), R/C (Rough Canis), Iz (Izatnagar), Nr (Nepean) (Corbel, 1989). Οι φάγοι αυτοί ανήκουν στην οικογένεια Podoviridae. Χαρακτηρίζονται από απόλυτη ειδικότητα ως προς το τύπο του κυττάρου που μολύνουν. Έτσι τα βακτήρια λείου τύπου καταστρέφονται από τους Tb, Wb, Bk2, Iz, Fi, και Nr ενώ αυτά του αδρού τύπου από τους φάγους R, R/O, R/C, Iz (Corbel, 1989).

1.4 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ, ΕΠΙΖΩΟΤΙΟΛΟΓΙΑ-ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ

1.4.1 Επιδημιολογία

Η βρουκέλλωση είναι ένα νόσημα με παγκόσμια εξάπλωση. Λίγες είναι οι περιοχές εκείνες που είναι ελεύθερες βρουκέλλωσης και περιλαμβάνουν τη βόρεια, κεντρική και ανατολική Ευρώπη, την Αυστραλία, τον Καναδά, την Ιαπωνία και την Νέα Ζηλανδία. Η νόσος ακόμα απαντάται στην Βόρεια Ιρλανδία, σε όλες τις χώρες της Μεσογείου, καθώς και στα Βαλκάνια (Anses, 2014).

Όσον αφορά την Ευρωπαϊκή Ένωση, από τα 28 κράτη-μέλη, τα 18 είναι επίσημα απαλλαγμένα από την βρουκέλλωση, με την Ρουμανία και την Λιθουανία, να είναι τα πιο πρόσφατα κράτη που απαλλάχθηκαν από την νόσο. Σε τέσσερα κράτα μέλη, υπάρχουν περιοχές που είναι ελεύθερες βρουκέλλωσης (Ιταλία, Πορτογαλία, Ισπανία, Ηνωμένο Βασίλειο), ενώ έξι μόνο κράτη-μέλη θεωρούνται ενδημικά βρουκέλλωσης, ανάμεσα τους και η Ελλάδα (European Commission, 2014).

Από τα στατιστικά στοιχεία του 2012, στην Ευρωπαϊκή Ένωση, η νόσος εμφανίζεται περισσότερο στις γυναίκες (ο λόγος γυναικών-ανδρών ήταν 2:1), σε ηλικίες άνω των 25 ετών (άνω του 80% των περιπτώσεων), ενώ παρουσιάζει κορυφώσεις κρουσμάτων κατά τους μήνες Μάιο έως Αύγουστο, Οκτώβριο και Ιανουάριο (ECDC, 2014). Να σημειωθεί ότι πολλές περιπτώσεις βρουκέλλωσης στους ανθρώπους, σε μη-ενδημικές χώρες, οφείλονται στο γεγονός ότι αυτά τα άτομα ταξίδεψαν σε ενδημικές χώρες, όπου και μολύνθηκαν από *Brucella* spp.

Συγκεντρωτικά στοιχεία που αφορούν την επιδημιολογία του νοσήματος στις χώρες τις Ευρωπαϊκής Ενώσεως, και τις χώρες που σχετίζονται και συνεργάζονται με αυτήν, φαίνονται στον **πίνακα 5**, ενώ γραφικά η επέκταση της βρουκέλλωσης στην Ευρώπη φαίνεται στην **εικόνα 2**.

1.4.2 Πηγές μόλυνσης

Οι κυριότερες αποθήκες-πηγές της *Brucella* spp είναι τα βοοειδή (*B. abortus*), τα πρόβατα και οι αίγες (*B. melitensis*) καθώς και οι χοίροι (*B. suis*). Είδη της *Brucella* spp έχουν απομονωθεί επίσης από άλλα μηρυκαστικά (καμηλοειδή, ελάφια, βίσωνες, αγριόχοιρους) καθώς και θαλάσσια θηλαστικά (δεελφίνια, φώκιες κ.ά.). Η άγρια πανίδα αποτελεί πηγή μόλυνσης των οικόσιτων μηρυκαστικών.

Ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δίνεται σε περιπτώσεις διακίνησης και εισαγωγής ζώων σε μία εκτροφή. Προκειμένου να γίνει εισαγωγή ζώων σε μία εκτροφή πρέπει αρχικά να απομονώνονται και να εξετάζονται ορολογικά προκειμένου να απομακρύνονται τα μολυσμένα.

Τα μολυσμένα ζώα απελευθερώνουν τον παθογόνο παράγοντα στο περιβάλλον με εκκρίσεις του γεννητικού συστήματος (ιστό μήτρας, λόχεια, αποβληθέντα υλικά, κολπικές εκκρίσεις), καθώς και με τα ούρα και τα κόπρανα. Εκεί διατηρούνται για χρονικό διάστημα που σχετίζεται με το περιβάλλον στο οποίο παραμένουν, και αποτελούν πηγή μόλυνσης για τα υγιή ζώα που θα έρθουν σε επαφή με τα μολυσματικά αυτά υλικά (Μπουρτζή-Χατζοπούλου, 2008).

Σε μία εκτροφή βοοειδών που μολύνεται για πρώτη φορά, το ποσοστό αποβολών κυμαίνεται μεταξύ 30-40%. Τα επόμενα χρόνια το ποσοστό των ζώων που θα αποβάλλουν μειώνεται. Συνήθως αποβάλλουν τα νεαρά κατά την πρώτη εγκυμοσύνη, και τα ευπαθή νέο-εισαγόμενα στην εκτροφή ζώα. Η αποβολή παρατηρείται μετά τον πέμπτο μήνα της εγκυμοσύνης, συνήθως τον 6^ο-8^ο μήνα. Μερικές μέρες πριν την αποβολή το μολυσμένο ζώο αποβάλλει το μικροοργανισμό με τις εκκρίσεις του γεννητικού συστήματος. Μετά την αποβολή μεγάλος αριθμός βακτηρίων (10^{10} βακτήρια ανά γραμμάριο εμβρυϊκού ιστού) αποβάλλεται για δύο έως τέσσερις εβδομάδες (Hoover, et al., 1997). Στους επόμενους τοκετούς, οι μικροοργανισμοί συνεχίζουν να διασπείρονται στο περιβάλλον με τις εκκρίσεις, γιατί το ζώο παραμένει μολυσμένο.

Η απέκκριση του μικροοργανισμού στο γάλα μπορεί να είναι παρατεταμένη, διαλείπουσα ή να διαρκέσει εφόρου ζωής, διότι ο μαστός και τα επιχώρια λεμφογάγγλια παραμένουν μολυσμένα. (CFSPHa, 2009). Τα αρσενικά δεν παίζουν σημαντικό ρόλο στην επιδημιολογία της νόσου, καθώς δρουν ως μηχανικοί φορείς για την μετάδοση του βακτηρίου (Alton, 1985).

1.4.3 Τρόποι μετάδοσης

Οι διάφοροι ξενιστές μολύνονται με την άμεση ή έμμεση επαφή με μολυσματικά υλικά (εκκρίσεις γεννητικού, αποβληθέντα έμβρυα και πλακούντες, μολυσμένα όργανα όπως σπλήνα, ήπαρ, καθώς και μολυσμένη κοπριά ή μαλλί), τα οποία περιέχουν τον

μικροοργανισμό. Ο μικροοργανισμός εισέρχεται στον οργανισμό με τους εξής τρόπους: με την κατανάλωση μολυσμένης τροφής (ειδικά για τον άνθρωπο μέσω της κατανάλωσης απαστερίωτου γάλακτος και γαλακτοκομικών προϊόντων, καθώς και φρούτων και λαχανικών στα οποία έγινε χρήση μολυσμένης κοπριάς) και νερού, μέσω λύσεων συνεχείας του δέρματος, με μολυσμένους ιστούς ή μολυσμένες επιφάνειες, καθώς και διαμέσου των βλεννογόνων (επιπεφυκότα, αναπνευστικό βλεννογόνο με την εισπνοή μολυσμένης σκόνης ή αερολυμάτων του μικροοργανισμού, γεννητικό βλεννογόνο κατά την τεχνική σπερματέγχυση με μολυσμένο σπέρμα ή σεξουαλικά (Ansels, 2014). Στα θαλάσσια θηλαστικά δεν έχει μελετηθεί πλήρως ο τρόπος μετάδοσης, αλλά θεωρείται ότι είναι παρόμοιος με αυτόν των χερσαίων ζώων (CFSPHD, 2009).

Η νόσο είναι επαγγελματική. Τα άτομα που έρχονται σε επαφή με μολυσμένα ζώα ή μολυσμένα υλικά στο εργαστήριο (κτηνίατροι, κτηνοτρόφοι, εκδοροσφαγείς, σπερματεγχύτες) εμφανίζουν μεγαλύτερες πιθανότητες να μολυνθούν. Η μετάδοση από άνθρωπο σε άνθρωπο είναι σπάνια, έχει αναφερθεί όμως σε περιπτώσεις μετάγγισης αίματος (Doqanay, et al., 2001) μεταμόσχευσης μυελού των οστών (Ertern, et al., 2000), και κατά την σεξουαλική επαφή (Vigeant, et al., 1995). Κάθετη μετάδοση μπορεί να συμβεί μέσω του πλακούντα, κατά την γαλουχία ή με την επαφή με μολυσμένο αίμα, ούρα κατά τον τοκετό (Palanduz, et al., 2000). Η περίοδος επώασης ποικίλει ανάλογα με τον ξενιστή, αλλά και το είδος της *Brucella*, με το οποίο μολύνθηκε, ενώ στα θαλάσσια θηλαστικά δεν είναι ακόμα γνωστή.

1.4.4 Παθογένεια

Η παθογένεια της νόσου επηρεάζεται από την ηλικία, το είδος, και την ανοσολογική κατάσταση του μολυσμένου ξενιστή. Σημαντικό ρόλο παίζει επίσης η εγκυμοσύνη, αλλά και η λοιμογόνος δύναμη καθώς ο αριθμός των βακτηρίων που εισέρχονται στον οργανισμό του ξενιστή. Οι βρουκέλλες λείου τύπου είναι περισσότερο λοιμογόνες από τις αδρού τύπου, επειδή οι τελευταίες δεν μπορούν να υπερσχύσουν της αμυντικής απάντησης του ξενιστή (Rittig, et al., 2003).

Το βακτήριο μετά την είσοδο του στον οργανισμό παραλαμβάνεται από τα φαγοκύτταρα (μακροφάγα, δενδριτικά κ.ά.). Μετά την είσοδο στο κύτταρο, το βακτήριο συνδέεται με ένα φαγόσωμα για να σχηματίσει ένα τροποποιημένο φαγόσωμα (βρουκελλόσωμα). Με αυτόν τον τρόπο εμποδίζει τη σύνδεση του φαγόςωματος με ένα λυσόσωμα (Arellano-Reynoso, et al., 2005). Έτσι, το βακτήριο επιζεί στο εσωτερικό του κυττάρου και πολλαπλασιάζεται. Καθώς η *Brucella* spp δεν μπορεί να πολλαπλασιαστεί εκτός του ξενιστή, το βακτήριο έχει αναπτύξει την ικανότητα να πολλαπλασιάζεται στο

εσωτερικό των κυττάρων και να αποφεύγει τον αμυντικό μηχανισμό του ξενιστή (Bargen, et al., 2012). Η Ο-αλυσίδα του λιποπολυσακχαρίτη, είναι ένα βασικό μόριο που βοηθάει την *Brucella* να εισέλθει στα φαγοκύτταρα και να αποτρέψει την ενεργοποίηση του συμπληρώματος και την απόπτωση του κυττάρου που έχει προσβληθεί (Laraque, et al., 2005). Διαθέτει μηχανισμούς που ελαχιστοποιεί τη διέγερση των υποδοχέων αναγνώρισης προτύπων (Pattern Recognition Receptors) του ξενιστή. Η δομή του λιποπολυσακχαρίτη προκαλεί μία μειωμένη και καθυστερημένου τύπου ανοσοαπάντηση, σε σχέση με τα υπόλοιπα Gram αρνητικά βακτήρια (Rittig, et al., 2001).

Το βακτήριο από τα φαγοκύτταρα, μέσω της λέμφου φθάνει στα επιχώρια λεμφογάγγλια, όπου πολλαπλασιάζεται και με το αίμα διασπείρεται σε ολόκληρο το σώμα. Έπειτα εγκαθίσταται σε διάφορα όργανα του δίκτυο-ενδοθηλιακού συστήματος (σπλήνας, ήπαρ), στο μαστό και στη μήτρα, όπου συνεχίζει να πολλαπλασιάζεται (Salcedo, et al., 2008). Η βακτηριαμία εμφανίζεται συνήθως 10-20 ημέρες μετά τη μόλυνση και διαρκεί για 30-60 ημέρες, αν και έχουν αναφερθεί περιπτώσεις παρατεταμένης βακτηριαμίας (*B. suis*, *B. canis*).

Όταν το ζώο μολύνεται κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, το βακτήριο κατευθύνεται στο μαστό και στην κυοφορούσα μήτρα, όπου προκαλείται πλακουντίτιδα, και μόλυνση του εμβρύου. Εκεί οι βρουκέλλες στοχεύουν τον εμβρυϊκό ιστό καθώς και τον ιστό της τροφοβλάστης, αποφεύγουν τον αμυντικό μηχανισμό αυτών, αναπτύσσονται ανεξέλεγκτα και προκαλείται θάνατος του εμβρύου και αποβολή. Η εκλεκτική παρουσία των βρουκελλών στο γεννητικό σύστημα ευνοείται και από την ύπαρξη της ερυθριτόλης, η οποία βρίσκεται σε μεγάλη συγκέντρωση στον πλακούντα των αγελάδων, των μικρών μηρυκαστικών και του χοίρου.

Όταν τα ζώα που μολύνονται δεν κυοφορούν, τότε η βρουκέλλα εγκαθίστανται συνήθως στο σπλήνα και στα λεμφογάγγλια και εφόσον ακολουθήσει εγκυμοσύνη, ο μικροοργανισμός θα κατευθυνθεί από τα σημεία εντόπισης του, στην κυοφορούσα μήτρα, με αποτέλεσμα την πρόκληση αποβολής. Τα μολυσμένα ζώα συνήθως αποβάλλουν μία φορά. Μετά την αποβολή ο μικροοργανισμός εγκαθίστανται συνήθως στο μαστό και στα οπισθομαστικά λεμφογάγγλια και αποβάλλεται με το γάλα. Στην επόμενη εγκυμοσύνη ο μικροοργανισμός εντοπίζεται ξανά στη μήτρα, αλλά προκαλεί ελαφριάς μορφής πλακουντίτιδα, η οποία σπάνια καταλήγει σε αποβολή. Στην περίπτωση αυτή, η εγκυμοσύνη και ο τοκετός εξελίσσονται φυσιολογικά, το ζώο όμως αποβάλλει το μικροοργανισμό με τον πλακούντα και τα λόχεια. Το νεογέννητο είναι συνήθως μολυσμένο και σε περίπτωση που δεν επιτευχθεί αυτοϊαση, θα αποβάλλει κατά την πρώτη του εγκυμοσύνη.

Όταν μολυνθεί αρσενικό ζώο, ο μικροοργανισμός εντοπίζεται στο γεννητικό του σύστημα με αποτέλεσμα την πρόκληση ορχίτιδας, επιδιδυμίτιδας, στειρότητας και παρουσίας του βακτηρίου στο σπέρμα. Τέλος και στα δύο φύλα το βακτήριο μπορεί να εντοπιστεί στις αρθρώσεις με αποτέλεσμα την πρόκληση αρθρίτιδας ή υγρώματος.

1.4.5 Ανοσολογική απάντηση

Η λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος διακρίνεται στην έμφυτη ή μη-ειδική και στην προσαρμοστική ή ειδική ανοσία. Η έμφυτη αποτελεί την πρώτη γραμμή άμυνας του οργανισμού έναντι παθογόνων, και περιλαμβάνει ανατομικά στοιχεία (δέρμα), εκκρινικά μόρια (χημειοκίνες, κυτοκίνες, το σύστημα του συμπληρώματος, οσόνιες), και κύτταρα όπως φαγοκύτταρα (ουδετερόφιλα, μονοκύτταρα, μακροφάγα, δενδριτικά) και λεμφοκύτταρα (φυσικοί φονιάδες-natural killer). Η ειδική ανοσία περιλαμβάνει τα Τ-λεμφοκύτταρα (κυτταρική ανοσία), και την παραγωγή αντισωμάτων από τα Β-λεμφοκύτταρα (χυμική ανοσία) (Parkin, et al., 2001).

Τα ουδετερόφιλα είναι τα πρώτα κύτταρα που κατευθύνονται σε μεγάλους αριθμούς στο σημείο της φλεγμονής. Αυτά καταστρέφουν τα βακτήρια μέσω της διαδικασίας της φαγοκυττάρωσης, και της απελευθέρωσης λυτικών ενζύμων και αντιδραστικών ειδών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species-ROS) (Nauseef, 2007). Η *Brucella* δεν πολλαπλασιάζεται μέσα στα ουδετερόφιλα, όμως έχει την ικανότητα να επιβιώνει μέσα σε αυτά (Kreutzer, et al., 1979).

Τα μακροφάγα και τα δενδριτικά κύτταρα παίζουν σημαντικό ρόλο, για την μετέπειτα ειδική ανοσία, στην αναγνώριση και στην συνέχεια καταστροφή των ενδοκυτταρικών βακτηρίων. Τα κύτταρα αυτά έχουν την ικανότητα να καταστρέφουν βακτήρια (καταστρέφουν το 90% των βακτηρίων που εισέρχονται σε αυτά), όμως η *Brucella*, ανέπτυξε μηχανισμούς να αποφεύγει την δράση των κυττάρων αυτών, όπως περιγράφηκε παραπάνω (Baldwin, et al., 2006).

Η αναγνώριση και η σήμανση των βακτηρίων από τα φαγοκύτταρα είναι σημαντική για την ενεργοποίηση της ειδικής ανοσίας. Τα παρουσιαστικά αυτά κύτταρα εντοπίζουν τμήματα του βακτηρίου, όπως το λιποπολυσακχαρίτη, τις λιποπρωτεΐνες και τα νουκλεϊκά οξέα, ενεργοποιώντας την παραγωγή κάποιων προ-φλεγμονωδών κυτοκινών (TNFα, Ιντερλευκίνες IL-12, IL-6, IL-1β, ιντερφερόνες τύπου I), καθώς και την έκφραση συνδιεγερτικών μορίων (CD80, CD86), προκαλώντας έτσι την ενεργοποίηση της ειδικής ανοσίας (Iwasaki, et al., 2004).

Τα λεμφοκύτταρα (φυσικοί φονιάδες, φυσικοί Τ φονιάδες, γδ Τ κύτταρα) είναι το μεταβατικό στάδιο μεταξύ ειδικής και μη-ειδικής ανοσίας. Αυτά αναγνωρίζουν μη-πεπτιδικά αντιγόνα, όπως τα φωσφολιπίδια και τα γλυκολιπίδια. Τα κύτταρα αυτά

φαίνεται να παράγουν ιντερφερόνη γ , για την αντιμετώπιση των παθογόνων, πριν την ενεργοποίηση των Th 1 κυττάρων (Dieli, et al., 2003, Sada-Ovalle, et al., 2008, Kubota, 2010, Nyirenda, et al., 2010).

Η ειδική ανοσία ενεργοποιείται μετά την μη-ειδική, και είναι ειδική κατά του κάθε παθογόνου παράγοντα. Η ενεργοποίηση του Th 1 συστήματος (κυτταρική ανοσία), οδηγεί στην παραγωγή ιντερφερόνης γ από ειδικά T λεμφοκύτταρα (CD4+ T, CD8+ T, $\gamma\delta$ T, φυσικοί φονιάδες) (Yingst, et al., 2003). Η ιντερφερόνη γ επαναφέρει τις φυσιολογικές λειτουργίες των μακροφάγων (παρουσίαση αντιγόνων, παραγωγή τοξινών, απόπτωση των μολυσμένων κυττάρων) (Skendros, et al., 2011). Η δράση της ιντερφερόνης γ ενισχύεται από την κυτοκίνη IL-10 (Kariminia, et al., 2002). Σημαντικός είναι και ο ρόλος της IL-12. Η κυτοκίνη αυτή πυροδοτεί έμμεσα την διαφοροποίηση των T-λεμφοκυττάρων (Sypek, et al., 1993). Τέλος τα T-κυτταροτοξικά κύτταρα, αναγνωρίζουν με τους υποδοχείς τους, τα μολυσμένα μακροφάγα, συνδέονται με αυτά και τα καταστρέφουν μαζί με το βακτήριο (Jinkyung, et al., 2003).

Τα B-λεμφοκύτταρα έχουν την ιδιότητα να παράγουν αντισώματα, ειδικά για το κάθε αντιγόνο (χυμική ανοσία). Τα αντισώματα, εκτός της ανασταλτικής τους δράσης που προκαλούν στο βακτήριο, λειτουργούν ως οψονίνες που διευκολύνουν, την φαγοκυττάρωση των βακτηρίων, ενεργοποιούν το συμπλήρωμα, και προάγουν την κυτταροτοξικότητα των μακροφάγων, ουδετερόφιλων και φυσικών φονιάδων (Skendros, et al., 2013). Τα αντισώματα εμφανίζονται 2-4 εβδομάδες μετά τη μόλυνση. Πρώτα εμφανίζονται οι ανοσοσφαιρίνες της κλάσεως IgM (ανίχνευση υψηλών τίτλων IgM στο αίμα υποδηλώνει πρόσφατη μόλυνση) και μετά από 1 ή 2 εβδομάδες εμφανίζονται οι ανοσοσφαιρίνες της κλάσεως IgG (1 και 2), οι οποίες παραμένουν για μεγάλο χρονικό διάστημα, και της κλάσεως IgA Η σταθερή και παρατεταμένη έκθεση του ξενιστή, σε μικρό αριθμό βακτηρίων, έχει ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη χαμηλού τίτλου αντισωμάτων, που δεν συνοδεύεται από κλινικά συμπτώματα. Σε επόμενη έκθεση του οργανισμού στο βακτήριο, αυξάνεται γρήγορα ο τίτλος των IgG₂ αντισωμάτων (FAO/WHO, 1986).

1.5 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ

1.5.1 Η νόσος στον άνθρωπο

Η βρουκέλλωση είναι μία πολυσυστηματική ασθένεια με ένα μεγάλο εύρος κλινικών συμπτωμάτων ενώ υπάρχουν και ασυμπτωματικά περιστατικά. Τα κλινικά συμπτώματα μπορεί να εμφανιστούν ξαφνικά ή σταδιακά. Τυπικά η βρουκέλλωση εμφανίζεται με μη ειδικά συμπτώματα όπως πυρετό, πονοκέφαλο, δυσφορία, πόνο στην

πλάτη και τις αρθρώσεις, μυαλγία, γενικευμένους πόνους και εφίδρωση ιδιαίτερα τη νύχτα. Σπληνομεγαλία, ηπατομεγαλία παρατηρείται κατά την κλινική εξέταση. Τα συμπτώματα από το γαστρεντερικό περιλαμβάνουν ανορεξία, ναυτία, έμετο, διάρροια. Μπορεί να εμφανιστεί επίσης αρθρίτιδα και σπονδυλίτιδα, και ιδιαίτερα στους άνδρες επιδιδυμίτιδα και ορχίτιδα. Νευρολογικά συμπτώματα, όπως αλλαγή συμπεριφοράς, μηνιγγίτιδα, εγκεφαλίτιδα, περιφερική νευροπάθεια, εμφανίζεται στο 5% των περιστατικών. Έχουν αναφερθεί ραγοειδίτιδα και οπτική νευρίτιδα. Η ενδοκαρδίτιδα, αν και σπάνια, είναι η αιτία θανάτου σε πολλές περιπτώσεις (80% όσων περιστατικών καταλήγουν). Επίσης μπορεί να επηρεαστούν και άλλα όργανα και ιστοί, οπότε παρατηρείται νεφρίτιδα, δερματίτιδα, αγγειίτιδα, λεμφαδενοπάθεια, χολοκυστίτιδα, κοκκιωματώδης ηπατίτιδα (WHO, 2006), ανάλογα με το σημείο εντόπισης του βακτηρίου.

Σε πολλούς ασθενείς, τα συμπτώματα διαρκούν δύο με τέσσερις εβδομάδες. Πολλοί εμφανίζουν μόνο διαλείπων πυρετό. Οι περισσότεροι αναρρώνουν πλήρως σε τρεις με δώδεκα μήνες. Μερικοί γίνονται χρόνιοι φορείς, ενώ υποτροπές μπορούν να συμβούν ακόμα και σε περιπτώσεις που αντιμετωπίστηκαν φαρμακευτικά. Αν και είναι δύσκολο να αποδοθούν τα συμπτώματα σε κάποιο συγκεκριμένο είδος, συνήθως η *B. melitensis* προκαλεί σοβαρή, συστηματική ασθένεια, σε σχέση με τα άλλα είδη, εξαιτίας της υψηλής αντιγονικότητας της.

Η βρουκέλλωση κατά την εγκυμοσύνη οδηγεί σε λοίμωξη του πλακούντα και του εμβρύου. Το αν οι αποβολές που προκαλεί η *Brucella* spp είναι πιο συχνές σε σχέση με τις αποβολές που προκαλούν άλλα βακτήρια δεν είναι γνωστό. Τα μολυσμένα έμβρυα γεννιούνται πρόωρα, ενώ άλλα γεννιούνται φυσιολογικά. Τα πιο κοινά συμπτώματα των νεογέννητων είναι χαμηλό βάρος, πυρετός, ηπατομεγαλία, σπληνομεγαλία, ίκτερος, αναπνευστικά προβλήματα, υπόταση, έμετος και σηψαιμία, ενώ κάποια μπορεί να είναι ασυμπτωματικά ή να έχουν ήπια συμπτώματα (WHO, 2006).

1.5.2 Η νόσος στα ζώα

Στα βοοειδή, η *Brucella abortus* προκαλεί αποβολές, γέννηση θνησιγενών ή αδύναμων μοσχарιών. Οι αποβολές συμβαίνουν κατά το δεύτερο μισό της εγκυμοσύνης, ενώ η γαλακτοπαραγωγή μειώνεται. Μετά την πρώτη αποβολή, οι επόμενες εγκυμοσύνες είναι συνήθως φυσιολογικές, οι αγελάδες όμως αποβάλλουν τον μικροοργανισμό στο γάλα και στα ούρα. Ύγρωμα, ιδιαίτερα στις αρθρώσεις των πίσω άκρων, και αρθρίτιδα εμφανίζεται σε πιο χρόνια περιπτώσεις. Στους ταύρους παρατηρείται επιδιδυμίτιδα, ορχίτιδα, και αποστήματα στους όρχεις. Στείριότητα μπορεί

να εμφανιστεί και στα δύο φύλα εξαιτίας της μητρίτιδας και της ορχίτιδας αντίστοιχα. Οι θάνατοι (εκτός των αποβολών) είναι σπάνιοι. Παρόμοια συμπτώματα εμφανίζουν και άλλα μηρυκαστικά όπως τα καμηλοειδή, οι βίσωνες καθώς και τα ιπποειδή. Τα μη κυοφορούντα θηλυκά είναι συνήθως ασυμπτωματικά (CFSPHa, 2009).

Στα αιγοπρόβατα η *Brucella melitensis* προκαλεί αποβολές και γέννηση θνησιγενών. Τα ζώα συνήθως αποβάλλουν μία φορά, και η γαλακτοπαραγωγή μειώνεται. Η μαστίτιδα, δεν είναι τόσο συχνή. Οξεία ορχίτιδα και επιδιδυμίτιδα προκαλούν στειρότητα στα αρσενικά, ενώ αρθρίτιδα εμφανίζεται και στα δύο φύλα. Τα μη κυοφορούντα θηλυκά είναι συνήθως ασυμπτωματικά (CFSPH, 2007).

Στους χοίρους η *Brucella suis* προκαλεί αποβολές, οι οποίες μπορεί να συμβούν σε οποιοδήποτε στάδιο της εγκυμοσύνης, ενώ δεν αποκλείεται η γέννηση θνησιγενών χοιριδίων. Στα θηλυκά παρατηρείται μητρίτιδα, ενώ στα αρσενικά ορχίτιδα. Στειρότητα, οίδηματικές αρθρώσεις, οίδηματικά έλτρα τενόντων, και χλωρότητα εμφανίζεται και στα δύο φύλα. Σπανιότερα εμφανίζεται παράλυση, σπονδυλίτιδα και αποστήματα σε κάποια όργανα. Κάποια ζώα, παραμένουν ασυμπτωματικά. Στους λαγούς, ο βióτυπος 2, προκαλεί οζίδια στα εσωτερικά όργανα, ιδιαίτερα στα αναπαραγωγικά, ενώ στα ελάφια ο βióτυπος 4 προκαλεί αποβολές, μητρίτιδα, μαστίτιδα, ορχίτιδα και χλωρότητα (CFSPHb, 2009).

Οι παθολογοανατομικές αλλοιώσεις δεν είναι παθογνωμονικές του νοσήματος. Κάποια αποβληθέντα έμβρυα εμφανίζονται φυσιολογικά, ενώ άλλα έχουν αυτολυθεί ή εμφανίζουν οίδημα στον υποβλεννογόνιο χιτώνα και αιμορραγικό εξίδρωμα στις κοιλότητες του σώματος. Στα έμβρυα των μηρυκαστικών, ο σπλήνας και το ήπαρ είναι διογκωμένα, ενώ οι πνεύμονες εμφανίζουν πνευμονία και πλευρίτιδα. Παρατηρείται πλακουντίτιδα, με τις κοτυληδόνες να είναι κόκκινες, κίτρινες ή νεκρωτικές. Στα ενήλικα, παρατηρούνται κοκκιωματώδεις ή πυώδεις αλλοιώσεις στα αναπαραγωγικά όργανα, και των δύο φύλων (μητρίτιδα, ορχίτιδα), στο μαστικό αδένα, στα λεμφογάγγλια, στα οστά, στις αρθρώσεις, και σε άλλα όργανα (CFSPH, 2007).

Η *B. onis* προσβάλλει τα πρόβατα, αλλά όχι τις αίγες. Προκαλεί στους τράγους επιδιδυμίτιδα, ορχίτιδα και στειρότητα. Το σπέρμα είναι κακής ποιότητας. Αλλοιώσεις είναι ψηλαφητές στο όσχεο, ενώ οι όρχεις μπορεί να ατροφήσουν. Μπορεί να προκληθεί αποβολή, πλακουντίτιδα και περιγεννητική θνησιμότητα, ενώ οι συστηματικές μολύνσεις είναι σπάνιες (CFSPHc, 2009). Οι μεταθανάτιες αλλοιώσεις που προκαλεί αυτό το είδος περιορίζονται στους όρχεις και την επιδιδυμίδα. Η διόγκωση της επιδιδυμίδας μπορεί να είναι ετερόπλευρη ή αμφοτερόπλευρη. Ινώδης ατροφία παρατηρείται στους όρχεις, ενώ η πλακουντίτιδα, αν και σπάνια, παρατηρείται στις μολυσμένες προβατίνες (CFSPHc, 2009).

Η *B. canis* προκαλεί αποβολές στους σκύλους, κατά την έβδομη με ένατη εβδομάδα της εγκυμοσύνης, και γέννηση θνησιγενών. Πρώιμοι εμβρυικοί θάνατοι και επαναρρόφηση του εμβρύου, έχουν αναφερθεί κατά τις πρώτες εβδομάδες μετά την γονιμοποίηση. Τα μολυσμένα νεογέννητα είναι αδύναμα ή πεθαίνουν λίγες μέρες μετά τον τοκετό, ενώ κάποια αναπτύσσονται φυσιολογικά. Παρατηρείται επίσης επιδιδυμίτιδα, οίδημα του όσχεου, ορχίτιδα, κακής ποιότητας σπέρμα, ατροφία των όρχεων, λεμφαδενίτιδα, ληθαργικότητα, κ.ά. Οι θάνατοι (εκτός των αποβολών) είναι σπάνιοι, ενώ πολλοί σκύλοι παραμένουν ασυμπτωματικοί (CFSPH, 2007). Τα αποβληθέντα κουτάβια, συχνά έχουν αυτολυθεί και εμφανίζουν γενικευμένη βακτηριακή λοίμωξη. Οι αλλοιώσεις των εμβρύων περιλαμβάνουν οίδημα του υποβλεννογόνιου χιτώνα, αιμορραγίες στην κοιλιακή κοιλότητα, οροαιματηρό περιτοναϊκό υγρό, και εκφυλιστικές αλλοιώσεις στο σπλήνα, ήπαρ, νεφρά και λεπτό έντερο. Στα ενήλικα, τα λεμφογάγγλια, το ήπαρ και ο σπλήνας είναι διογκωμένα, ενώ παρατηρείται οίδημα του όσχεου, δερματίτιδα του όσχεου, επιδιδυμίτιδα, ορχίτιδα, προστατίτιδα και ατροφία των όρχεων στα αρσενικά, και μητρίτιδα στα θηλυκά. Λιγότερο συχνά παρατηρείται δισκοσπονδυλίτιδα, μηνιγγίτιδα, εγκεφαλίτιδα, οστεομυελίτιδα, και αποστήματα στα εσωτερικά όργανα (CFSPH, 2007).

Οι πληροφορίες για την βρουκέλλωση στα θαλάσσια θηλαστικά είναι περιορισμένες. Επηρεάζονται τα αναπαραγωγικά όργανα, όπως στα υπόλοιπα είδη, προκαλώντας αποβολές και πλακουντίτιδα, γέννηση θνησιγενών, επιδιδυμίτιδα, ορχίτιδα, ενώ εικασίες γίνονται για συστηματικές λοιμώξεις, με βάση την εικόνα των παθολογοανατομικών αλλοιώσεων (CFSPHd, 2009).

1.6 ΘΕΡΑΠΕΙΑ

1.6.1 Παραγωγικά ζώα (βοοειδή, αιγοπρόβατα, χοίροι)

Επειδή η βρουκέλλωση είναι ένα νόσημα υψηλής σημασίας για την δημόσια υγεία και την κτηνοτροφική παραγωγή, δεν πραγματοποιείται θεραπεία για τα μηρυκαστικά και τους χοίρους. Όταν τα ζώα παρουσιάσουν θετική αντίδραση σε εξέταση για βρουκέλλωση, οδηγούνται στο σφαγείο, όπου σφάζονται χωριστά από τα υπόλοιπα, αφού προηγουμένως ληφθούν προφυλάξεις ώστε να αποφευχθεί ο κίνδυνος μόλυνσης των άλλων σφαγίων, της γραμμής σφαγής και του προσωπικού που παρευρίσκεται στο σφαγείο. Το κρέας των ζώων στα οποία η επιθεώρηση μετά τη σφαγή αποκαλύπτει αλλοιώσεις που χαρακτηρίζουν οξεία μόλυνση από βρουκέλλωση, χαρακτηρίζεται ακατάλληλο για κατανάλωση από τον άνθρωπο. Στις υπόλοιπες περιπτώσεις που τα ζώα παρουσίασαν θετική αντίδραση ή πρόκειται για ζώα καθολικής σφαγής, οι μαστοί,

η ουρογεννητική οδός και το αίμα χαρακτηρίζονται ακατάλληλα για κατανάλωση, ενώ το υπόλοιπο σφάγιο δίνεται για κατανάλωση (συνήθως σε διαφορετική τιμή από τα υπόλοιπα).

1.6.2 Ζώα συντροφιάς (σκύλοι) και θαλάσσια θηλαστικά, άνθρωποι

Η θεραπεία στο σκύλο περιλαμβάνει τη χρήση μινοκυκλίνης (12,5 mg/Kg/12ώρες/p.o για 4 εβδομάδες) και διυδροστρεπτομυκίνης (10mg/kg/12 ώρες/im για 7 ημέρες, την πρώτη και τέταρτη εβδομάδα. Αντί αυτών μπορεί να χρησιμοποιηθεί δοξυκυκλίνη (5-10mg/kg/12ώρες/p.o.) και γενταμυκίνη (5mg/kg/24ώρες/sb για 7 ημέρες). Στα δύσκολα περιστατικά, συνιστάται η προσθήκη κάποιας κινολόνης ή της ριφαμπικίνης σε τριπλό αντιβιοτικό σχήμα. Η πλήρης εξουδετέρωση του βακτηρίου είναι δύσκολη, ενώ η πλήρης ίαση μπορεί να μην επέλθει ποτέ (Sherding, 2006). Στα θαλάσσια θηλαστικά, η ασθένεια, δεν έχει περιγραφεί πλήρως, οπότε δεν υπάρχει θεραπεία. Πιθανώς να μπορεί να γίνει χρήση αντιβιοτικών, παρόμοιων με αυτών που χρησιμοποιούνται στα ζώα συντροφιάς.

Η θεραπεία της βρουκέλλωσης στον άνθρωπο, βασίζεται στη χρήση αντιβιοτικών για μεγάλο χρονικό διάστημα. Το επιθυμητό αποτέλεσμα είναι να περιοριστεί ο πολλαπλασιασμός των βακτηρίων καθώς και να μην εμφανιστούν υποτροπές. Για αυτό το λόγο γίνεται χορήγηση πολλών αντιβιοτικών μαζί, για να έχουν συνεργική δράση. Το πιο γνωστό σχήμα που υπάρχει για τις απλές μορφές της νόσου είναι: δοξυκυκλίνη (100mg/12ώρες/p.o.) για 6 εβδομάδες. Αυτή μπορεί να συνδυαστεί με στρεπτομυκίνη, γενταμυκίνη, ριφαμπικίνη, φθοριοκινολόνες, τριμεθοπρίμη/σουλφαμεθοξαζόλη, σε δοσολογικά σχήματα που αποφασίζει ο εκάστοτε θεράπων ιατρός. Όπως είναι εύλογο, κάθε επιπλοκή της νόσου (σπονδυλίτιδα, πάθηση του νευρικού συστήματος, ενδοκαρδίτιδα, βρουκέλλωση στην εγκυμοσύνη ή σε μικρά παιδιά) χρήζει ειδικής μεταχείρισης (WHO, 2006).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΒΡΟΥΚΕΛΛΩΣΗ ΚΑΙ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ: ΠΡΟΛΗΨΗ ΚΑΙ ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ

Σε κάθε ζωοανθρωπονόσο, πρέπει να προασπιστεί η δημόσια υγεία. Οι ομάδες πληθυσμού που κινδυνεύουν περισσότερο για να μολυνθούν από βρουκέλλα, είναι όσοι έρχονται σε άμεση επαφή με μολυσμένα ζώα ή προϊόντα αυτών. Αυτά περιλαμβάνουν τους κτηνιάτρους, κτηνοτρόφους, εκδοροσφαγείς, ζωκόμους, τεχνητούς σπερματεγχύτες κ.α., καθώς και όσους επεξεργάζονται προϊόντα ζώων, π.χ. επεξεργασία δέρματος, ερίου. Επιπλέον μεγάλο κίνδυνο, εμφανίζουν και όσοι εργάζονται σε εργαστήρια, και εξετάζουν υλικά, που προέρχονται από μολυσμένα ζώα. Σε περίπτωση αποβολών σε μία εκτροφή, πρέπει να λαμβάνονται όλα τα κατάλληλα μέτρα για να μην μεταδοθούν τα παθογόνα στον άνθρωπο (κατάλληλος ρουχισμός, υγειονομική καταστροφή των αποβληθέντων υλικών) (WHO, 2006).

Στις ενδημικές χώρες, ο κύριος τρόπος μετάδοσης της βρουκέλλωσης στον άνθρωπο, είναι η κατανάλωση νωπού γάλατος, και γαλακτοκομικών προϊόντων που προέρχονται από απαστεριώτο γάλα. Για αυτό το λόγο, το γάλα από ενδημικές χώρες, ή από εκτροφές που δεν είναι επίσημα απαλλαγμένες από βρουκέλλωση, πρέπει να παστεριώνεται πριν δοθεί στην κατανάλωση ή να υποστεί ωρίμανση τουλάχιστον δύο μηνών, όταν χρησιμοποιείται για παραγωγή γαλακτοκομικών προϊόντων (Regulation (EC) No 853/2004, 2004). Τα ζώα που εμφανίζουν ενεργή μόλυνση, δεν πρέπει να αρμέγονται, ενώ σε αντίθετη περίπτωση, το γάλα που συλλέγεται, απορρίπτεται.

Είναι αποδεκτό ότι οι βρουκέλλες καταστρέφονται εύκολα στους μυς των σφαγίων από τα γαλακτικό οξύ, που παράγεται κατά την γλυκογονόλυση (Gracey, 1986). Το καλώς ψημένο κρέας δεν αποτελεί πηγή μόλυνσης για τον καταναλωτή, δεδομένου ότι το βακτήριο είναι ευαίσθητο στην θερμότητα. Εξάλλου, τα ζώα που σφάζονται στο πλαίσιο του προγράμματος εκρίζωσης της νόσου, οδηγούνται σε συγκεκριμένα σφαγεία και στη συνέχεια γίνεται υγειονομική καταστροφή τους. Όταν διαπιστωθούν σφάγια ύποπτα για *Brucella*, απορρίπτονται. Παρόλα αυτά, το σφάγιο ζώων, τα οποία είναι θετικά ή ύποπτα σε ορολογικές δοκιμές, και δεν εμφανίζουν μακροσκοπικές αλλοιώσεις, μπορεί να δοθεί στην κατανάλωση, αφού προηγουμένως απορριφθούν οι μαστοί, το αίμα, τα εσωτερικά όργανα (Regulation (EC) No 854/2004, 2004), καθώς και όλα τα μυϊκά λεμφογάγγλια (προμηριαία, λαγόνια, ισχιακά, επιπολής τραχηλικά ή προωμοπλατιαία) (Καραϊωάννογλου, 2008).

Κάθε ζωοανθρωπονόσος πρέπει να περιορίζεται με οποιονδήποτε τρόπο, διότι μπορεί να λάβει τεράστια έκταση με καταστρεπτικές συνέπειες. Ανέκαθεν, όπλο του ανθρώπου για την αντιμετώπιση τους ήταν η χρήση των εμβολίων (χαρακτηριστικό παράδειγμα η εξάλειψη της ευλογιάς). Εμβόλιο για τον άνθρωπο δεν υπάρχει, έχουν όμως αναπτυχθεί αρκετά εμβόλια για το ζωικό κεφάλαιο. Ταυτόχρονα, σε νοσήματα που μπορεί να επηρεάσουν μεγάλο αριθμό του ζωικού πληθυσμού, όπως η βρουκέλλα, εφαρμόζονται ειδικά προγράμματα ελέγχου και εκρίζωσης της νόσου, ειδικά για τον εκάστοτε αιτιολογικό παράγοντα (π.χ. *Brucella*, φυματίωση, λύσσα κλπ.).

2.1 ΠΡΟΛΗΨΗ ΚΑΙ ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ

2.1.1 Εμβόλια

Η χρήση των εμβολίων είναι ζωτικής σημασίας για τον έλεγχο και την αντιμετώπιση της βρουκέλλωσης. Έχουν αναπτυχθεί διάφορα είδη εμβολίων, έναντι των παθογόνων ειδών του γένους *Brucella*.

2.1.2 Εμβόλια από *B. abortus*, στέλεχος S19

Ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο εμβόλιο για την αντιμετώπιση της βρουκέλλωσης στα βοοειδή είναι το *B. abortus* S19. Χρησιμοποιεί ζωντανά κύτταρα, ελαττωμένης λοιμογόνου δύναμης, και χορηγείται στα νεαρά θηλυκά στην ηλικία μεταξύ 3 και 6 μηνών, σε μία δόση, υποδόριας έγχυσης των $5-8 \times 10^{10}$ CFU. Μικρότερη δόση μπορεί να χορηγηθεί στα ενήλικα, όμως πολλά από αυτά μπορεί να εμφανίσουν εξασθενημένη τη νόσο, και να αποβάλλουν ή να εκκρίνουν τον μικροοργανισμό με το γάλα. Εναλλακτικά μπορεί να χορηγηθεί το εμβόλιο σε μία ή δύο δόσεις μέσω του επιπεφυκότα. Το εμβόλιο αυτό παρέχει προστασία από τα είδη *B. abortus* και *B. melitensis* (OIEb, 2016) και δεν εφαρμόζεται στην Ελλάδα.

2.1.3 Εμβόλια από *B. abortus*, στέλεχος RB51

Από το 1996, το εμβόλιο *B. abortus*, στέλεχος RB51, έχει οριστεί το επίσημο εμβόλιο για την πρόληψη της βρουκέλλωσης στα βοοειδή. Προέρχεται από μεταλλαγμένο στέλεχος, αδρού τύπου (R), της *B. abortus* στέλεχος 2308, που αναπτύχθηκε σε υπόστρωμα, παρουσίας του αντιβιοτικού ριφαμπικίνης. Όταν χορηγούνται μεγάλες δόσεις του εμβολίου αυτού ενδοφλέβια, φαίνεται να προκαλείται σοβαρή πλακουντίτιδα, και απέκκριση του μικροοργανισμού στο γάλα, ενώ μπορεί να προκαλέσει αποβολές και περιγεννητική θνησιμότητα, όταν χορηγείται σε ζώα που κυοφορούν. Τα αντισώματα που παράγονται μετά την χορήγηση του εμβολίου, δεν αντιδρούν με τον λείο λιποπολυσακχαρίτη (S-LPS), που είναι το κύριο αντιγόνο, των

ορολογικών δοκιμών Rose Bengal Test, Complement Fixation test, i-ELISA, και έτσι δεν μπορεί να ανιχνευτεί με τις δοκιμές αυτές. Το εμβόλιο αυτό δεν είναι αποτελεσματικό, για την πρόληψη από μόλυνση με *B. melitensis* στα αιγοπρόβατα, και την πρόληψη από *B. suis* στους χοίρους (Stoffregen, et al., 2006).

2.1.4 Εμβόλια από *B. melitensis*, στέλεχος REV-1

Το εμβόλιο αυτό προέχεται από μεταλλαγμένα, λείου τύπου (S) στελέχη της *B. melitensis*. Διαφέρουν τα βιοχημικά και καλλιεργητικά χαρακτηριστικά του εμβολιακού στελέχους από τα φυσικά στελέχη. Χρησιμοποιείται κυρίως για τον εμβολιασμό αιγών και προβάτων, καθώς αποτελεί το εμβόλιο αναφοράς για τα είδη αυτά. Υπάρχουν ενδείξεις για την αποτελεσματικότητα του εμβολίου έναντι της *B. melitensis* στα βοοειδή, και για αυτό χρησιμοποιείται για την ανοσοποίηση των αγελαίων βοοειδών. Χορηγείται στα νεαρά αιγοπρόβατα, ηλικίας 3 μέχρι 5 μηνών, στον επιπεφυκότα, στη δόση των $0,5-2 \times 10^9$ CFU. Εμφανίζεται προστασία μακράς δράσης, και τα εμβολιακά αντισώματα ανιχνεύονται μέχρι και 6 μήνες από τον εμβολιασμό (Elberg, 1996). Όταν χορηγείται σε ζώα που κυοφορούν, σε πλήρη ή μειωμένη δόση, οδηγεί σε αποβολές και απέκκριση του μικροοργανισμού στο γάλα (Blasco, 1997).

2.1.5 Εμβόλια από *B. suis*, στέλεχος S2

Πρόκειται για εμβόλιο που περιέχει ζωντανά ελαττωμένης λοιμογόνου δύναμης βακτήρια, παράγωγο του είδους *B. suis*, βιότυπος 1. Χρησιμοποιήθηκε στην Κίνα για την ανοσοποίηση των χοίρων. Εξαιτίας της έλλειψης ισχυρών αποδείξεων για την αποτελεσματικότητά του, δεν χρησιμοποιείται ευρέως (Xie, 1986).

2.2 ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΑ ΕΛΕΓΧΟΥ ΚΑΙ ΕΚΡΙΖΩΣΗΣ

Σκοπός των προγραμμάτων ελέγχου και εκρίζωσης είναι η αποτελεσματική εξάλειψη του μικροοργανισμού από μία περιοχή και κατ' επέκταση από όλη την χώρα. Υπάρχουν διάφορα προγράμματα ελέγχου και εκρίζωσης της βρουκέλλωσης στον κόσμο, το καθένα προσαρμοσμένο στις συνθήκες της κάθε χώρας, για αυτό κρίνεται σκόπιμο να περιγραφούν τα προγράμματα που ισχύουν στην Ελλάδα.

2.2.1 Πρόγραμμα αιγοπροβάτων

Το πρόγραμμα ελέγχου εκρίζωσης αιγοπροβάτων στην Ελλάδα, άρχισε το 1977. Από τότε έχει αλλάξει από τον αρχικό σχεδιασμό, εξαιτίας αποτυχίας ορισμένων προδιαγραφών του προγράμματος. Από το 2012, το πρόγραμμα εκρίζωσης, χωρίζει την

Ελλάδα σε δύο μεγάλες ζώνες, τη ζώνη εμβολιασμού, που περιλαμβάνει την ηπειρωτική Ελλάδα και τα νησιά Λέσβο, Θάσο και Εύβοια, και τη ζώνη εκρίζωσης, που περιλαμβάνει όλα τα υπόλοιπα νησιά.

Ένα πρόγραμμα ελέγχου και εκρίζωσης είναι δύσκολο να εφαρμοστεί, επειδή πρέπει να υπάρχει συντονισμός τόσο της κεντρικής αρχής όσο και των τοπικών αρχών. Επίσης πολλά ποίμνια έχουν ημι-νομαδικό χαρακτήρα, και τα οποία μετακινούνται κατά τους θερινούς μήνες και χρησιμοποιούν κοινούς βοσκοτόπους με άλλα ποίμνια. Τέλος μεγάλος παράγοντας είναι η χρηματοδότηση όλου του προγράμματος, για την υλοποίηση των εμβολιασμών, των ελέγχων των ζώων αλλά και για τη χρηματοδότηση των κτηνιάτρων που συμμετέχουν στο πρόγραμμα. Ενδεικτικά, το πρόγραμμα ελέγχου και εκρίζωσης των αιγοπροβάτων θα κοστίσει στη χώρα, για το διάστημα 2016-2018, περίπου 40 εκατομμύρια ευρώ (European Commission, 2015).

2.2.2 Πρόγραμμα βοοειδών

Για τα βοοειδή, οι εκτροφές διαχωρίζονται στις εξής κατηγορίες: B1, για εκτροφές αγνώστου υγειονομικού καθεστώτος, όπου δεν υπάρχουν πληροφορίες για την βρουκέλλωση για τα τελευταία πέντα χρόνια, B2 οι εκτροφές αρνητικές ως προς την βρουκέλλωση, όπου όλα τα βοοειδή άνω των 12 μηνών έχουν εξεταστεί με αρνητικά αποτελέσματα ή έχουν γίνει δύο δειγματοληψίες γάλατος από το δοχείο συλλογής της εκτροφής σε διάστημα 3-4 μηνών με αρνητικά αποτελέσματα. B3 χαρακτηρίζονται οι εκτροφές που είναι απαλλαγμένες από την βρουκέλλωση, όπου έχει γίνει εμβολιασμός με RB-51, κανένα ζώο δεν εμφανίζει κλινικά συμπτώματα, όλα τα ζώα άνω των 12 μηνών έχουν εξεταστεί, έχουν γίνει δειγματοληψίες από το δοχείο συλλογής γάλατος, με αρνητικά αποτελέσματα. B4 χαρακτηρίζονται οι εκτροφές που είναι επίσημα απαλλαγμένες από τη βρουκέλλωση, όπου δεν υπάρχουν βοοειδή που να έχουν εμβολιαστεί τα τελευταία τρία χρόνια, δεν παρατηρούνται κλινικά συμπτώματα σε κανένα από τα ζώα, όλα τα ζώα άνω των 12 μηνών έχουν εξεταστεί καθώς και έχουν γίνει δειγματοληψίες από το δοχείο συλλογής γάλατος, με αρνητικά αποτελέσματα. B3αν ή B4 αν χαρακτηρίζονται οι εκτροφές που βρίσκονται σε αναστολή του υγειονομικού καθεστώτος B3 και B4 αντίστοιχα, όταν δεν εκπληρείται ένας ή περισσότεροι λόγοι από αυτούς που περιγράφηκαν παραπάνω. Τέλος B+ χαρακτηρίζονται οι εκτροφές, στις οποίες υπάρχει έστω ένα επιβεβαιωμένο θετικό αποτέλεσμα.

Ο εμβολιασμός με το εμβόλιο RB-51, γίνεται υποδοριώς σε δόση $10-34 \times 10^9$ CFU, μία φορά σε όλα τα υγιή θηλυκά βοοειδή, άνω των 4 μηνών. Τα θηλυκά δεν πρέπει να κυοφορούν, επειδή μπορεί να αποβάλλουν ως παρενέργεια του εμβολίου. Όπως έχει

αναφερθεί το εμβολιακό αυτό στέλεχος δεν ανιχνεύεται με τις κλασσικές ορολογικές δοκιμές (RBT, CFT, i-ELISA). Τα εμβολιασμένα ζώα απαγορεύεται να οδηγηθούν στο σφαγείο πριν επέλθει ο χρόνος αναμονής του εμβολίου, σε διαφορετική περίπτωση θα αντιμετωπίζονται ως βρουκελλικά από τις αρμόδιες αρχές.

Υπάρχουν και εκτροφές βοοειδών (που αποτελούνται συνήθως από αγελαία βοοειδή), σε κάποιες περιοχές της χώρας, που εμβολιάζονται με το REV-1 εμβόλιο για την προστασία των ζώων από την *B. abortus* και την *B. melitensis*, καθώς σε αυτές τις περιοχές τα βοοειδή έρχονται σε επαφή πολύ συχνά με αιγοπρόβατα. Σε αυτήν την περίπτωση οι εκτροφές βοοειδών χαρακτηρίζονται ως εξής: Εβ- ανεμβολίαστη εκτροφή, όπου έχουν εμβολιαστεί λιγότερο από το 90% των θηλυκών άνω των 4 μηνών, Εβ+ εμβολιασμένη εκτροφή, όπου έχουν εμβολιαστεί περισσότερα από το 90% των θηλυκών ζώων, άνω των 4 μηνών, και Θβ+ εκτροφή μολυσμένη από βρουκέλλωση, όπου υπάρχει ακόμα και ένα επιβεβαιωμένο περιστατικό βρουκέλλωσης.

Σε περίπτωση που υπάρχει κάποιο ζώο θετικό στην *Brucella*, οδηγείται στο σφαγείο. Σε μία εκτροφή που περισσότερο από το 50% ζώων βρέθηκε θετικό στην βρουκέλλωση, πραγματοποιείται καθολική σφαγή των ζώων (Φύλλο Εφημερίδας της Κυβερνήσεως, 2015).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΜΕΘΟΔΟΙ ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ

Λόγω της σημασίας της βρουκέλλωσης για την δημόσια υγεία και της ανάγκης για περιορισμό της νόσου στα ζώα ήταν σημαντικό να αναπτυχθούν μέθοδοι έγκαιρης και αξιόπιστης διάγνωσης. Για το λόγο αυτό έχουν αναπτυχθεί αρκετές δοκιμές. Χωρίζονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες. Η πρώτη περιλαμβάνει τις μεθόδους άμεσης ανίχνευσης του βακτηρίου (μικροσκόπηση, καλλιέργεια, βιοχημικές και μοριακές μέθοδοι). Η δεύτερη όλες τις μεθόδους έμμεσης ανίχνευσης του αιτιολογικού παράγοντα (ορολογικές δοκιμές) με την ανίχνευση των αντισωμάτων στον ορό αίματος και γάλακτος (Πίνακας 7).

3.1 Άμεση διάγνωση

3.1.1 Μικροσκόπηση

Το καταλληλότερο υλικό για την άμεση μικροσκόπηση των βακτηρίων είναι οι εμβρυικοί υμένες, πλακούντας και κοτυληδόνες, το περιεχόμενο του στομάχου του αποβληθέντος εμβρύου, το κοιλιακό έκκριμα μετά την αποβολή, και το σπέρμα (Marin, et al., 1996).

Η χρώση που χρησιμοποιείται για το σκοπό αυτό είναι η τροποποιημένη Ziehl-Neelsen (Stamp) (Stamp, et al., 1950), κατά την οποία οι βρουκέλλες εμφανίζονται οξεάντοχες (ΟΙΕ, 2009). Η μέθοδος αυτή έχει χαμηλή ευαισθησία σε επιχρίσματα από γάλα και γαλακτοκομικά προϊόντα, διότι η ερμηνεία των αποτελεσμάτων εμποδίζεται από την ύπαρξη σφαιριδίων λίπους στο επίχρισμα (ΟΙΕ, 2009). Προσοχή πρέπει να δοθεί στην αξιολόγηση των αποτελεσμάτων της χρώσης, επειδή άλλοι μικροοργανισμοί που προκαλούν αποβολές (*Chlamydophila abortus*, *Coxiella burnetii*), έχουν παρόμοια μορφολογία με τις βρουκέλλες και μπορεί να γίνει λάθος στη διάγνωση. Για αυτό το λόγο, τα αποτελέσματα που προκύπτουν, μετά από την μικροσκοπική εξέταση επιχρισμάτων, πρέπει να επιβεβαιώνονται από δοκιμές καλλιέργειας (Poester, et al., 2010).

3.1.2 Καλλιέργεια

Η καλλιέργεια αποτελεί τον χρυσό κανόνα για την διάγνωση του μικροοργανισμού. Υλικό, ίδιο με αυτό που περιγράφηκε παραπάνω, λαμβάνεται και ενοφθαλμίζεται σε θρεπτικά υποστρώματα, ώστε να αναπτυχθεί ο μικροοργανισμός. Για τα ενήλικα ζώα το κατάλληλο υλικό για καλλιέργεια του μικροοργανισμού είναι ο

σπλήνας και τα λεμφογάγγλια (κυρίως τα οπισθομαστικά). Οι βρουκέλλες κατά την ανάπτυξη τους σε θρεπτικά υποστρώματα δίνουν δύο ειδών αποικίες, τις λείου τύπου και τις αδρού τύπου. Τα θρεπτικά αυτά υποστρώματα μπορεί να είναι είτε βασικά είτε εκλεκτικά. Η *Brucella* αναπτύσσεται κυρίως σε συνθήκες pH 6.6-7.4 (Anses, 2014).

Το πιο κοινά υποστρώματα είναι, το Tryptose soy agar (TSA), το αιματούχο άγαρ (Blood agar base), και το Columbia agar. Σε αυτά προστίθεται ορός βοοειδούς ή αλόγου (2-5%), για να μπορέσουν να αναπτυχθούν στελέχη όπως ο βιότυπος 2 της *B. abortus*. Άλλα υποστρώματα που χρησιμοποιούνται είναι το serum-dextrose agar-SDA, και το glycerol dextrose agar (Alton, et al, 1988), τα οποία χρησιμοποιούνται κυρίως για την παρατήρηση των αποικιών.

Τα βασικά υποστρώματα χρησιμοποιούνται και για την παρασκευή εκλεκτικών υποστρωμάτων. Προστίθενται σε αυτά τα κατάλληλα αντιβιοτικά, για να παρεμποδιστεί η ανάπτυξη μικροοργανισμών, εκτός της *Brucella*. Το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο υπόστρωμα είναι το υπόστρωμα Farrell (Farrell, 1974), το οποίο παρασκευάζεται με την προσθήκη πέντε αντιβιοτικών (πολυμυξίνη, βακιτρακίνη, ναταμυκίνη, ναλιδιζικό οξύ, βανκομυκίνη) και ενός αντιμυκητιασικού (νυστατίνη) σε ένα βασικό υπόστρωμα. Όμως οι συγκεντρώσεις του ναλιδιζικού οξέος και της βακιτρακίνης που χρησιμοποιούνται στο υπόστρωμα Ferrell, έχουν ανασταλτική δράση σε κάποια στελέχη της *B. abortus* και της *B. melitensis* (Martin, et al., 1996a). Για αυτό το λόγο είναι σωστό να γίνει ταυτόχρονη καλλιέργεια του παθολογικού υλικού στα υποστρώματα Ferrell, Thayer-Martin ή *Brucella*. Μετά την ανάπτυξη των μικροοργανισμών γίνεται λήψη αποικιών, από τα θρεπτικά υποστρώματα, και βιοχημική εξέταση αυτών, προκειμένου να γίνει ταυτοποίηση του βιοτύπου.

3.1.3 Βιοχημικές δοκιμές

Προκειμένου να γίνει ταυτοποίηση του είδους αλλά και του βιοτύπου των βακτηρίων, γίνονται κάποιες βιοχημικές δοκιμές. Γενικά οι δοκιμές αυτές περιλαμβάνουν, την παρατήρηση της χρώσης των βακτηρίων κατά Gram ή/και Stamp, η μορφολογία των αποικιών, οι δοκιμές ουρεάσης, οξειδάσης, καταλάσης, η λύση από φάγους, η συγκόλληση με -A, -M, -R μονοδύναμους ορούς, η ανάπτυξη σε CO₂ ή O₂, η παραγωγή υδρόθειου (H₂S), η ανάπτυξη σε υποστρώματα παρουσίας των χρωστικών βασικής φουξίνης και θειονίνης, η αντίδραση Voges-Proskauer, οι δοκιμές της ινδόλης, των κιτρικών, του κόκκινου του μεθυλίου, της κινητικότητας, των νιτρικών και της β-γαλακτοσιδάσης (OIE, 2009).

Οι βρουκέλλες εμφανίζονται κόκκινες σε επιχρίσματα, τα οποία έχουν γίνει με χρώση Stamp, και κόκκινες-ροζ σε επιχρίσματα, τα οποία έχουν γίνει με χρώση Gram.

Οι αποικίες λείου τύπου είναι κυρτές, διαφανείς, λαμπερές με ομαλά όρια και εμφανίζουν λευκό-μελή χρωματισμό. Οι αποικίες αδρού τύπου είναι επίπεδες με ξηρή όψη, μη ομαλή περιφέρεια, κοκκώδη επιφάνεια, και εμφανίζουν λευκό, υποκίτρινο έως καστανόφαιο χρωματισμό (Garin-Bastuji, et al., 1990). Η κατάλληλη χρώση, για την παρατήρηση των αποικιών είναι η Crystal-violet.

Η δοκιμή της ουρεάσης γίνεται, για να διαπιστωθεί αν ο υπό έλεγχο μικροοργανισμός διασπά την ουρία, μέσω της παραγωγής του ενζύμου ουρεάσης. Χρησιμοποιούνται άγαρ ή ζωμός (broth) ουρίας σε σωλήνες. Σε αυτούς προστίθενται αποικίες από τρυβλίο πετρί. Το χρώμα της ουρίας (ή σε περίπτωση αρνητικής εξέτασης) είναι κίτρινο-πορτοκαλί. Σε περίπτωση θετικής εξέτασης αλλάζει ο χρωματισμός του σωλήνα σε ροζ. Ειδικότερα στην περίπτωση που έχουμε άγαρ ουρίας, είναι δυνατόν να υπάρχουν και οι δύο χρωματισμοί. Σε αυτήν την περίπτωση ο μικροοργανισμός διασπά την ουρία με καθυστέρηση (NHS, 2015). Τα περισσότερα είδη του βακτηρίου εμφανίζουν θετική δοκιμή ουρεάσης με εξαίρεση το *B. onis*.

Η δοκιμή της οξειδάσης πραγματοποιείται για να διαπιστωθεί αν ένας μικροοργανισμός παράγει το ένζυμο οξειδάση. Η τεχνική μπορεί να γίνει με διάφορες μεθόδους. Σε κάθε περίπτωση όμως αποικίες από τα πετρί έρχονται σε επαφή με το κατάλληλο αντιδραστήριο της οξειδάσης. Μικροοργανισμοί που είναι θετικοί στην οξειδάση αλλάζουν το χρώμα του αντιδραστηρίου σε 5 με 10 δευτερόλεπτα. Οι μικροοργανισμοί που είναι καθυστερημένου τύπου θετικοί στην οξειδάση, αλλάζουν το χρωματισμό του αντιδραστηρίου σε 60 με 90 δευτερόλεπτα. Αντίθετα οι μικροοργανισμοί που είναι αρνητικοί στην οξειδάση δεν προκαλούν αλλαγή του χρωματισμού του αντιδραστηρίου (NHSa, 2015). Τα περισσότερα είδη του βακτηρίου εμφανίζουν θετική δοκιμή οξειδάσης με εξαίρεση το *B. onis*, το *B. neotomae*, *B. inopinata*, *B. rapionis*.

Η δοκιμή της καταλάσης πραγματοποιείται για να διαπιστωθεί η παρουσία του ενζύμου της καταλάσης, μέσω της διάσπασης του υπεροξειδίου του υδρογόνου, προς παραγωγή οξυγόνου και νερού. Η δοκιμή μπορεί να γίνει με τη χρήση σωλήνα ή άγαρ. Και στις δύο περιπτώσεις ο υπό έλεγχο μικροοργανισμός έρχεται σε επαφή με το υπεροξείδιο του υδρογόνου. Σε θετική αντίδραση παρατηρείται παραγωγή φυσαλίδων, ενώ σε αρνητική δεν παρατηρείται παραγωγή φυσαλίδων. Κάθε φορά που εκτελείται η δοκιμή πρέπει να χρησιμοποιούνται θετικοί και αρνητικοί μάρτυρες, πέραν του υπό εξέταση μικροοργανισμού (NHSb, 2015). Όλα τα είδη του βακτηρίου είναι θετικά στην δοκιμή της καταλάσης.

Η χρήση φάγων ειδικών έναντι της *Brucella* αποτελεί μία από τις μεθόδους ταυτοποίησης του είδους και του βιοτύπου. Είναι όμως πολύποκλη και εφαρμόζεται σε εξειδικευμένα εργαστήρια.

Κάποια στελέχη των ειδών της *Brucella abortus* και της *B. pinnipedialis*, αναπτύσσονται σε μικρό ποσοστό και σε παρουσία CO₂. Για αυτό το λόγο κάθε φορά που γίνεται επώαση βακτηρίων σε δισκία πετρί, κάποια από τα δισκία τοποθετούνται σε αναερόβιες συνθήκες.

Ο έλεγχος της παραγωγής του υδροθείου γίνεται με την χρήση του Triple Sugar Iron (TSI). Πρόκειται για άγαρ μέσα σε σωλήνα που περιέχει λακτόζη, σουκρόζη και γλυκόζη. Το άγαρ τοποθετείται κατά τέτοιο τρόπο στο σωλήνα, ώστε να υπάρχει υλικό τόσο στο βυθό όσο και στα πλάγια του σωλήνα. Καθαρές αποικίες από τα τρυβλία πετρί, μεταφέρονται στο σωλήνα και ενοφθαλμίζονται τόσο στο βυθό όσο και στα πλάγια του σωλήνα. Έπειτα γίνεται επώαση του σωλήνα στους 37°C, για 24 ώρες, και ανάγνωση του αποτελέσματος. Υπάρχουν αρκετά διαφορετικά αποτελέσματα. Έτσι, όταν ο σωλήνας είναι όλος κόκκινος, κανένα σάκχαρο δεν έχει ζυμωθεί. Όταν το πλάγιο του σωλήνα παραμένει κόκκινο, και ο βυθός κίτρινος, έχει ζυμωθεί μόνο η γλυκόζη. Όταν όλος ο σωλήνας είναι κίτρινος, τότε όλα τα σάκχαρα έχουν ζυμωθεί. Σε οποιαδήποτε περίπτωση παρατηρείται μαύρος χρωματισμός, τότε σημαίνει ότι έχει παραχθεί υδροθείο, ενώ είναι δυνατόν να παρατηρηθεί και ανάπτυξη αερίου (FDA, 2015). Η *B. inopinata*, *B. neotomae* και κάποια στελέχη της *B. abortus* και *B. suis*, είναι θετικές στην παραγωγή υδροθείου.

Η δοκιμή ανάπτυξης σε χρωστικές είναι σχετικά δύσκολη και χρονοβόρα. Χρησιμοποιούνται σωληνοειδούς σχήματος άγαρ (Heart Infusion Agar) και χρωστική, (που περιέχουν είτε φουξίνη είτε θειονίνη) σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. Αυτά τοποθετούνται μαζί σε σκεύος, και μέσω του βρασμού, ρευστοποιούνται για να σχηματίσουν ένα ενιαίο μείγμα, το οποίο τοποθετείται σε ειδικές πλάκες προκειμένου να στερεοποιηθεί. Πρόσφατες αποικίες (18-24 ωρών) τοποθετούνται σε στείρο φυσιολογικό ορό. Έπειτα μεταφέρονται, με βαμβακοφόρο στυλεό στις πλάκες που έχουν στερεοποιηθεί. Γίνεται επώαση αυτών σε θερμοκρασία 37°C, και εξετάζονται καθημερινά για τέσσερις ημέρες για πιθανή ανάπτυξη του βακτηρίου (Hardy Diagnostics, 2006). Η θετικότητα ή όχι στην δοκιμή αυτή εξαρτάται κατά κύριο λόγο από τις συγκεντρώσεις των χρωστικών που χρησιμοποιούνται.

Η δοκιμή Voges-Proskauer πραγματοποιείται, για να διαπιστωθεί η ικανότητα του, υπό εξέταση, μικροοργανισμού να μετατρέψει το πυροσταφυλικό οξύ σε ακετοίνη. Σε κατάλληλο σωλήνα που περιέχει ζυμό Voges-Proskauer (MR-VP), γίνεται ενοφθάλμιση αποικιών από τα πετρί. Μετά την επώαση σε θερμοκρασία 37°C, για 24

ώρες, γίνεται προσθήκη άλφα-ναφθόλης και υδροξειδίου του καλίου. Μετά από την πάροδο 15 λεπτών γίνεται η ανάγνωση του αποτελέσματος. Σε θετικό αποτέλεσμα, παρατηρείται ανάπτυξη κόκκινου χρωματισμού του σωλήνα, κοντά στην επιφάνεια του ζωμού, ενώ σε αρνητικό το χρώμα του σωλήνα παραμένει κίτρινο (Hemraj, et al., 2013). Τα περισσότερα είδη της *Brucella* spp είναι αρνητικά στην δοκιμή αυτή, με εξαίρεση τα είδη *B. microti*, *B. inopinata*, *B. papionis*.

Η δοκιμή της ινδόλης πραγματοποιείται για να διαπιστωθεί αν ένας μικροοργανισμός παράγει ινδόλη από την αποδόμηση του αμινοξέως της τρυπτοφάνης. Γίνεται ενοφθάλμιση των υπό εξέταση μικροοργανισμών σε ζωμό πεπτόνης (ή τρυπτοφάνης) και επωάζονται για 24-48 ώρες στους 37°C. Έπειτα γίνεται προσθήκη 0,5ml αντιδραστηρίου Kovac's και γίνεται ανάγνωση του αποτελέσματος μετά από ένα λεπτό. Σε θετικές περιπτώσεις, εμφανίζεται ένας ροζ ή κόκκινος δακτύλιος, ενώ στις αρνητικές το χρώμα παραμένει κίτρινο (NHSc, 2014). Όλα τα είδη του βακτηρίου είναι αρνητικά στην δοκιμή αυτή.

Η δοκιμή των κιτρικών πραγματοποιείται για να διαπιστωθεί αν ο υπό εξέταση μικροοργανισμός μπορεί να αξιοποιήσει τα κιτρικά σαν πηγή άνθρακα και ενέργειας. Γίνεται ενοφθάλμιση καθαρής αποικίας σε υπόστρωμα Koser's citrate medium (ή Simmons citrate agar) και ακολουθεί επώαση τους 37°C για 18-48 ώρες. Ακολουθεί η ανάγνωση των αποτελεσμάτων. Στα θετικά αποτελέσματα το υπόστρωμα έχει αποκτήσει χρώμα μπλε, ενώ στα αρνητικά το χρώμα του υποστρώματος παραμένει πράσινο (MacWilliams, 2009). Όλα τα είδη του βακτηρίου είναι αρνητικά στην δοκιμή αυτή.

Η δοκιμή του κόκκινου το μεθυλίου (methyl red) πραγματοποιείται σε συνδυασμό με τις δοκιμές Voges-Proskauer, ινδόλης και κιτρικών, έχοντας την ονομασία IMViC. Σε αυτήν την δοκιμή γίνεται ενοφθάλμιση καθαρής αποικίας του μικροοργανισμού σε υγρό υπόστρωμα MR-VP και επωάζονται στους 37°C για 48 ώρες. Μετά την επώαση προστίθενται στο ζωμό 5 σταγόνες διαλύματος κόκκινου του μεθυλίου και γίνεται ανάγνωση των αποτελεσμάτων. Σε θετικές περιπτώσεις έχουμε μετατροπή του χρώματος του υποστρώματος σε κόκκινο, ενώ σε αρνητικές το χρώμα παραμένει κίτρινο (McDevitt, 2009). Όλα τα είδη του βακτηρίου είναι αρνητικά στην δοκιμή αυτή.

Η δοκιμή της κινητικότητας πραγματοποιείται για να διαπιστωθεί, αν ο υπό εξέταση μικροοργανισμός είναι κινητός. Γίνεται ενοφθάλμιση αποικιών του μικροοργανισμού, κάθετα στο υπόστρωμα motility agar και μετά επώαση στους 37°C για 18 ώρες. Σε θετικές περιπτώσεις αλλάζει ο χρωματισμός του υποστρώματος σε κόκκινο, ενώ σε αρνητικές εμφανίζεται μία κόκκινη γραμμή κατά μήκος του σημείου

που έγινε η ενοφθάλμιση (Shields, et al., 2011). Όλα τα είδη του βακτηρίου είναι αρνητικά στην δοκιμή αυτή.

Η δοκιμή των νιτρικών πραγματοποιείται για να διαπιστωθεί αν ο υπό εξέταση μικροοργανισμός μπορεί να αναγάγει τα νιτρικά άλατα σε νιτρώδη. Γίνεται ενοφθάλμιση αποικιών σε υποστρώματα νιτρικών και επωάζονται στους 37°C για 12 με 24 ώρες. Μετά την επώαση γίνεται, με την σειρά, προσθήκη θειανιλικού οξέος και αναφθουλαμίνης. Σε θετικές περιπτώσεις θα παρατηρηθεί μεταβολή του χρωματισμού του υποστρώματος σε κόκκινο, ενώ σε αρνητικές το χρώμα παραμένει κιτρινωπό (Buxton, 2011). Τα περισσότερα είδη του μικροοργανισμού είναι αρνητικά στη δοκιμή αυτή με εξαίρεση τα είδη *B. ovis*, *B. canis*, *B. pinnipedialis*, *B. ceti*, *B. microti*, *B. inopinata*.

Η δοκιμή της β-γαλακτοσιδάσης (ONPG test), πραγματοποιείται για να διαπιστωθεί, αν ο υπό εξέταση μικροοργανισμός μπορεί να ζυμώσει τη λακτόζη. Γίνεται ενοφθάλμιση αποικίας σε σωλήνες με υπόστρωμα (ONPG broth). Γίνεται επώαση στους 35°C για 1-4 ώρες. Σε θετικές περιπτώσεις παρατηρείται αλλαγή του χρωματισμού του υποστρώματος σε κίτρινο, ενώ σε αρνητικές περιπτώσεις ο χρωματισμός του υποστρώματος δεν μεταβάλλεται (Hardy Diagnosticsb, 2006). Όλα τα είδη του βακτηρίου είναι αρνητικά στην δοκιμή αυτή. Τα χαρακτηριστικά των βιοχημικών αντιδράσεων για τα είδη του γένους *Brucella* φαίνονται στον **πίνακα 6**.

3.1.4 Μοριακές μέθοδοι

Η ανίχνευση του μικροοργανισμού σε παθολογικό υλικό μπορεί να γίνει και με μοριακές μεθόδους. Η πιο γνωστή είναι η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) (Bricker, 2002). Για την διαφοροποίηση των ειδών του γένους *Brucella*, καθώς και των βιοτύπων αυτών, χρησιμοποιούνται, εκτός της PCR, η restriction fragment length polymorphism-RFLP, η Southern blot, και η ηλεκτροφόρηση πηκτής παλμικού πεδίου (pulse-field gel electrophoresis). Η τελευταία χρησιμοποιείται και για την διαφοροποίηση μεταξύ φυσικής μόλυνσης και εμβολιακών στελεχών (Bricker, et al., 1994).

3.2 Έμμεση διάγνωση

Η έμμεση διάγνωση περιλαμβάνει τις ορολογικές δοκιμές, τόσο στο αίμα όσο και στο γάλα. Εξαιτίας της χρήσης συγκεκριμένων αντιγόνων μπορεί να υπάρξει διασταυρούμενη αντίδραση με άλλα βακτήρια, όπως η *Yersinia enterocolitica* O:9, δίνοντας έτσι ένα ψευδώς θετικό αποτέλεσμα για την βρουκέλλωση. Όπως έχει αναφερθεί, τα αντισώματα που παράγονται, χρονικά, κατά την μόλυνση από τα είδη του γένους *Brucella* είναι αρχικά τα IgM, έπειτα τα IgG1, και τέλος τα IgG2 και IgA.

Επειδή, οι δοκιμές που ανιχνεύουν μόνο IgM αντισώματα μπορεί να εμφανίσουν διασταυρούμενες αντιδράσεις, και τα αντισώματα IgG2 και IgA αργούν να εμφανιστούν στον οργανισμό, οι πιο χρήσιμες δοκιμές, για τη διάγνωση της βρουκέλλωσης είναι εκείνες που ανιχνεύουν κυρίως τα αντισώματα IgG1 (Nielsen, 2002).

3.2.1 Δοκιμή του Ερυθρού της Βεγγάλης (Rose Bengal Test)

Η δοκιμή αυτή αναπτύχθηκε το 1957 (Rose, et al., 1957). Ως αντιγόνο χρησιμοποιούνται νεκρά κύτταρα *B. Abortus*, βιότυπος 1, στελέχη S99 ή S1119-3, χρωματισμένα με τη χρώση Rose Bengal, τα οποία βρίσκονται σε ρυθμιστικό διάλυμα με pH 3.65 ± 0.05 (Morgan, et al., 1969). Το χαμηλό pH εμποδίζει μερικώς την συγκόλληση με αντισώματα IgM και ευνοεί την συγκόλληση με αντισώματα IgG1, μειώνοντας έτσι τις διασταυρούμενες αντιδράσεις (Corbel, 1972). Όταν χρησιμοποιείται, το αντιγόνο αυτό πρέπει να δίνει μία καθαρά θετικά αντίδραση του διεθνούς ορού αναφοράς (OIEISS) στην αραιώση 1/45 αλλά όχι στην αραιώση 1/55. Κατά την εφαρμογή της όλα τα υλικά (δείγματα και αντιδραστήρια) πρέπει να έχουν θερμοκρασία δωματίου. Τοποθετούνται 30μl ορού σε ειδικές πλάκες πολυστερενίου. Σε ενδημικές περιοχές, όπως η Ελλάδα, μπορεί να χρησιμοποιηθεί η τροποποιημένη Rose Bengal Test, όπου τοποθετούνται 75μl ορού του υπό ελέγχου ζώου. Έπειτα τοποθετούνται κοντά στον ορό 30μl του αντιγόνου, και γίνεται ανάμειξη του αντιγόνου με τον ορό του ζώου. Μετά την πάροδο 4 λεπτών γίνεται η ανάγνωση του αποτελέσματος. Στα θετικά αποτελέσματα θα εμφανιστεί κροκίδωση στην πλάκα, ενώ στα αρνητικά το μείγμα αντιγόνου-ορού θα παραμείνει ενιαίο. Είναι μέθοδος χαμηλού κόστους, εύκολη και γρήγορη στην εφαρμογή της και αποτελεί την προκαταρκτική δοκιμή διαλογής των θετικών ζώων από τα αρνητικά (screening). Επίσης επειδή η δοκιμή αυτή είναι πολύ ευαίσθητη, οι θετικές αντιδράσεις θα πρέπει να εξετάζονται περαιτέρω με άλλες επιβεβαιωτικές δοκιμές.

3.2.2 Δοκιμή οροσυγκόλλησης ρυθμιστικού διαλύματος σε πλάκα (Buffered plate agglutination test)

Η δοκιμή αυτή είναι παρόμοια με την δοκιμή του ερυθρού της Βεγγάλης. Ως αντιγόνο χρησιμοποιούνται κύτταρα από *B. Abortus*, βιότυπο 1, στέλεχος S1119-3, χρωματισμένα με τις χρώσεις crystal violet και brilliant green. Το αντιγόνο χρησιμοποιείται σε pH 3.65. Είναι μέθοδος φτηνή και εύκολη στην εφαρμογή της. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν μέθοδος διαλογής των ζώων (screening) (Nielsen, 2002).

3.2.3 Δοκιμή οροσυγκόλλησης σε σωλήνα (Serum Tube Agglutination Test/Wright Test)

Η δοκιμή αυτή περιγράφηκε το 1897 και ήταν η πρώτη δοκιμή που αναπτύχθηκε για την ορολογική διάγνωση της βρουκέλλωσης στον άνθρωπο. Σε αυτήν χρησιμοποιούνται βακτηριακά κύτταρα ως αντιγόνο, τα οποία επωάζονται μαζί με τον ορό, του υπό εξέταση ασθενούς, σε έναν γυάλινο σωλήνα. Αν τα ιζήματα των κυττάρων σχηματίσουν μοτίβο μανδύα, θεωρείται ένδειξη μόλυνσης, ενώ όταν το μοτίβο έχει τη μορφή κουμπιού, η εξέταση θεωρείται αρνητική. Πραγματοποιείται σε ουδέτερο pH, ανιχνεύοντας έτσι κυρίως αντισώματα IgM και λιγότερο IgG, και για αυτό το λόγο δεν χρησιμοποιείται πλέον ευρέως (Wright, et al., 1897).

3.2.4 Αναγωγικά μέσα (Reducing Agents)

Η διθειοθρεϊτόλη και η 2-μερκαπτοαιθανόλη, είναι αναγωγικά μέσα που αποδομούν δισουλφιδικές γέφυρες. Και οι δύο αναγάγουν τα αντισώματα IgM σε μονομερή, μειώνοντας την ικανότητά τους να προκαλούν συγκόλληση. Τα αναγωγικά μέσα προστίθενται στο αραιωτικό του ορού, και ακολουθεί επώαση στους 37°C για 18 ώρες τουλάχιστον. Μπορεί να υπάρξουν ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα διότι και τα αντισώματα IgG περιέχουν δισουλφιδικές γέφυρες, και έτσι να αναχθούν από τα αναγωγικά μέσα όπως τα αντισώματα IgM. Τα αναγωγικά μέσα χρησιμοποιούνται κυρίως ως επιβεβαιωτικές δοκιμές (Nicoletti, 1969).

3.2.5 Δοκιμή του δακτυλίου στο γάλα (Milk Ring Test)

Η δοκιμή αυτή είναι μία τροποποίηση των δοκιμών οροσυγκόλλησης, και γίνεται στο γάλα βοοειδών. Τα αντιγόνα που χρησιμοποιούνται είναι νεκρά κύτταρα *B. abortus*, στελέχη S99 ή S1119-3 και χρωματίζονται με αιματοξυλίνη, σε ρυθμιστικό διάλυμα με pH 3,1. Στο υπό εξέταση γάλα, γίνεται προσθήκη του αντιγόνου και ακολουθεί επώαση. Εάν υπάρχουν αντισώματα στο γάλα, αυτά θα συνδεθούν σε μικρό ποσοστό με κάποια μόρια λίπους του γάλατος. Έπειτα τα αντιγόνα, που προστίθενται, θα συγκολληθούν με τα αντισώματα που έχουν συνδεθεί με το λίπος, και καθώς τα μόρια λίπους ανεβαίνουν ψηλά στο γάλα, ένας σκούρος μπλε (ή μωβ) δακτύλιος θα εμφανιστεί πάνω από τη λευκή στιβάδα του γάλατος. Αν δεν υπάρχουν αντισώματα δεν θα υπάρξει αλλαγή χρωματισμού. Η δοκιμή αυτή μπορεί να επηρεαστεί από παράγοντες του γάλατος, όπως η μαστίτιδα, το πρωτόγαλα και το γάλα στο τέλος της γαλακτοφορίας. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δοκιμή διαλογής για τη βρουκέλλωση των βοοειδών (screening) (OIEb, 2016).

3.2.6 Δοκιμές καθίζησης (Precipitin Tests)

Οι δοκιμές agar gel immunodiffusion (AGID) και single radial immunodiffusion (SRD), ήταν οι πρώτες δοκιμές που μπόρεσαν να διαχωρίσουν εμβολιακά στελέχη από φυσική μόλυνση (Diaz, et al., 1979). Αντιγόνο από *B. melitensis*, που περιέχει τον πολυσακχαρίτη Β, προστίθενται μαζί με τον υπό εξέταση ορό στο άγαρ των δοκιμών. Εάν υπάρχουν αντισώματα στον ορό, ένας δακτύλιος θα παρατηρηθεί σε λίγες ώρες. Εξαιτίας της χαμηλής ευαισθησίας τους, δεν χρησιμοποιούνται πλέον για διαγνωστικούς σκοπούς (Jones, et al., 1980). Τροποποίηση της δομικής αποτελεί η χρήση της ριβανόλης (rivanol precipitation), η οποία, προστίθεται στον ορό, προκαλώντας τη καθίζηση των γλυκοπρωτεϊνών με μεγάλο μοριακό βάρος. Το ίζημα αφαιρείται με φυγοκέντρηση, και έπειτα πραγματοποιείται μία δοκιμή γρήγορης οροσυγκόλλησης, χρησιμοποιώντας αραιωμένο ορό. Εφαρμόζεται κυρίως ως επιβεβαιωτική δοκιμή (Huber, et al., 1986).

3.2.7 Δοκιμή σύνδεσης του συμπληρώματος (Complement Fixation Test)

Η δοκιμή αυτή βασίζεται στην ενεργοποίηση του συμπληρώματος από τα αντισώματα. Το συμπλήρωμα αποτελείται από σειρά πρωτεϊνικών παραγόντων, και η κύρια ιδιότητα του είναι να συνδέεται με σύμπλοκα αντιγόνου-αντισώματος. Το αντιγόνο που χρησιμοποιείται, είναι εναιώρημα *B. abortus*, στελέχη S99 ή S1119-3 σε ρυθμιστικό διάλυμα βαρβιτάλης. Αρχικά γίνεται ανάμειξη του υπό εξέταση ορού (που προηγουμένως έχει αδρανοποιηθεί), με το αντιγόνο και το συμπλήρωμα. Στην περίπτωση που στον ορό υπάρχουν αντισώματα, σχηματίζεται σύμπλοκο με το αντιγόνο, το οποίο δεσμεύει το συμπλήρωμα. Έπειτα γίνεται προσθήκη του αιμολυτικού συστήματος, το οποίο αποτελείται από ερυθρά αιμοσφαίρια προβάτου και αντισώματα κονίκλου έναντι των ερυθρών του προβάτου (αιμολυσίνη). Στα θετικά αποτελέσματα το συμπλήρωμα δεν είναι διαθέσιμο, δεν προκαλείται λύση των ερυθρών αιμοσφαιρίων, τα οποία παραμένουν στον πυθμένα του βοθρίου που γίνεται η δοκιμή (μορφή κομβίου). Στα αρνητικά αποτελέσματα, το συμπλήρωμα δεν έχει δεσμευτεί, και προκαλεί έτσι λύση των ερυθρών αιμοσφαιρίων, προκαλώντας έτσι το κόκκινο χρωματιστό του διαλύματος που βρίσκεται στα βοθρία (Στουρνάρα, 2008). Η δοκιμή αυτή είναι πολύπλοκη, και γίνεται μόνο από εξειδικευμένο προσωπικό. Δεν μπορεί να διαχωρίσει εμβολιακά στελέχη από τη φυσική μόλυνση. Παρά τις δυσκολίες της, έχει καθιερωθεί ως η μέθοδος εκλογής για την επιβεβαίωση της μόλυνσης στα ζώα.

3.2.8 Έμμεση ανοσοενζυμική δοκιμή (Indirect ELISA, iELISA)

Η έμμεση ανοσοενζυμική δοκιμή αναπτύχθηκε πρώτη φορά για τη διάγνωση της βρουκέλλωσης στον άνθρωπο (Carlsson, et al., 1976). Έπειτα περιγράφηκαν παραλλαγές της μεθόδου αυτής (Nielsen, et al., 1994). Συνήθως το αντιγόνο που χρησιμοποιείται είναι ο λείος λιποπολυσακχαρίτης (S-LPS) της *B. abortus*, που έχει προσκολληθεί στο τοίχωμα του βοθρίου πλακών από πολυστυρένιο. Έπειτα προστίθεται αραιωμένος ορός αίματος ή γάλατος. Όταν υπάρχουν αντισώματα στον εξεταζόμενο ορό, αυτά συνδέονται με το αντιγόνο που υπάρχει στις πλάκες και δημιουργεί ένα σύμπλοκο. Έπειτα γίνεται προσθήκη αντί-αντισώματος που έχει σημανθεί με ένζυμο (conjugate). Αυτό θα δημιουργήσει ένα καινούριο σύμπλοκο, αφού συνδεθεί με το σύμπλοκο αντιγόνου-αντισώματος. Το καινούριο αυτό σύμπλοκο λειτουργεί ως δείκτης, και όταν προστεθεί το υπόστρωμα του χρωμογόνου, θα δώσει ιδιαίτερο χρωματισμό. Το αντίθετο ακριβώς συμβαίνει σε περίπτωση που ο υπό εξέταση ορός δεν περιέχει αντισώματα (Nielsen, et al., 2010).

Η μέθοδος αυτή είναι κατάλληλη για ορούς από ζώα που έχουν μολυνθεί με *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, αφού όλα τα είδη αυτά είναι λείου τύπου, τον οποίο αναγνωρίζει ο S-LPS. Επίσης και αδρού τύπου είδη μπορούν να ανιχνευτούν με τη μέθοδο αυτή, αρκεί στα βοθρία να υπάρχουν αντιγόνα R-LPS. Μειονεκτήματα της δοκιμής αυτής είναι το κόστος της, και το γεγονός ότι δεν μπορεί να διαχωρίσει τα εμβολιακά στελέχη από τη φυσική μόλυνση (Nielsen, et al., 2010).

3.2.9 Ανταγωνιστική ανοσοενζυμική δοκιμή (Competitive ELISA, cELISA)

Η δοκιμή αυτή αναπτύχθηκε για να μπορεί να γίνει διαχωρισμός των εμβολιακών αντισωμάτων από τα αντίστοιχα των φυσικών μολύνσεων. Η αρχή για αυτή τη δοκιμή, στηρίχθηκε στο ότι τα βοοειδή μετά από τον εμβολιασμό παράγουν εκλεκτικά, αντισώματα έναντι συγκεκριμένων επιτόπων του βακτηρίου, ενώ οι υπόλοιποι επίτοποι δεν επηρεάζουν την παραγωγή των αντισωμάτων. Έτσι ένα μονοκλωνικό αντίσωμα, έπρεπε να επιλεγεί για να ανταγωνιστεί τα εμβολιακά αντισώματα, τα οποία είναι λιγότερο ειδικά από αυτά που παράγονται μετά από μία φυσική μόλυνση.

Συνήθως χρησιμοποιείται ως αντιγόνο ο S-LPS από *B. abortus*, προσκολλημένο στο τοίχωμα βοθρίων από πλάκες πολυστυρενίου, ακολουθούμενο από επώαση και τοποθέτηση του ανταγωνιστικού αντισώματος. Έπειτα προστίθεται το σεσημασμένο με ένζυμο αντί-αντίσωμα (conjugate), το οποίο λειτουργεί ως δείκτης. Ακολουθεί η προσθήκη του χρωμογόνου, για τη διαπίστωση της σύνδεσης των μονοκλωνικών

αντισωμάτων με το αντιγόνο στα βοθρία. Αντίθετα από ότι συμβαίνει στην i-ELISA, η παρουσία χρώματος υποδηλώνει απουσία αντισωμάτων στον υπό εξέταση ορό.

3.2.10 Δοκιμή πόλωσης του φθορίζοντος φωτός (Fluorescence Polarization Assay, FPA)

Η δοκιμή αυτή αναπτύχθηκε για να υπάρχει μία δοκιμή διάγνωσης, που να μπορεί να πραγματοποιηθεί εκτός του εργαστηρίου, δίνοντας μία γρήγορη και ακριβή διάγνωση (Nielsen, et al., 2001). Η αρχή για αυτή τη δοκιμή είναι ότι ένα μόριο μέσα σε διάλυμα, περιστρέφεται τυχαία σε ρυθμό αντιστρόφως ανάλογο του μεγέθους του. Έτσι ένα μικρό μόριο περιστρέφεται γρήγορα, ενώ ένα μεγάλο μόριο, περιστρέφεται με πιο αργό ρυθμό. Ο χρόνος περιστροφής των μορίων μετράται με ειδικό όργανο που λαμβάνει οριζόντιες και κάθετες μετρήσεις κίνησης (Nielsen, et al., 2000). Με την προσθήκη ενός φθορίζοντος μορίου, που συνδέεται σε ένα μικρού μοριακού βάρους μόριο αντιγόνου, θα σχηματιστεί σύμπλοκο, ο χρόνος της περιστροφής του οποίου μπορεί να μετρηθεί με τη χρήση πολωμένου φωτός από τον αναλυτή.

Για τη διάγνωση της βρουκέλλωσης, ένας αναλυτής χρησιμοποιείται για να ληφθούν μετρήσεις πόλωσης του υπό εξέταση ορού, ο οποίος έχει αραιωθεί. Έπειτα προστίθεται αντιγόνο που αποτελείται από τμήμα του Ο-πολυσακχαρίτη, από τον λιποπολυσακχαρίτη της *B. abortus*, στέλεχος S1119-3, μεγέθους συνήθως 22 kDa, σεσημασμένο με ισοθειονική φλουορεσεΐνη. Αν αντισώματα κατά του Ο-πολυσακχαρίτη υπάρχουν στον υπό εξέταση αραιωμένο ορό (στον οποίο έχει προστεθεί το αντιγόνο), ο ρυθμός περιστροφής του σεσημασμένου αντιγόνου, θα μειωθεί. Ο ρυθμός μείωσης μάλιστα, είναι ανάλογος με το ποσοστό του αντιγόνου που υπάρχει. Μετά από κατάλληλη επώαση, γίνονται ξανά μετρήσεις από τον αναλυτή, και βρίσκεται η ταχύτητα του φωτός εκφρασμένη σε μονάδες που καλούνται milipolarization units. Η δοκιμή αυτή είναι εύκολη, απλή και μπορεί να πραγματοποιηθεί σχεδόν παντού, με έναν φορητό αναλυτή και υπολογιστή, σε δείγματα αίματος αλλά και γάλατος.

3.2.11 Άλλες δοκιμές, λιγότερο διαδεδομένες

Έχουν αναπτυχθεί αρκετές δοκιμές ραδιοανοσοπροσδιορισμού (Radioimmunoassays) για τη διάγνωση της βρουκέλλωσης, επειδή όμως δημιουργούν κατάλοιπα ραδιοϊσοτόπων, δεν χρησιμοποιούνται (Nielsen, 2002).

Η δοκιμή της αντισφαιρίνης (Anti-globulin Test/Coombs Test), πραγματοποιείται για την επιβεβαίωση των αρνητικών, ύποπτων αποτελεσμάτων της δοκιμής οροσυγκόλλησης σε σωλήνα. Δεν μπορεί να διαχωρίσει εμβολιακά στελέχη από

φυσική μόλυνση, και χρησιμοποιείται από τα κλινικά εργαστήρια για την διάγνωση του νοσήματος στον άνθρωπο (Farina, 1980).

Η ενδοδερμική δοκιμή (Skin Test) χρησιμοποιεί ένα πρωτεϊνικό αντιγόνο της *Brucella*, την βρουκελλίνη. Γίνεται έγχυση βρουκελλίνης στα πλευρά ή ενδοβλεφαρικά, και έπειτα γίνεται αξιολόγηση της διόγκωσης του δέρματος (Godfroid, et al., 2010).

Η δοκιμή πλευρικής ροής (Lateral Flow Assay, FLA) είναι μία απλοποιημένη ELISA, και χρησιμοποιείται για την ποσοτική ανίχνευση ειδικών αντισωμάτων στον ορό του αίματος ή του γάλατος. (Christopher, et al., 2010).

3.2.12 Σύγκριση μεθόδων

Το 2001, οι Vanzini, et al., σύγκριναν τις μεθόδους iELISA και MRT εξετάζοντας γάλα δεξαμενής από 96 εκτροφές, έχοντας ως μέθοδο αναφοράς την CFT. Η iELISA συμφωνούσε με την μέθοδο αναφοράς σε ποσοστό 98,1% και η MRT σε ποσοστό 72,2%, αποδεικνύοντας έτσι ότι η iELISA είναι πιο αξιόπιστη μέθοδος για την εξέταση δειγμάτων γάλατος δεξαμενής.

Το 2004, οι Giovannini, et al., σύγκριναν την αξιοπιστία των ορολογικών μεθόδων ανάμεσα στο γάλα (iELISA, MRT) και το αίμα (RBT, CFT), μέσω ενός πολύπλοκου μοντέλου προσομοίωσης (Monte Carlo). Τα αποτελέσματα τους έδειξαν ότι η χρήση των μεθόδων για την εξέταση του γάλατος, μπορεί να είναι πιο αξιόπιστη από ότι η χρήση των μεθόδων για την εξέταση του αίματος, προκειμένου να χαρακτηριστεί μία εκτροφή ως μολυσμένη. Ειδικότερα, η χρήση της iELISA φάνηκε να είναι πιο αξιόπιστη από ότι η MRT, ενώ η τελευταία από μόνη της φαίνεται να είναι λιγότερο αξιόπιστη από τον συνδυασμό των δοκιμών εξέτασης του αίματος.

Το 2011, οι Mariri et. al. Εξέτασαν 2.580 δείγματα αίματος με τις μεθόδους RBT, CFT, iELISA, SAT και 2.375 δείγματα γάλατος με τις μεθόδους MRT και καλλιέργειας. Όλες οι δοκιμές στο αίμα εμφάνισαν θετικότητα άνω των 60%, ενώ η MRT εμφάνισε θετικότητα στο 38% αποδεικνύοντας, όπως προηγουμένως ότι μόνη της η μέθοδος αυτή στο γάλα, δεν είναι τόσο αξιόπιστη όσο ο συνδυασμός μεθόδων στο αίμα.

Το 2012 οι Mohan, et al., εξέτασαν 246 δείγματα γάλατος βοοειδών χρησιμοποιώντας τις δύο μεθόδους, iELISA και MRT. Βρήκαν θετικά ζώα σε ποσοστό 23,98% και 28,05% αντίστοιχα, δείχνοντας έτσι ότι η MRT είναι πιο κατάλληλη για την ανίχνευση θετικών ζώων σε μία εκτροφή.

Το 2014 οι Salman, et al., εξέτασαν 636 δείγματα γάλατος και 217 δείγματα αίματος, συγκρίνοντας το συνδυασμό των μεθόδων MRT και iELISA στο γάλα σε σχέση με τον συνδυασμό RBT και iELISA στο αίμα. Το ποσοστό συμφωνίας των

αποτελεσμάτων μεταξύ των μεθόδων στο γάλα ήταν 83%, ενώ το αντίστοιχο στις μεθόδους αίματος ήταν 86%, κάνοντας έτσι την χρήση του συνδυασμού μεθόδων στο αίμα σχετικά πιο αξιόπιστη σε σχέση με αυτή του γάλατος. Συγκρίνοντας όμως μόνες τους τις iELISA στα δύο είδη δειγμάτων, βρήκαν ότι η ευαισθησία και η ειδικότητα της iELISA στο γάλα ήταν 92,8% και 98,8%, καθιστώντας την, ατομικά, την πιο αξιόπιστη σε σχέση με τις άλλες τρεις μεθόδους.

Το 2001, οι Nielsen, et al., εξέτασαν 4060 δείγματα γάλατος (1086 θετικά στην MRT και 2974 με άγνωστο καθεστώς βρουκέλλωσης) χρησιμοποιώντας τις μεθόδους iELISA και FPA. Με βάση τα αποτελέσματα η σχετική ευαισθησία της FPA ήταν χαμηλότερη (82,2%) από ότι της iELISA (98,5%), καθιστώντας την FPA λιγότερο αξιόπιστη σε σχέση με την iELISA. Επιπλέον, όμως η FPA είναι πιο φτηνή, προσφέρει φορητότητα και μπορεί να διαχωρίσει τα εμβολιακά στελέχη από τη φυσική μόλυνση.

Το 1995, οι Romero et. al., εξέτασαν 93 δείγματα γάλατος (56 θετικά σε καλλιέργεια και 37 αρνητικά), χρησιμοποιώντας τις μεθόδους PCR και iELISA. Η ειδικότητα και των δύο δοκιμών, που αφορούσαν τα αρνητικά δείγματα, ήταν 100%. Η ευαισθησία από την άλλη πλευρά, για τα θετικά δείγματα, ήταν 87,5% (49 δείγματα) για την PCR και 98,2% (55) για την iELISA. Παράλληλα, ένα δείγμα θετικό στην PCR βρέθηκε αρνητικό στην iELISA, ενώ 7 δείγματα θετικά στην iELISA βρέθηκαν αρνητικά στην PCR. Έδειξαν έτσι ότι η iELISA είναι πιο αξιόπιστη μέθοδος για την παρακολούθηση της νόσου (screening).

Το 2014, οι Wareth et. al., εξέτασαν 215 δείγματα γάλατος από βοοειδή και βίσωνες από θεωρητικώς υγιή ζώα. Χρησιμοποίησαν τις μεθόδους iELISA και PCR για την ανίχνευση αντισωμάτων έναντι της *Brucella* spp και γενετικού υλικού του βακτηρίου αντίστοιχα. Έτσι, με την πρώτη μέθοδο βρήκαν θετικά 34 δείγματα (16%) και με την δεύτερη 17 δείγματα (7,9%). Οι ερευνητές αποδίδουν το ότι η PCR δεν μπόρεσε να εντοπίσει τόσο πολλά δείγματα, σε σχέση με την iELISA, στο γεγονός ότι οι τίτλοι αντισωμάτων παραμένουν υψηλοί για μεγάλο χρονικό διάστημα μετά την λοίμωξη, ανεξάρτητα από τα κυκλοφορούντα στο αίμα βακτήρια ή βακτηριακό DNA. Επισημαίνουν παρόλα αυτά ότι κάποια ψευδώς-θετικά αποτελέσματα της iELISA μπορεί να οφείλονται σε διασταυρούμενες αντιδράσεις από άλλα βακτήρια (π.χ. *Yersinia enterocolitica* O:9).

Το 2017, οι Rajala et. al., εξέτασαν 564 δείγματα γάλατος βοοειδών, αγνώστου υγειονομικού καθεστώτος, με τις μεθόδους iELISA και PCR. Από αυτά, οροθετικά βρέθηκαν τα 12 δείγματα (2,12%). Παράλληλα βακτηριακό DNA ανιχνεύτηκε σε 58 δείγματα (10,3%). Ειδικότερα, όλα τα οροθετικά δείγματα, βρέθηκαν θετικά στην ανίχνευση γενετικού υλικού. Όμως, από τα οροαρνητικά δείγματα (552), τα 46 από αυτά

βρέθηκαν θετικά στην ανίχνευση γενετικού υλικού, καθιστώντας την μοριακή δοκιμή πιο αξιόπιστη από την ορολογική.

Το 2012, οι Abdalla et al., εξέτασαν 294 δείγματα (147 δείγματα γάλατος, 147 δείγματα αίματος) 147 βοοειδών από εκτροφές με ιστορικό βρουκέλλωσης. Χρησιμοποίησαν αρκετές δοκιμές για να εξετάσουν τα δείγματα (RBT, τροποποιημένη Ziehl-Neelsen, καλλιέργεια, PCR, MRT). Όλες οι τεχνικές χρησιμοποιήθηκαν για την εξέταση του γάλατος, με εξαίρεση την RBT. Η τελευταία ανίχνευσε 29 θετικά ζώα (19,7%). Από τις υπόλοιπες μεθόδους, η MRT ανίχνευσε 54 θετικά ζώα (36,7%), η τροποποιημένη ZN 20 θετικά (13,6%), η καλλιέργεια 11 θετικά (7,5%) και η PCR 33 θετικά ζώα (22,4%). Με βάση τα παραπάνω και του γεγονότος ότι οι εκτροφές είχαν ιστορικό βρουκέλλωσης, φάνηκε ότι η MRT είναι πιο αξιόπιστη μέθοδος για γρήγορη και εύκολη παρακολούθηση της νόσου (screening).

3.2.13 Συμπεράσματα

Με βάση όλα τα παραπάνω, μπορεί να καταλάβει κάποιος ότι η διάγνωση του νοσήματος είναι δύσκολη. Σαφώς οι νεότερες μέθοδοι είναι ασφαλέστερες και περισσότερο αξιόπιστες. Επίσης είναι σαφές ότι καμία μέθοδος από μόνη της δεν είναι επαρκής για την διάγνωση. Μέχρι σήμερα ο χρυσός κανόνας παραμένει η απομόνωση και τυποποίηση του μικροοργανισμού μέσω καλλιέργειας παθολογικού υλικού και βιοχημικών δοκιμών αντίστοιχα. Το κόστος των απαιτούμενων αντιδραστηρίων είναι υψηλό, ενώ ταυτόχρονα υπάρχει κίνδυνος μόλυνσης του εργαστηριακού προσωπικού. Αρκετά υποσχόμενη είναι η χρήση των μοριακών μεθόδων, οι οποίες είναι γρήγορες, ασφαλείς και αποδοτικές. Πιθανόν να αντικαταστήσουν στο μέλλον την κλασική απομόνωση, εάν γίνει κατάλληλη προτυποποίηση και αξιολόγηση τους.

Οι περισσότερες ορολογικές δοκιμές είναι πιο εύκολες και γρήγορες από την απομόνωση. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν στο ορό γάλατος αλλά και αίματος. Χρησιμοποιούνται κατά κύριο λόγο στα προγράμματα ελέγχου και εκρίζωσης και για την διάγνωση του νοσήματος στον άνθρωπο. Επιπλέον η κάθε δοκιμή από μόνη της δεν μπορεί να δώσει οριστικό αποτέλεσμα για την εφαρμογή των εν λόγω προγραμμάτων. Για να ελαττωθούν οι πιθανότητες λάθους εφαρμογής των προγραμμάτων, χρησιμοποιούνται δύο ή περισσότερες δοκιμές μαζί, με την επιλογή των μεθόδων να εξαρτάται πάντα από τους πόρους που διαθέτει ο φορέας που εφαρμόζει το πρόγραμμα. (Nielsen, 2002, Gall & Nielsen, 2004, Nielsen & Yu, 2010, Kaltungo, et al., 2014). (Abdalla, et al., 2012)

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abdalla and Hamid. 2012.** Comparison of conventional and non-conventional techniques for the diagnosis of bovine brucellosis in Sudan. *Trop Anim Health Prod.* 2012, Vol. 44, pp. 1151-1155.
- Alton, GG. 1985.** The epidemiology of *Brucella melitensis* in sheep and goats. 1985.
- Alton, GG, et al. 1988.** *Techniques for the Brucellosis Laboratory.* Paris, France : s.n., 1988.
- Anastasio, et al. 2009.** Possible brucellosis in an early hominin skeleton from Sterkfontein, South Africa. *Public Library of Science.* 2009, pp. 4:1-5.
- Anastasio, R., et al. 2011.** Origin, evolution and paleoepidemiology of brucellosis. *Epidemiol. Infect.* 2011, pp. 139. 149-156.
- Anonymous. 1986.** International Committee on Systematic Bacteriology. Subcommittee on Taxonomy of the Genus *Brucella.* *International Journal of Systematic Bacteriology.* 1986, 38, σσ. 450–452.
- Anses. 2014.** Data sheet on foodborne biological hazards/ *Brucella* spp. 2014. pp. 1-3.
- Arago, V, et al. 1996.** Characterization of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* Native Haptens as Outer Membrane O-Type Polysaccharides Independent from the Smooth Lipopolysaccharides. *Journal of Bacteriology.* 1996, Vol. 178, 4, pp. 1070-1079.
- Arellano-Reynoso, B, et al. 2005.** Cyclic β -1, 2-glycan is a *Brucella* virulence factor required for intracellular survival. *Nature Immunology.* 2005, 6, pp. 618-625.
- Baldwin, CL and Goenka, R. 2006.** Host immune responses to the intracellular bacterium *Brucella*: does the bacterium instruct the host to facilitate chronic infection? *Critical Reviews in Immunology .* 2006, 26, pp. 407-442.
- Banai, Menachem and Corbel, Michael. 2010.** Taxonomy of *Brucella.* *The Open Veterinary Journal.* 2010, 4, pp. 85-101.
- Bang, B. 1897.** Die Aetiologie des seuchenhaften (“infectiösen”) Verwerfens. *ZThiermed (Jena).* 1897, 1:241-278.
- Bargen, K, Gorvel, JP and Salcedo, SP. 2012.** Internal affairs: investigating the *Brucella* intracellular lifestyle. *FEMS Microbiology Ecology.* 2012, 36, pp. 533-562.
- Bergey, DH and Holt, JG. . 1994.** *Bergey’s Manual of Determinative Bacteriology.* Baltimore : Williams & Wilkins, 1994. Provides a brief synopsis of the genus and related genera for comparison.
- Blasco, JM. 1997.** A review on the use of *B. melitensis* REV-1 vaccine in adult sheep and goats. *Preventive Veterinary Medicine.* 31, 1997, pp. 275-283.
- Bobo, RA and Eagon, RG. 1968.** Lipids of cell walls of *Pseudomonas aeruginosa* and *Brucella abortus.* *Canadian journal of Microbiology.* 1968, 14, pp. 503-5013.

- Bricker, BJ and Halling, SM. 1994.** Differentiation of *Brucella abortus* bv. 1, 2, and 4, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis*, and *Brucella suis* bv. 1 by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 1994, Vol. 32, pp. 2660-2666.
- Bricker, BJ. 2002.** PCR as a diagnostic tool for brucellosis. *Veterinary Microbiology*. 2002, Vol. 90, pp. 435-446.
- Bricker, BJ and Halling, SM. 1994.** *Journal of Clinical Microbiology*. 1994, Vol. 32, pp. 2660-2666.
- Brothwell, D. 1965.** *The palaeopathology of the E.B-M.B. and Middle bronze age remains from Jericho (1957-1958 excavations)*. London:British School of Archaeology in Jerusalem : s.n., 1965. pp. 685-693.
- Bruce, D. 1887.** Note on the discovery of a micro-organism in Malta fever, *Practitioner* . London : s.n., 1887. 39:161– 170.
- Bundle, David, Chenvonogrodzky, John and Perry, Malcom. 1987.** The structure of the lipopolysaccharide O-chain (M antigen) and polysaccharide B produced by *Brucella melitensis* 16M. *FEBS Letters*. 1987, Vol. 216, 2, pp. 261-264.
- Bundle, DR, et al. 1989.** Definition of *Brucella* A and M epitopes by monoclonal typing reagents and synthetic oligosaccharides. *Infection and Immunity*. 1989, 57, pp. 2829-2836.
- Buxton, R. 2011.** Nitrate and Nitrite Reduction Test Protocols. *American societ for microbiology*. 2011.
- Capasso, L. 1999.** Brucellosis at Herculaneum. *International Journal of Osteoarchaeology*. 1999, 9, pp. 277-288.
- Capasso, L. 2002.** Bacteria in two-millenia-old cheese, and related epizoonoses in roman populations. *Journal of Infection*. 2002, 45, pp. 122–127.
- Cardoso, PG, et al. 2006.** *Brucella* spp noncanonical LPS: structure, biosynthesis, and interaction with host immune system. *Microb Cell Fact*. 23, 2006, Vol. 5, p. 13.
- Carlsson, H, Hurvell, B and Lindberg, A. 1976.** Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for titration of antibodies against *Brucella abortus* and *Yersinia enterocolitica*. *Acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*. 84C, 1976, pp. 168-176.
- Carmichael, L. and Kenney, R. 1968.** Canine abortion caused by *Brucella canis*. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 1968, 152, pp. 605-616.
- CDC. 2012.** Centers for Disease Control and Prevention. [Online] November 2012. goo.gl/C1Fzfucontent_copy Copy short URL.
- CFSPH. 2007.** Brucellosis. [Online] 2007. <https://goo.gl/12Vwna>.
- CFSPHa. 2009.** Bovine Brucellosis: *Brucella abortus*. [Online] 2009. <https://goo.gl/WXUp4C>.

- CFSPHb. 2009.** Porcine and Rangiferine Brucellosis: *Brucella suis*. [Online] 2009. <https://goo.gl/HpXZ8A>.
- CFSPHc. 2009.** Ovine Epididymitis:*Brucella ovis*. [Online] 2009. <https://goo.gl/IRWZX2>.
- CFSPHd. 2009.** Brucellosis in Marine Mammals. [Online] 2009. <https://goo.gl/e6ZohH>.
- Chaves, Palacios, et al. 2011.** *Brucella abortus* Ornithine Lipids Are Dispensable Outer Membrane Components Devoid of a Marked Pathogen-Associated Molecular Pattern. *PLOS ONE*. 2011, Vol. 6, 1.
- Cherwonogrodzky, J. M., et al. 1990.** Antigenes of *Brucella*. [ed.] Nielsen and Ducan. *Animal Brucellosis*. Florida, USA : CRC Press, 1990, pp. 19-64.
- Christopher, S, Umapathy, BL and Ravikuma, KL. 2010.** Brucellosis:review on the recent trends in pathogenicity and laboratory diagnosis. *Journal of Laboratory Physicians*. 2, 2010, pp. 55-60.
- Cleghorn, G. 1751.** *Observations of the epidemical diseases of Minorca (From the Years 1744–1749)*. London, England : s.n., 1751.
- Cloekaert, A, et al. 1996.** Molecular and immunological characterization of the major outer membrane proteins of *Brucella*. *FEMS Microbiology Letters*. 1996, 145, pp. 1-8.
- Corbel. 1989.** Microbiological Aspects. [book auth.] Monic Madkour. *Brucellosis*. s.l. : University Press, Cambridge, 1989, pp. 29-44.
- Corbel, M. J. and Brinley-Morgan, W. J. 1984.** Genus *Brucella*, Meyer and Shaw 1920. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore-London : Williams & Wilkins, 1984, Vol. I, pp. 377-388.
- Corbel, MJ and Brinley, M. 1975.** Proposal for Minimal Standards for Descriptions of New Species and Biotypes of the Genus *Brucella*. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 1975, Vol. 25, 1, pp. 83-89.
- Corbel, MJ. 1972.** Characterization on antibodies active in the Rose Bengal plate test for bovine brucellosis. *Veterinary Records*. 88, 1972, pp. 447-449.
- De Ley, J., et al. 1987.** Ribosomal ribonucleic acid cistron similarities and taxonomic neighborhood of *Brucella*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 1987, 37, pp. 35-42.
- DelVecchio , VG, et al. 2002.** The genome of *Brucella melitensis*. *Veterinary Microbiology*. 2002, 90, pp. 587-592.
- Department, of the Army. 1997.** *US Army Activity in the US Biological Warfare Programs, Vols 1 and 2*. Washington, DC: HQ, DA; 24 February 1977. Unclassified. 1997.
- Díaz , R, et al. 1968.** Surface antigens of smooth brucellae. *journal of Bacteriology*. 1968, 96, pp. 893-901.

- Diaz, R, et al. 1979.** Radial immunodiffusion test with Brucella polysacchride antigen for differentiating infected from vaccinated cattle. *Journal of Clinical Microbiology*. 10, 1979, pp. 37-46.
- Diaz, Ramon, et al. 1968.** Surface Antigens of Smooth Brucellae. *Journal of Bacteriology*. 1968, Vol. 96, 4, pp. 893-901.
- Diaz-Aparicio, E, et al. 1993.** Comparative analysis of Brucella serotypes A and M and Yersinia enterocolitica O:9 polysaccharides for serological diagnosis of brucellosis in cattle, sheep, and goats. *Journal of Clinical Microbiology*. 1993, 31, pp. 3136-3141.
- Dieli, F, et al. 2003.** Characterization of lung $\gamma\delta$ T cells following intranasal infection with Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guérin. *The Journal of Immunology*. 2003, Vol. 170, pp. 463-469.
- Doqanay, M., Aygen, B and Esel, D. 2001.** Brucellosis due to blood transfusion. *Journal of Hospital Infection*. 2001, Vol. 49 (2), pp. 151-2.
- Drozevkina, MS. 1963.** The present position in BRucella phage research. *Bulletin of the World Health Organisation*. 1963, 29, pp. 43-57.
- ECDC. 2014.** *Annual epidemiological report, food and water borne diseases and zoonoses*. 2014.
- Edgardo Morenoa, Axel Cloeckeaertb and Ignacio Moriyo. 2002.** Brucella evolution and taxonomy. *Veterinary Microbiology*. 2002, 90, pp. 209–227.
- EFSA/ECDC. 2014.** *The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2014*. 2014.
- Elberg, SS. 1996.** Rev-1 Brucella melitensis vaccine, Part III: 1981-1995. *Vet. Bull.* 66, 1996, pp. 1193-1200.
- Ertern, M, et al. 2000.** Brucellosis transmtted by bone marrow transplantaion. *Bone Marrow Transplantation*. 2000, Vol. 262 (2), pp. 225-6.
- Etxeberria, F. 1994.** Vertebral epiphysitis: early signs of brucellar diseas. *Journal of Paleopathology*. 1994, 6, pp. 41-49.
- European Commission. 2014.** *Bovine and swine diseases, 2014 annual report*. 2014.
- European Commissionb. 2015.** *Annex I.b :Programme for the eradication of bovine Tuberculosis, bovine Brucellosis or sheep and goat Brucellosis (B. melitensis) submitted for obtaining EU cofinancing*. 2015. pp. 28-33.
- FAO/WHO. 1986.** *Sixth report of the expert committee on brucellosis*. Geneva, Switzerland : Technical report series 740, 1986. pp. 1-132.
- Farina, R. 1980.** Current serological methods in Brucella meltensis diagnosis. *Brucella meltensis*. s.l. : Martinus Nijhoff Publ., 1980, pp. 139-146.
- Farrell, ID. 1974.** The development of new selective medium for the Isolation of Brucella abortus from contaminated sources. *Research in Veterinary Science*. 1974, Vol. 16, pp. 280-286.

- FDA. 2015.** *Testing Methodologies for E. coli O157:H7 and Salmonella species in Spent Sprout Irrigation Water (or Sprouts)*. 2015.
- Ficht, TA, et al. 1989.** DNA sequence and expression of the 36-kilodalton outer membrane protein gene of *Brucella abortus*. *Infection and Immunity*. 1989, 57, pp. 3281-3291.
- Foster, G., et al. 2007.** *Brucella ceti* sp. nov. and *Brucella pinnipedialis* sp. nov. for *Brucella* strains with cetaceans and seals as their preferred hosts. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2007, 57 (11), pp. 2688–2693.
- Freer, E, et al. 1995.** Heterogeneity of *Brucella abortus* lipopolysaccharides. *Research in Microbiology*. 1995, 146, pp. 578-596.
- Gall and Nielsen. 2004.** Serological diagnosis of bovine brucellosis: a review of test performance and cost comparison. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.* 2004, Vol. 23, 3, pp. 989-1002.
- Gamazo, C, et al. 1993.** *Brucella* Group 3 outer membrane proteins contain a heat-modifiable protein. *FEMS Microbiology Letters*. 1993, 112, pp. 141-146.
- Garin-Bastuji, B and Trap, D. 1990.** *Brucelloses animales, Techniques de laboratoire*. Maisson Alfort Cedexm, France : CNEVA, 1990.
- Giovannini, et al. 2004.** Comparison of serological and milk tests for bovine brucellosis using a monte carlo simulation model. *Veterinaria italiana*. 2004, Vol. 40, 1, pp. 32-43.
- Gise`le Bourg, David O`Callaghan and Maria Laura Bo. 2007.** The genomic structure of *Brucella* strains isolated from marine mammals gives clues to evolutionary history within the genus. *Veterinary Microbiology*. 2007, 125.
- Godfroid , J, Nielsen, K and Saegerman, C. 2010.** Diagnosis of brucellosis in Livestock and wildlife. *Croatian Medical Journal*. 51, 2010, Vol. 4, pp. 296-305.
- Godfroid, J. 2002.** *Brucellosis in wildlife*. s.l. : Revue Scientifique et Technique Office International des Epizooties, 2002. pp. 21:277-286.
- Goldbaum, Fernando, et al. 1999.** The 18-kDa cytoplasmic protein of *Brucella* species-an antigen useful for diagnosis-is a lumazine synthase. *Journal of Medical Microbiology*. 1999, Vol. 48, pp. 833-839.
- Gracey, JF. 1986.** *Meat Hygiene*. 8th . London : Bailliere Tindal, 1986.
- Halling , SM, et al. 2005.** Completion of the genome sequence of *Brucella abortus* and comparison to the highly similar genomes of *Brucella melitensis* and *Brucella suis*. *Journal of Bacteriology*. 2005, 8, pp. 2715-2726.
- Hardy Diagnostics. 2006.** *Brucella Dye Tolerance Media (Package Insert)*. 2006.
- Hardy Diagnosticsb. 2006.** ONPG rapid test broth. 2006.
- Hemraj, V, Sharma, D and Gupta, A. 2013.** A Review on commonly used biochemical test for bacteria. *Innovare Journal of life science*. 2013, Vol. 1, 1, pp. 1-7.

- Hoover, David and Friedlander, Arthur. 1997.** Brucellosis. *Medical Aspects of Chemical and Biological Warfare*. 1997, pp. 513-521.
- Hoover, David and Friedlander, Arthur. 1997.** Brucellosis. *Medical Aspects of Chemical and Biological Warfare*. 1997, pp. 513-521.
- Huber, J and Nicoletti, P. 1986.** Comparison of the results of card, rivanol, complement fixation and milk ring test with the isolation rate of *Brucella abortus* from cattle. *American Journal of Veterinary Research*. 47, 1986, pp. 1529-1531.
- Hughes, ML. 1897.** *Mediterranean, Malta or Undulant Fever*. s.l. : London, England: Macmillan and Co, 1897.
- ICSP. 2006.** Minutes of the meeting, 17 September 2003, Pamplona, Spain. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2006, 56, pp. 1173–1175.
- Ignacio , Moriyón and Ignacio , López-Goñi. 1998.** Structure and properties of the outer membranes of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis*. *International Microbiology*. 1998, 1, pp. 19-26.
- Iwasaki, A and Medzhitov, R. 2004.** Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nature Immunology*. 2004, 5, pp. 987-995.
- Jinkyung, K and Splitter, GA. 2003.** Molecular Host-Pathogen Interaction in Brucellosis: Current Understanding and Future Approaches to Vaccine Development for Mice and Humans. *Clinical Microbiology Reviews*. 2003, Vol. 16, pp. 66-78.
- Jones , L, et al. 1980.** Evaluation of a radial immunodiffusion with polysaccharide B antigen for diagnosis of bovine brucellosis. *Journal of Clinical Microbiology*. 12, 1980, pp. 753-758.
- Kaltungo, et al. 2014.** A review on diagnostic techniques for brucellosis. *African Journal of Biotechnology*. 13, 2014, Vol. 1, pp. 1-10.
- Kariminia, A, et al. 2002.** Study of interleukin-10 and interleukin-12 production in response to lipopolysaccharides extracted from two different *Brucella* strains. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*. 2002, 25, pp. 85-93.
- Kreutzer, DL, Dreyfus, LA and Robertson, DC. 1979.** Interaction of polymorphonuclear leukocytes with smooth and rough strains of *Brucella abortus*. *Infection and Immunity*. 1979, 23, pp. 737-742.
- Kubota, K. 2010.** Innate IFN-gamma production by subsets of natural killer cells, natural killer T cells and gammadelta T cells in response to dying bacterial-infected macrophages. *Scandinavian Journal of Immunology*. 2010, Vol. 71, pp. 199-209.
- Lapaque, N, et al. 2005.** *Brucella* lipopolysaccharide acts as a virulence factor. *Current Opinion in Microbiology*. 2005, 8, pp. 60-66.
- Lord, Veronica, et al. 1997.** Serological and bacteriological Study of Swine Brucellosis. *Journal of Clinical Microbiology*. 1997, Vol. 35, 1, pp. 295-297.

- MacWilliams, MP. 2009.** Citrate Test Protocol. *American Society for Microbiology*. 2009.
- Marin, CM, et al. 1996.** Comparison of two selective media for the isolation of *Brucella melitensis* from naturally infected sheep and goats. *Veterinary Record*. 1996, Vol. 138, pp. 409-411.
- Mariri, Ramadan and Akel. 2011.** Assessment of milk ring test and some serological tests in the detection of *Brucella melitensis* in Syrian female sheep. *Tropical Animal Health Production*. April 2011, Vol. 43, 4, pp. 865-870.
- Marston, JA. 1861.** *Report on fever (Malta)*. s.l. : Army Medical Report, 1861. 3:486–521.
- Martin, CM, Alabart, JL and Blasco, JM. 1996a.** Effect of antibiotics contained in two *Brucella* selective media on growth of *B. abortus*, *B. melitensis* and *B. ovis*. *Journal of Clinical Microbiology*. 1996a, Vol. 34, pp. 426-428.
- McDevitt, S. 2009.** Methyl Red and Voges-Proskauer Test Protocols. *American society for microbiology*. 2009.
- McFarlane, D., et al. 1952.** Investigation into sheep abortion in New Zealand during the 1950 lambing season. *Australian Veterinary Journal*. 1952, 28, pp. 221-226.
- Meador, VP, Hagemoser, WA and Deyoe, BL. 1988.** Histopathologic findings in *Brucella abortus*-infected, pregnant goats. *American Journal of Veterinary Research*. 1988, 49, pp. 274–280.
- Meikle, PJ, Perry, MB and Cherwonogrodzky, JW. 1989.** Fine structure of A and M antigens form *Brucella* biovars. *Infection and Immunity*. 1989, 57, pp. 2820-2828.
- Meyer. 1990.** Current concepts in the taxonomy of the genus *Brucella*. [ed.] Nielsen and Ducan. *Animal brucellosis*. Florida, USA : CRC Press, 1990, pp. 1-17.
- Meyer, K. F. and Shaw, E. B. 1920.** A comparison of the morphologic, cultural and biochemical characteristics of *B. abortus* and *B. melitensis* studies on the genus *Brucella* Nov. Gen. *The Journal of Infectious Diseases*. 1920, 27, pp. 173–184.
- Meyer, M. E. 1961.** Metabolic characterization of the genus *Brucella*. Statistical evaluation of the oxidative rates by which types of each species can be identified. *Journal of Bacteriology*. 1961, 82, p. 950.
- Minas, Markos, et al. 2007.** Epidemiological and Clinical Aspects of Human Brucellosis in Central Greece. *Japanese journal of infectious diseases*. 2007, Vol. 60, pp. 362-366.
- Mohan, et al. 2012.** Comparison of milk ring test with milk-ELISA for diagnosis of brucellosis. *J Biotechnol Biomater*. 2012.
- Moreno, E, et al. 1990.** *Brucella abortus* 16S rRNA and lipid A reveal phylogenetic relationship with members of the alpha-2 subdivision of the class Proteobacteria. *Journal of Bacteriology*. 1990, 172, pp. 3569-3576.

- Moreno, E, et al. 1981.** Immunochemical characterization of Brucella lipopolysaccharide and polysaccharides. *Infect Immun.* 1981, 31, pp. 214-222.
- Moreno, E., et al. 1990.** Brucella abortus 16S rRNA and lipid A reveal a phylogenetic relationship with members of the alpha-2 subdivision of the class Proteobacteria. *Journal of Bacteriology.* 1990, 172, pp. 3569-3576.
- Morgan, JB. 1961.** The use of the Thionin Blue Sensitivity Test in the Examination of Brucella. *Journal of general microbiology.* 1961, 25, pp. 135-139.
- Morgan, W, et al. 1969.** The Rose Bengal plate agglutination test in the diagnosis of brucellosis. *Veterinary Record.* 1969, Vol. 85, pp. 636-637.
- Moriyon, I and Bernman, DT. 1983.** Isolation, purification and partial characterization of Brucella abortus matrix protein. *Infection and Immunity.* 1983, 39, pp. 394-402.
- Moriyon, I. 2002.** Brucella antigens. Congress for Human and animal Brucellosis. 2002, pp. 1-4.
- Nauseef, WM. 2007.** How human neutrophils kill and degrade microbes: an intergrated view. *Immunological Reviews.* 2007, 219, pp. 88-102.
- NHS. 2015.** *UK Standards for Microbiology Investigations, Urease test.* 2015.
- NHSa. 2015.** *UK Standards for Microbiology Investigations, Oxidase Test.* 2015.
- NHSb. 2015.** *UK Standards for Microbiology Investigations, Catalase Test.* 2015.
- NHSc. 2014.** *UK Standards for Microbiology Investigations, Indole Test.* 2014.
- Nicoletti, P. 1969.** Further evaluation of serologic procedures used to diagnose brucellosis. *American Journal of Veterinary Research.* 30, 1969, pp. 1811-1821.
- Nicoletti, P. 1980.** The epidemiology of bovine brucellosis. *Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine.* 1980, 24, pp. 69-98.
- Nielsen, et al. 2001.** Validation of the fluorescence polarization assay for detection of milk antibody to brucella abortus. *Journal of immunoassay and immunochemistry.* 2001, Vol. 22, 3, pp. 203-211.
- Nielsen, K and Gall, D. 1994.** Advances in the diagnosis of bovine brucellosis: use of enzyme immunoassays. *Genetic Engineering & Biotechnology News.* 14, 1994, pp. 25-39.
- Nielsen, K and Gall, Db. 2001.** Fluorescence polarization assay for the diagnosis of brucellosis: a review. *Journal of Immunoassay and Immunochemistry.* 22, 2001, pp. 183-201.
- Nielsen, K and Yu, WL. 2010.** Serological diagnosis of brucellosis. *Sec. Biol. Med. Sci.* 2010, pp. 65-68.
- Nielsen, K. 2002.** Diagnosis of brucellosis by serology. *Veterinary Microbiology.* 2002, Vol. 90, pp. 447-459.

- Nielsen, K, et al. 2000.** Fluorescence polarization immunoassay: detection of antibody to *Brucella abortus*. *Methods*. 22, 2000, pp. 71-76.
- Nielsen, Klaus. 2002.** *Veterinary Microbiology*. 2002, Vol. 90, pp. 447-459.
- Nikoletti, P. 1989a.** Brucellosis in animals. [ed.] Madkour. *Brucellosis*. Cambridge : University Press, 1989a, pp. 250-262.
- Nyirenda, TS, et al. 2010.** Early interferon- γ production in human lymphocyte subsets in response to nontyphoidal *Salmonella* demonstrates inherent capacity in innate cells. *PloS ONE*. 2010, Vol. 5.
- OIE. 2009.** Bovine Brucellosis. *OIE Terrestrial Manual*. 2009.
- OIEb. 2016.** Brucellosis. *OIE Terrestrial Manual* . 2016.
- Ortner, JD and Frohlich, B. 2007.** The EB IA tombs and burials of Bab edh-Dhra, Jordan: a bioarchaeological perspective on the people. *International Journal of Osteoarchaeology*. 2007, 17, pp. 358-368.
- Ortner, JD. 2003.** *Identification of Pathological Conditions in Human Skeletal Remains*. San Diego, USA : Academic Press, 2003. pp. 215-221.
- Osterman, B. and Moriyon, I. 2006.** International committee on systematics of prokaryotes; subcommittee on the taxonomy of *Brucella*: minutes of the meeting, 17 September 2003, Pamplona, Spain. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2006, 56(5), pp. 1173-1175.
- Palanduz, A., et al. 2000.** Brucellosis in a mother and her young infant: probable transmission by breast milk. *International Journal of Infectious Diseases*. 2000, Vol. 4 (1), pp. 55-6.
- Pappas, G., et al. 2006.** *Brucella* as a biological weapon. *Cellular and Molecular Life Science*. 2006, 63: 2229.
- Paquet, J. Y., et al. 2001.** Molecular, Antigenic, and Functional Analyses of Omp2b Porin Size Variants of *Brucella* spp. *journal of bacteriology*. 2001, Vol. 183, 16, pp. 4839-4847.
- Paquet, Jean-Yves, et al. 2001.** Molecular, Antigenic, and Functional Analyses of Omp2b Porin Size Variants of *Brucella* spp. *Journal of Bacteriology*. 2001, Vol. 183, 16, pp. 4839-4847.
- Parkin, J and Cohen, B. 2001.** An overview of the immune system. *Lancet*. 2001, 355, pp. 1777-1789.
- Patrícia, Gomes Cardoso, et al. 2006.** *Brucella* spp noncanonical LPS: structure, biosynthesis, and interaction with host immune system. *Microbial Cell Factories*. 2006, 5:13.
- Pauletti, Barbosa, Renato, Styne and Dorneles , Seles. 2015.** Reduced Susceptibility to Rifampicin and Resistance to Multiple Antimicrobial Agents among *Brucella abortus* Isolates from Cattle in Brazil. *PLOS ONE*. 2015, Vol. 10, 7.

- Paulsen , Seshadri and Nelson. 2002.** The *Brucella suis* genome reveals fundamental similarities between animal and plant pathogens and symbionts. 2002, 99(20):1, pp. 3148– 13153.
- Perry, MB and Bundle, DR. 1990.** Lipopolysaccharide antigens and carbohydrates of *Brucella*. [ed.] LG Adams. *Advances in Brucellosis*. s.l. : TX: Texas A&M University Press, 1990, pp. 76-88.
- Phillippon, A. 1968.** Identification de *Brucella abortus*Q métabolisme oxydative et lysotypie. *Annales de l'Institut Pasteur / Microbiologie*. 1968, 138:70.
- Pickett, M. J. and Calderone, J. G. 1963.** Criteria for Identification of *Brucella* Species. *American Journal of Public Health and the Nation's Health*. 1963, 53(4), pp. 655–656.
- Poiester, FP, et al. 2010.** Diagnosis of Brucellosis. *Open veterinary journal*. 2010, Vol. 4:46.
- Qureshi, N, et al. 1994.** Structural analysis of the lipid A derived from the lipopolysaccharide of *Brucella abortus*. *Journal of Endotoxin Research*. 1994, 1, pp. 137-148.
- Radford, D., et al. 2004.** Brucellosis, Review. Centers for Disease Control and Prevention. Food Security and Public Health at Iowa State University, 2004.
- Raetz, CRH. 1996.** Bacterial lipopolysaccharides: a remarkable family of bioactive macroamphiphiles. [ed.] FC Neidhardt. *Escherichia coli and Salmonella*. 1996, Vol. I, pp. 1035-1063.
- Rajala, et al. 2017.** Detection and characterization of *Brucella* spp. in bovine milk in small-scale urban and peri-urban farming in Tajikistan. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017, Vol. 11, 3.
- Ramos-Sánchez, MC, et al. 1992.** Investigations on thermotropic phase behavior of lipids A from *Brucella* and other Gram-negative bacteria. *Thermochimica Acta*. 1992, 144, pp. 299-305.
- Rashidi, JS, et al. 2001.** Brucellosis in early Bronze age Jordan and Bahrain: an analysis of possible cases of brucella spondylitis. *American Journal of Physical Anthropology*. 2001, pp. 114-122.
- Redfeam, MS and Berman, DT. 1960.** Application of the gel-diffusion technique for typing brucellae. *Bulletin of the World Health Organization*. 1960, 23, pp. 133-134.
- Regulation (EC) No 853/2004. 2004.** laying down specific hygiene rules for on the hygiene of foodstuffs. *Official Journal of the European Union*. 2004.
- Regulation (EC) No 854/. 2004.** laying down specific rules for the organisation of official controls on products of animal origin intended for human consumption. *Official Journal of the European Union*. 2004.
- Rest, RF and Robertson, DC. 1975.** Characterization of the electron transport system in *Brucella abortus*. *Journal of Bacteriology*. 1975, 122, pp. 139-144.

- Rittig, MG, et al. 2001.** Intracellular survival of *Brucella* spp. in human monocytes involves conventional uptake but special phagosomes. *Infection and Immunity*. 2001, 69, pp. 3995-4006.
- Rittig, MG, et al. 2003.** Smooth and rough lipopolysaccharide phenotypes of *Brucella* induce different intracellular trafficking and cytokine/chemokine release in human monocytes. *Journal of Leukocyte Biology*. 2003, 74, pp. 1045-1055.
- Robinson, A. 2003.** Guidelines for coordinated human and animal brucellosis surveillance. *FAO animal production and health paper 156*. Rome : Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2003.
- Rojas, N, et al. 1994.** Immunochemical identification of *Brucella abortus* lipopolysaccharide epitopes. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 1994, 1, pp. 206-213.
- Romero, et al. 1995.** Evaluation of PCR and Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay on Milk Samples for Diagnosis of Brucellosis in Dairy Cattle. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*. December 1995, Vol. 33, 12, pp. 3198-3200.
- Rose, JE and Roepke, MH. 1957.** an acidified antigen for detection of non specific reactions in the plate agglutination test for bovine Brucellosis. *American Journal of Veterinary Research*. 18, 1957, pp. 550-555.
- Sada-Ovalle, I, et al. 2008.** Innate invariant NKT cells recognize *Mycobacterium tuberculosis*-infected macrophages, produce interferon-gamma, and kill intracellular bacteria. *PLOS Pathogens*. 2008, Vol. 4.
- Salcedo, SP, et al. 2008.** *Brucella* control of dendritic cell maturation is dependent on the TIR-containing protein Btp1. *PLOS Pathogens*. 2008, 4, e21.
- Salman, et al. 2014.** Application of Different Serological Tests for the Detection of the Prevalence of Bovine Brucellosis in Lactating Cows in Khartoum State, Sudan. *Journal of Applied and Industrial Sciences*. 2014, Vol. 2, 5, pp. 213-218.
- Sameer, Al-Ghamdi, Abdulrahman, Al-Ghamdi and Hussain, A. 2015.** Epidemiology Of Brucellosis And Changing Trends In Control & Treatment. *International Journal of Advanced Research*. 2015, Vol. III, 7, pp. 405-414.
- Scholz, et al. 2010.** *Brucella inopinata* sp. nov., isolated from a breast implant infection. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2010, 60, pp. 801–808.
- Scholz, et al. 2008.** *Brucella microti* sp. nov., isolated from the common vole *Microtus arvalis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2008, 58, pp. 375-382.
- Sherding, Robert. 2006.** Chapter 19 - Systemic Bacterial Infectious Diseases. [book auth.] Stephen Birchard and Sherding Robert. *Saunders Manual of Small Animal Practice*. St. Louis, Missouri 63146 : SAUNDERS ELSEVIER, 2006, pp. 195-197.

Shields, P and Cathcart, L. 2011. Motility test Medium Protocol. *American society for microbiology*. 2011.

Skendros, P and Boura, P. 2013. Immunity to brucellosis. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*. 2013, Vol. 32, 1, pp. 137-147.

Skendros, P, Pappas, G and Boura, P. 2011. Cell-mediated immunity in human brucellosis. *Microbes and Infection*. 2011, 13, pp. 134-142.

Smith, HA, Williams, E and Pearce, JH. 1962. Foetal erythritol: a cause of the localization of *Brucella abortus* in bovine contagious abortion. *Nature*. 1962, Vols. 193:47-9.

Soulie, E. 1982. Brucellosis: a case report dating from 650–700 AD. *Paleopathology Newsletter*. 1982, 38, pp. 7–10.

Sowa, BA. 1990. Membrane proteins of *Brucella* spp. [επιμ.] LG Adams. *Advances in Brucellosis Research*. s.l. : College Station, TX: Texas A& M University Press, 1990, σσ. 89-105.

Sperry, Jay and Robertson, Donald. 1975. erythritol Catabolism by *Brucella abortus*. *Journal of Bacteriology*. 1975, Vol. 121, 2, pp. 619-630.

Stableforth, AW and Jones, LM. 1963. *International Committee on Bacteriological Nomenclature subcommittee on taxonomy of brucella*. Montreal, Canada : s.n., 1963. pp. 145-158.

Stamp, JT, et al. 1950. Enzootic abortion in ewes and transmission of the disease. *Veterinary Records*. 1950, Vol. 62, pp. 251-254.

Stoenner, H. and Lackman, D. 1957. A new species of *Brucella* isolated from the desert wood rat, *Neotoma lepida* Thomas. *American Journal of Veterinary Research*. 1957, 18, pp. 947-951.

Stoffregen , WC, Olsen, SC and Bricker, BJ. 2006. Parenteral vaccination of domestic pigs with *Brucella abortus* strain RB51. *American Journal of Veterinary Research*. 67, 2006, pp. 1802-1808.

Sypek, JP, et al. 1993. Resolution of cutaneous leishmaniasis: interleukin 12 initiates a protective T helper type 1 immune response. *The Journal of Experimental Medicine*. 1993, 177, pp. 1797-1802.

Thomas, F. 2010. *Brucella* taxonomy and evolution. *Future Microbiology*. 2010, 5(6), σσ. 859–866.

Tiller, Rebekah V, et al. 2010. Identification of an unusual *Brucella* strain (BO2) from a lung biopsy in a 52 year-old patient with chronic destructive pneumonia. *BMC Microbiology*. 2010, 10:23.

Traum, J. 1914. *Report of the Chief of the Bureau of Animal Industry*. Washington, DC : United States Department of Agriculture, 1914. 30.

- Tsai, C and Frasc, E. 1982.** A sensitive stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry*. 1982, 119, pp. 115-119.
- Urmeneta, Alonso, et al. 1988.** Enzyme-Linked Immunosorbent Assay with Brucella Native Hapten Polysaccharide and Smooth Lipopolysaccharide. *Journal of Clinical Microbiology*. 1988, Vol. 26, 12, pp. 2642-2646.
- Vanzini, et al. 2001.** Comparison of an indirect ELISA with the Brucella milk ring test for detection of antibodies to Brucella abortus in bulk milk samples. *Veterinary Microbiology*. 2001, pp. 55-60.
- Velasco, J. 1997.** Relaciones antigénicas y estructurales entre Ochrobactrum anthropi y Brucella spp. Navarra, Spain : s.n., 1997. Ph.D. Thesis.
- Velasco, J. , et al. 1998.** Evaluation of the relatedness of Brucella spp. and Ochrobactrum anthropi and description of Ochrobactrum intermedium sp. nov. a new species with a closer relationship to Brucella spp. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 1998, 48, pp. 759–768.
- Verger, J. M., et al. 1985.** Brucella, a monospecific genus as shown by deoxyribonucleic acid hybridization. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 1985, 35, pp. 292–295.
- Vigeant, Patrice , Mendelson, Jack and Miller, Mark . 1995.** Human to human transmission of Brucella melitensis. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*. 1995, Vol. 6(3):, pp. 153–155.
- Wareth, et al. 2014.** Detection of Brucella melitensis in bovine milk and milk products from apparently healthy animals in Egypt by real-time PCR. *J Infect Dev Ctries*. 2014, Vol. 8, 10, pp. 1339-1343.
- Whatmore, A M., et al. 2014.** Brucella papionis sp. nov., isolated from baboons (Papio spp.). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2014, 64, pp. 4120-4128.
- WHO. 2006.** Brucellosis in humans and animals. 2006, pp. 4-10.
- Winter, AJ. 1987.** Outer membrane proteins of Brucella. *Annales de l'Institut Pasteur / Microbiologie*. 1987, 138, pp. 87-89.
- Wright, AE and Smith, F. 1897.** On the application of the serum test to the differential diagnosis of typhoid and Malta fever. *Lancet*. 1, 1897, pp. 656-659.
- Wyatt. 2005.** How Themistocles Zammit found Malta fever (brucellosis) to be transmitted by the milk of goats. *Journal of the Royal Society Medicine*. 2005, pp. 98:451-454.
- Xie, X. 1986.** Orally administrable brucellosis vaccine: Brucella suis strains 2 vaccine. *Vaccine*. 4, 1986, pp. 212-216.
- Yingst, S and Hoover, DL. 2003.** T cell immunity to brucellosis. *Critical Reviews in Microbiology*. 2003, 29, pp. 313-331.

Καραϊωάννογλου, ΠΓ. 2008. Νόσοι των σφάγιων ζώων οι οποίες οφείλονται σε βακτήρια, σε ιούς και σε άλλους παθογόνους παράγοντες. *Υγιεινή του κρέατος των θηλαστικών*. Θεσσαλονίκη : Εκδοτικός οίκος Αδελφών Κυριακίδη, 2008, pp. 278-280.

Κατσιώλης, et al. 2014. *Βρουκέλλωση (Μελιταίος πυρετός)*. Αθήνα : Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων, 2014.

ΚΕΕΛΠΝΟ. 2011. *Επιδημιολογικά στοιχεία για την βρουκέλλωση στην Ελλάδα*. 2011.

Μπουρτζή-Χατζοπούλου, Ε. 2008. Γένος *Brucella*. 2008. pp. 32-47. Διδακτικές Σημειώσεις.

Στουρνάρα, Α. 2008. *Συμβολή στη μελέτη της ανοσολογικής απάντησης ενηλίκων και ανηλίκων προβάτων και αιγών με κλασικές και νεότερες ορολογικές δοκιμές μετά από οφθαλμικό εμβολιασμό με εμβόλιο REV-1*. 2008. Διδακτορική διατριβή.

Φύλλο Εφημερίδας της Κυβερνήσεως. 2016. Αποφάσεις για το πρόγραμμα ελέγχου και εκρίζωσης της βρουκέλλωσης των αιγών και των προβάτων. Αθήνα : Εθνικό Τυπογραφείο, 4 Νοεμβρίου 2016. Αρ. Φύλλου 3589.

Φύλλο Εφημερίδας της Κυβερνήσεως. 2015. Πρόγραμμα εκρίζωσης της βρουκέλλωσης βοοειδών. Αρ. Φύλλου 2464 Αθήνα : Εθνικό Τυπογραφείο, 16 Νοεμβρίου 2015.