



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΤΟΜΕΑΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ – ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΛΟΙΜΩΞΕΩΝ ΑΠΟ *BRUCELLA* SPP.

ΕΥΘΑΛΙΑ ΠΡΙΑΒΑΛΗ

Ιατρός Βιοπαθολόγος

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2011

«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα»
N. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος)

Ημερομηνία αίτησης της κ. Πριάβαλη Ευθαλίας: 27-9-2002

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 486^α/3-12-2002

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπουσα

Λεβειδιώτου –Στεφάνου Σταματίνα Επίκουρη Καθηγήτρια Μικροβιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη

Παπαδοπούλου Χρυσάνθη Επίκουρη Καθηγήτρια Μικροβιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Παππάς Περικλής Λέκτορας Φαρμακολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 17-12-2002

«Μελέτη των λοιμώξεων από Brucella spp.»

ΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ : 704α/25-1-2011

Μαυρίδης Ανέστης	Καθηγητής Μικροβιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Σιαμοπούλου –Μαυρίδου Αντιγόνη	Καθηγήτρια Παιδιατρικής Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Λεβειδιώτου –Στεφάνου Σταματίνα	Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μικροβιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Παπαδοπούλου Χρυσάνθη	Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μικροβιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Βρυώνη Γεωργία	Επίκουρη Καθηγήτρια Μικροβιολογίας Ιατρικής Σχολής Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών
Παππάς Περικλής	Επίκουρος Καθηγητής Φαρμακολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Γκαρτζονίκα Κωνσταντίνα	Λέκτορας Μικροβιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 7-7-2011

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ

Ιωάννης Γουδέβενος

Καθηγητής Παθολογίας- Καρδιολογίας

Η Γραμματέας της Σχολής



ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΣΒΕΝΤΖΟΥΡΗ -ΖΩΗ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η βρουκέλλωση είναι η συχνότερη ζωνόσος βακτηριακής προέλευσης, με περισσότερες από μισό εκατομμύριο νέες περιπτώσεις ετησίως, αποτελώντας σημαντικό πρόβλημα δημόσιας υγείας αλλά και σοβαρών οικονομικών απωλειών λόγω προσβολής του ζωϊκού κεφαλαίου, ιδιαίτερα για τις αναπτυσσόμενες χώρες. Όσον αφορά την Ελλάδα, μια χώρα μέτριας ενδημικότητας, το ετήσιο οικονομικό κόστος εξαιτίας της ανθρώπινης νοσηρότητας μόνο, υπολογίζεται ότι ακολουθεί το αντίστοιχο της φυματίωσης, της μηνιγγίτιδας και της ηπατίτιδας Β.

Τα τελευταία χρόνια έχει επανατοποθετηθεί στο επίκεντρο του επιστημονικού ενδιαφέροντος εξαιτίας:

- ✓ της επιδημιολογίας της νόσου που αλλάζει λόγω νέων εστιών που σχετίζονται με συγκεκριμένα κοινωνικοοικονομικά γεγονότα
- ✓ της παρουσίας της *Brucella* σε όλες τις λίστες πιθανών βιολογικών παραγόντων, αν και αυτό μπορεί να είναι κυρίως ιστορικής σημασίας
- ✓ της αλλαγής στην οικολογία της *Brucella*, με την αναγνώριση νέων πληθυσμών σε υψηλό κίνδυνο έκθεσης
- ✓ της εξελισσόμενης επιστημονικής συζήτησης σχετικά με την ταξινόμηση των ειδών αλλά και του γένους σαν σύνολο
- ✓ της αναγνώρισης ότι η ανθρώπινη νόσος μπορεί να μιμηθεί τη φυματίωση όσον αφορά την τάση της να προκαλεί χρόνια, λανθάνουσα λοίμωξη.

Το γένος *Brucella* ανήκει στα α_2 -proteobacteria και αποτελείται από Gram αρνητικά κοκκοβακτηρίδια. Θεωρείται πλέον «δυσνητικά ενδοκυττάριο, εξωκυττάριο παράσιτο» και από τα έξι ιστορικά αναγνωρισμένα είδη, η *B. melitensis* είναι η κύρια αιτία ανθρώπινης βρουκέλλωσης παγκοσμίως καθώς και το είδος με την μεγαλύτερη λοιμογόνο δύναμη. Αν και η νόσος που προκαλεί είναι σπάνια θανατηφόρα, ωστόσο μπορεί να είναι αρκετά καταβλητική με μεγάλο ποσοστό επιπλοκών και αυξημένο κίνδυνο υποτροπών, αλλά και μετάβασης σε χρονιότητα, λόγω ενδοκυττάριας εντόπισης του παθογόνου και της ικανότητας του να διαφεύγει των αμυντικών μηχανισμών του ξενιστή χρησιμοποιώντας πολύπλοκες παθοφυσιολογικές οδούς που είναι ακόμα υπό διερεύνηση.

Η βρουκέλλωση μπορεί να μιμηθεί ποικίλες κλινικές οντότητες, τόσο λοιμώδεις όσο και μη λοιμώδεις και αυτή η ετερογένεια στην κλινική εικόνα καθιστά τη διάγνωση δύσκολη. Η εργαστηριακή επιβεβαίωση της νόσου βασίζεται είτε στην απομόνωση της *Brucella* από καλλιέργειες

αίματος, που αποτελεί και τη μέθοδο αναφοράς, είτε στην ανίχνευση ειδικών αντισωμάτων. Ωστόσο η ευαισθησία των αιμοκαλλιιεργειών ποκίλει από 53-90%, ανάλογα με το στάδιο της νόσου, το είδος *Brucella*, το καλλιιεργητικό υλικό, την ποσότητα των κυκλοφορούντων βακτηρίων και τη μέθοδο που χρησιμοποιείται. Επιπλέον, είναι χρονοβόρες και μπορούν να καθυστερήσουν τη διάγνωση περισσότερο από 7 ημέρες, χωρίς να μπορεί να αγνοηθεί ο κίνδυνος για το προσωπικό του εργαστηρίου. Οι ορολογικές δοκιμασίες από την άλλη, είναι εύκολες στην εκτέλεση και ταχείες, αλλά η ερμηνεία τους είναι συχνά δύσκολη ιδιαίτερα στο αρχικό στάδιο της νόσου που τα επίπεδα των αντισωμάτων είναι χαμηλά, σε περιπτώσεις υποτροπών και επαναλοιμώξεων, σε ενδημικές περιοχές, σε άτομα επαγγελματικά εκτειθέμενα και στη χρόνια μορφή της νόσου.

Η ραγδαία εξέλιξη των μοριακών τεχνικών τα τελευταία χρόνια, τις καθιστά χρήσιμο εναλλακτικό μέσο για τη διάγνωση της βρουκέλλωσης με μεθόδους που βασίζονται στην ενίσχυση γενετικού υλικού της *Brucella*. Τέτοιες μέθοδοι είναι αυτή της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (polymerase chain reaction-PCR) συνδυασμένης με ενζυμοσυνδετική-ανοσολογική μεθοδολογία (PCR-enzyme-linked immunosorbent assay/PCR-ELISA), στην οποία το στάδιο πολλαπλασιασμού ακολουθείται από τεχνική υβριδισμού για την ανίχνευση του προϊόντος, προκειμένου να αυξηθεί η ευαισθησία της μεθόδου καθώς και της πραγματικού χρόνου PCR (Real Time PCR/RT-PCR) στην οποία η αντίδραση πολλαπλασιασμού και η ανίχνευση του προϊόντος γίνονται ταυτόχρονα στο ίδιο σωληνάριο. Επίσης, στη δεύτερη αυτή μεθοδολογία, παρέχεται η δυνατότητα ποσοτικοποίησης του βακτηριακού φορτίου που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παρακολούθηση ασθενών μετά τη θεραπεία. Επιπλέον, μπορεί να συμβάλει στην καλύτερη κατανόηση της πραγματικής φυσικής ιστορίας της νόσου και στην διερεύνηση του πώς και πότε το παθογόνο «εκριζώνεται» από τον ανθρώπινο οργανισμό.

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η αξιολόγηση της εφαρμογής στη διάγνωση της βρουκέλλωσης των προαναφερθέντων μοριακών τεχνικών σε κλινικά δείγματα από ασθενείς με οξεία νόσο, καθώς και η παρακολούθηση με την RT-PCR του βακτηριακού DNA πριν, κατά τη διάρκεια και μετά το τέλος της θεραπείας και η πιθανή συσχέτιση του με την έκβαση και πορεία της νόσου.

Για τη συγκρότηση και πραγματοποίηση αυτής της εργασίας παρακινήθηκα από την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μικροβιολογίας κ. Σταματίνα Λεβειδιώτου.

Η εργασία αυτή πραγματοποιήθηκε εξ' ολοκλήρου στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων υπό

την επίβλεψη της Αναπληρώτριας Καθηγήτριας κας Σταματίνας Λεβειδιώτου-Στεφάνου.

Επιθυμώ να εκφράσω την ευγνωμοσύνη και τις ευχαριστίες στην Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μικροβιολογίας κ. Σταματίνα Λεβειδιώτου-Στεφάνου, τόσο για την ανάθεση και επίβλεψη αυτής της εργασίας, όσο και για τις πολύτιμες υποδείξεις της, το απεριόριστο επιστημονικό ενδιαφέρον και την αμέριστη συμπαράσταση της σε όλη τη διάρκεια εκπόνησης της εργασίας.

Εκφράζω τις ιδιαίτερες ευχαριστίες μου στα μέλη της Συμβουλευτικής Επιτροπής, στην Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μικροβιολογίας κ. Χρυσάνθη Παπαδοπούλου και στον Επίκουρο Καθηγητή Φαρμακολογίας κ. Περικλή Παππά για το ενδιαφέρον που υπέδειξαν κατά την εκτέλεση της εργασίας και τις χρήσιμες υποδείξεις τους.

Εκφράζω επίσης τις ευχαριστίες μου στα μέλη της επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής, Καθηγητή κ. Μαυρίδη Ανέστη, Καθηγήτρια κ. Αντιγόνη Σιαμοπούλου-Μαυρίδου, Επίκουρη Καθηγήτρια κ. Γεωργία Βρυώνη και Λέκτορα κ. Κωνσταντίνα Γκαρτζονίκα για τις πολύτιμες υποδείξεις τους.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω την Επίκουρη Καθηγήτρια κ. Γεωργία Βρυώνη και τη Λέκτορα κ. Κωνσταντίνα Γκαρτζονίκα για το ξεχωριστό ενδιαφέρον, την επιστημονική υποστήριξη και την συνεισφορά τους σε θέματα τεχνογνωσίας.

Νοιώθω την ανάγκη να εκφράσω την βαθιά ευγνωμοσύνη μου στις εκλεκτές συναδέλφους, κ. Ελένη Γκεσούλη και κ. Χαρά Μπομπογιάννη για την πολύτιμη βοήθεια τους, καθώς και την κ. Χριστίνα Χρηστάκη για την ιδιαίτερη συμπαράστασή της, καθώς και για τη βοήθεια της στη συλλογή και αποθήκευση των δειγμάτων.

Ευχαριστώ θερμά τον παθολόγο κ. Γεώργιο Παππά για την καθοριστική συμβολή του στην συλλογή των κλινικών πληροφοριών.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω επίσης, όλο το επιστημονικό, τεχνικό και διοικητικό προσωπικό του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	7
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	17
1. ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ	19
2. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ	21
2.1 Η <i>Brucella</i> ως βιολογικό όπλο	25
3. ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑ	26
3.1 Μορφολογία	26
3.2 Φυσιολογία	27
3.3 Μεταβολισμός – Βιοχημικές ιδιότητες	28
3.4 Καλλιέργεια	29
3.4.1 Καλλιέργεια παρουσία χρωστικών	31
3.5 Αντιγονική δομή	32
3.5.1 Επιφανειακά αντιγόνα	32
3.5.2 Ενδοκυττάρια αντιγόνα	35
3.6 Γονιδιακή δομή	35
3.6.1 Πλασμίδια και ανταλλαγή γενετικού υλικού	37
3.6.2 Φάγοι	37
4. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ – ΟΙΚΟΛΟΓΙΑ	38
4.1 Γεωγραφική κατανομή – Επιδημιολογικά χαρακτηριστικά	38
4.2 Τρόποι μετάδοσης	44
5. ΛΟΙΜΟΓΟΝΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ – ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ	45
5.1 Η <i>Brucella</i> αλλάζει την ενδοκυττάρια κυκλοφορία εντός των κυττάρων ξενιστών	47
5.1.1 Το σύστημα BvrRS	48
5.1.2 Το σύστημα έκκρισης τύπου IV	49
5.2 Φυσιολογική προσαρμογή της <i>Brucella</i> στο ενδοκυττάριο περιβάλλον	50
5.2.1 Αντίσταση στην οξειδωτική ζημιά	50
5.2.2 Αντίσταση στα προϊόντα ενεργού αζώτου	51
5.2.3 Αντίσταση στο όξινο pH	51

5.2.4	Αντίσταση σε αντιμικροβιακά πεπτίδια	51
5.2.5	Αντίσταση στη στέρηση θρεπτικών συστατικών	51
5.3	Άλλοι πιθανοί λοιμογόνιοι παράγοντες	52
5.4	Αντίσταση των φαγοκυττάρων στην απόπτωση	52
5.5	Λοιμογονικότητα στα rough στελέχη της <i>Brucella</i>	53
5.6	Ανοσιακή απάντηση στη <i>Brucella</i>	53
6.	ΠΑΘΟΓΟΝΟΣ ΔΡΑΣΗ	55
6.1	Κλινικές εκδηλώσεις	55
6.2	Επιπλοκές	58
6.2.1	Σκελετικό σύστημα	58
6.2.2	Ηπατοχοληφόρο σύστημα	58
6.2.3	Νευρικό σύστημα	59
6.2.4	Καρδιαγγειακό σύστημα	59
6.2.5	Ουρογεννητικός σωλήνας	59
6.2.6	Αιματολογικές επιπλοκές	60
6.2.7	Αναπνευστικό σύστημα	60
6.2.8	Οφθαλμικές επιπλοκές	60
6.3	Η βρουκέλλωση στην παιδική ηλικία	60
6.4	Ειδικές καταστάσεις	63
6.4.1	Βρουκέλλωση και εγκυμοσύνη	63
6.4.2	Υποτροπές	63
6.4.3	Βρουκέλλωση και ανοσοκατασταλμένοι	63
7.	ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ	64
7.1	Μη ειδική	64
7.2	Ειδική	64
7.2.1	Καλλιέργεια	64
7.2.2	Ορολογικές μέθοδοι	73
7.2.2.1	Συγκολλητινοαντίδραση Wright (Serum agglutination test – SAT)	74
7.2.2.2	Συγκολλητινοαντίδραση Wright σε πλάκες μικροαραιώσεων (Microagglutination test – MAT)	76
7.2.2.3	Συγκολλητινοαντίδραση με 2-Μερκαπτοαιθανόλη (2 – ME)	76
7.2.2.4	Συγκολλητινοντίδραση Rose Bengal σε πλάκα ή σε σκληρό χαρτί (Rose Bengal plate or card test)	76

7.2.2.5	Δοκιμή αντιανθρώπινης σφαιρίνης (Coombs)	77
7.2.2.6	Brucella capt (Vircell, Granada, Spain)	78
7.2.2.7	Δοκιμή συνδέσεως συμπληρώματος (Complement fixation test – CFT)	78
7.2.2.8	Ανοσοενζυμική μέθοδος (Enzyme-linked immunosorbent assay – ELISA)	78
7.2.2.9	Έμμεσος ανοσοφθορισμός (Indirect fluorescent antibody test – IFA)	80
7.2.2.10	Ραδιοανοσολογική μέθοδος (Radioimmunoassay – RIA)	80
7.2.3	Μοριακές τεχνικές	81
7.2.3.1	Άμεση ανίχνευση	81
7.2.3.2	Ταυτοποίηση – Τυποποίηση	88
7.3.2.1	PCR ενίσχυσης πολλαπλών στόχων (multiplex PCRs)	88
7.3.2.2	Amplified fragment length polymorphism (AFLP)	88
7.3.2.3	PCR τυχαία πολλαπλασιασμένου πολυμορφικού DNA (random amplified polymorphic DNA PCR/RAPD-PCR)	88
7.3.2.4	Πολλαπλασιασμός και ανάλυση με περιοριστικά ένζυμα (PCR-restriction fragment length polymorphism / PCR-RFLP)	89
7.3.2.5	Multiple locus variable number of tandem repeats analysis (MLVA)	89
8.	ΘΕΡΑΠΕΙΑ – ΠΡΟΦΥΛΑΞΗ	90
8.1	Θεραπεία	90
8.2	Πρόληψη – Προφύλαξη	97
	ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	99
1.	ΣΚΟΠΟΣ	101
2.	ΥΛΙΚΟ – ΜΕΘΟΔΟΙ	103
2.1	Πληθυσμός ασθενών	103
2.2	Μέθοδοι	109
2.2.1	Κλασσικές Μικροβιολογικές Τεχνικές	109
2.2.1.1	Ορολογικές Τεχνικές	109
2.2.1.2	Καλλιεργητικές Τεχνικές	109

2.2.2	Μοριακές Τεχνικές	110
2.2.2.1	Απομόνωση του βακτηριακού DNA από κλινικά δείγματα αίματος	110
2.2.2.2.1	Πολλαπλασιασμός του βακτηριακού DNA με την PCR-ELISA μεθοδολογία	112
2.2.2.2.1.1	Εκκινητές	112
2.2.2.2.1.2	Στοιχειομετρία της αντίδρασης PCR	112
2.2.2.2.1.3	Συνθήκες της αντίδρασης PCR	113
2.2.2.2.2	Ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (Real Time PCR) μεθοδολογία με χρήση hybridization probes	114
2.2.2.2.2.1	Εκκινητές της RT-PCR	114
2.2.2.2.2.2	Στοιχειομετρία της RT-PCR	114
2.2.2.2.2.3	Συνθήκες πολλαπλασιασμού του DNA με την RT-PCR	114
2.2.2.2.2.4	Ανάλυση αποτελεσμάτων με τη μελέτη της καμπύλης τήξης του προϊόντος (melting curve analysis)	115
2.2.2.2.2.5	Ποσοτικοποίηση του προϊόντος πολλαπλασιασμού με την RT-PCR	116
2.2.2.3.1	Ανίχνευση του προϊόντος πολλαπλασιασμού με την PCR-EIA μεθοδολογία	117
2.2.2.3.1.1	Ηλεκτροφόρηση σε γέλη αγαρόζης	117
2.2.2.3.1.2	Ανίχνευση του προϊόντος με ELISA	117
2.2.2.3.2	Ανίχνευση του προϊόντος πολλαπλασιασμού με την RT-PCR μεθοδολογία	119
3.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	121
3.1	Αποτελέσματα από την εφαρμογή της PCR-EIA μεθοδολογίας και κλασσικών διαγνωστικών μεθόδων στον πληθυσμό των 243 ασθενών	121
3.1.1	Αποτελέσματα εφαρμογής κλασσικών διαγνωστικών μεθόδων	121
3.1.2	Αποτελέσματα από την εφαρμογή της PCR-ELISA μεθοδολογίας	121
3.2	Αποτελέσματα από την εφαρμογή της real-time PCR μεθοδολογίας	

και κλασσικών διαγνωστικών μεθόδων	123
3.2.1.1 Αποτελέσματα κλασσικών διαγνωστικών μεθόδων στον πληθυσμό των 126 ασθενών	123
3.2.1.2 Αποτελέσματα κλασσικών διαγνωστικών μεθόδων στον υποπληθυσμό των 78 ασθενών κατά την αρχική διάγνωση	123
3.2.2 Αποτελέσματα από την εφαρμογή της RT-PCR μεθοδολογίας	124
3.2.2.1 Αποτελέσματα της RT-PCR στον πληθυσμό των 126 ασθενών	126
3.2.2.2 Αποτελέσματα της RT-PCR στον υποπληθυσμό των 78 ασθενών	127
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	131
4.1 Συζήτηση – συμπεράσματα από την εφαρμογή της PCR-ELISA μεθοδολογίας	131
4.2 Συζήτηση – συμπεράσματα από την εφαρμογή της real-time PCR μεθοδολογίας	136
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	143
SUMMARY	145
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	147

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ

Κλινικές καταστάσεις συνώνυμες με βρουκέλλωση έχουν περιγραφεί από την εποχή του Ιπποκράτη το 450 π.Χ. (Cutler et al, 2005). Είναι ακόμη γνωστό από γραπτές πηγές, ότι τα αιγοπρόβατα ήταν τα βασικά οικόσιτα ζώα κατά την περίοδο της Ρωμαϊκής Αυτοκρατορίας. Το γάλα από μικρά μηρυκαστικά ζώα χρησιμοποιούνταν για την παρασκευή τυριού που αποτελούσε ένα από τα βασικά συστατικά στη Ρωμαϊκή κουζίνα. Σ' αυτό βασίστηκε η υπόθεση ότι το γάλα και τα προϊόντα του ήταν σημαντικές πηγές μιας λοιμώδους, εκ τροφίμων, νόσου που αργότερα έγινε γνωστή ως «πυρετός της Μάλτας» (Godfroid et al, 2005).

Η ρωμαϊκή πόλη Herculaneum καταστράφηκε από την ηφαιστειακή έκρηξη του Βεζούβιου τον Αύγουστο του 79 μ.Χ. Ο L. Capasso βρήκε οστικές βλάβες τυπικές βρουκέλλωσης, σε υπολείμματα σκελετού ηλικιωμένων ανθρώπων που σκοτώθηκαν κατά την πρώτη έκρηξη του Βεζούβιου. Επίσης η ανάλυση με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης θαμμένου, απανθρακωμένου τυριού, ανέδειξε την παρουσία κοκκοειδών μικροοργανισμών, μορφολογικά σύμφωνων με *Brucella* spp. (Capasso, 2002).

Η πρώτη ακριβής περιγραφή ανθρώπινης βρουκέλλωσης έγινε το 1861 απ' τον J.A. Marston, γιατρό χειρουργό του Βρετανικού στρατού στη Μάλτα, κατά τη διάρκεια του πολέμου της Κριμαίας (Young, 2005). Περιέγραψε τα συμπτώματα της νόσου στον εαυτό του σαν «γαστρικό, υφέσιμο πυρετό». Ο αιτιολογικός παράγοντας ήταν άγνωστος μέχρι το 1886, οπότε ο Sir David Bruce, ένας γιατρός από τη Σκωτία, παρατήρησε πολυάριθμους κοκκοειδείς μικροοργανισμούς σε χρωματισμένες ιστολογικές τομές απ' το σπλήνα θανάσιμα μολυσμένου στρατιώτη και απομόνωσε καλλιεργητικά ταυτόσημο μικροοργανισμό απ' το σπληνικό ιστό τεσσάρων άλλων στρατιωτών, θυμάτων κι αυτών του πυρετού της Μάλτας (Corbel, 1998; Godfroid et al, 2005).

Ονόμασε το μικροοργανισμό αυτό *Micrococcus melitensis* και διαπίστωσε ότι προκαλούσε υφέσιμο πυρετό μετά από ενοφθαλμισμό σε πιθήκους: ένα ζώο πέθανε απ' την λοίμωξη και ο μικροοργανισμός απομονώθηκε με καλλιέργεια απ' το ήπαρ και το σπλήνα. Ο μικροοργανισμός πήρε το όνομα του είδους από τη λέξη «Μελίτα» (μέλι), το ρωμαϊκό όνομα του νησιού της Μάλτα. Ο ML Hughes, σ' ένα μονογράφημα του 1897, παρουσίασε με μεγάλη λεπτομέρεια τα ευρήματα στους ανθρώπους, δίνοντας έμφαση στον «κυματοειδή πυρετό» και πρότεινε το όνομα κυματοειδής πυρετός (Mantur et al, 2007).

Το 1897, οι Wright και Smith, περιέγραψαν μια συγκολλητινοαντίδραση για την ανίχνευση αντισωμάτων προς τον *M.melitensis* στον ορό ανθρώπων και ζώων (Corbel, 1998). Μ' αυτή τη συγκολλητινοαντίδραση ο Themistocles Zammit, νέος γιατρός από τη Μάλτα, δουλεύοντας με την Επιτροπή Πυρετού της Μεσογείου (1904-1907), ανίχνευσε λοίμωξη σε ντόπιες κατσίκες, ενώ με άλλες μεθόδους έδειξε ότι ο φυσικός ξενιστής του *M.melitensis* είναι οι κατσίκες· ο άνθρωπος μολύνεται απ' την κατανάλωση άβραστου γάλακτος ή τυριού (Williams, 1989). Το 1897 ο καθηγητής Bernard Bang, ένας Δανός κτηνίατρος απομόνωσε ένα μικροοργανισμό που ονόμασε *Bacillus abortus* από περιστατικά εκτρώσεων σε αγελάδες (Lindquist et al, 2007).

Λίγα χρόνια αργότερα, το 1918, η Alice C. Evans, μια Αμερικανίδα βακτηριολόγος διαπίστωσε υψηλό επίπεδο ομοιότητας ανάμεσα στους *M.melitensis* και τον *B. abortus*. Δημοσίευσε αναφορές που περιείχαν πειστικά στοιχεία για την μορφολογική ομοιότητα των μικροοργανισμών αυτών καθώς και για τις παρόμοιες καλλιεργητικές και βιοχημικές ιδιότητες. Περιέγραψε όμως αντιγονικές διαφορές που αποδεικνύονταν με συγκολλητινοαντίδραση. Η ίδια πρότεινε επίσης πιθανή παθογόνο δράση του δεύτερου μικροοργανισμού για τον άνθρωπο, η οποία επιβεβαιώθηκε από άλλους, συμπεριλαμβανομένου και του Bevan (1921-22). Οι Meyer και Shaw, το 1920, πρότειναν το γενικό όνομα *Brucella* για τους δυο μικροοργανισμούς προς τιμή του Sir David Bruce (Mantur et al, 2007).

Το 1929 ο Hubbleston πρότεινε ένα τρίτο είδος τη *B.suis*, για στελέχη που απομονώθηκαν αρχικά απ' τον Traum το 1914 από έμβρυα χοίρων που είχαν αποβληθεί. Ένα τέταρτο είδος, η *B. neotomae*, απομονώθηκε το 1957 απ' τους Stoenner και Lackman από τρωκτικά των δασών στη Γιούτα των Ηνωμένων Πολιτειών Αμερικής. Η *B. onis* ταυτοποιήθηκε σχεδόν ταυτόχρονα, το 1953, απ' τους Simmons και Hall στην Αυστραλία και τους Buddle και Boyes στην Νέα Ζηλανδία, ως αίτιο λοιμώδους επιδιδυμίτιδας προβάτων (κριαριών) (Corbel, 1998). Το 1968 οι Carmichael και Bruner περιέγραψαν ένα έκτο είδος τη *B.canis*, αιτία εκτρώσεων στα σκύλους ράτσας Beagle (Lindquist et al, 2007).

Από τα μέση περίπου της δεκαετίας του 1990, αρκετές μελέτες έχουν περιγράψει την απομόνωση στελεχών *Brucella* από θαλάσσια θηλαστικά. Πιο συγκεκριμένα, το 1994, απομονώθηκε *Brucella* από φώκιες (*Phoca vitulina*), γουρουνόψαρα (*Phocoena phocoena*) και κοινά δελφίνια (*Delphinus delphis*) στις ακτές της Σκωτίας (Ross et al, 1994), καθώς και από το αποβληθέν έμβρυο ενός αιχμάλωτου δελφινιού (*Turciops truncatus*) στην Καλιφόρνια (Ewalt et al, 1994). Στη συνέχεια, αναγνωρίστηκαν και άλλα στελέχη που προέρχονταν από διάφορα θαλάσσια θηλαστικά. Τα στελέχη αυτά αποτελούσαν τουλάχιστον δύο

βιότυπους ανάλογα με την προέλευση από φώκιες ή από θαλάσσια κήτη, και το όνομα “*Brucella maris*” προτάθηκε γι’ αυτά (Jahans et al, 1997). Τα στελέχη που απομονώθηκαν από τα αποβληθέντα έμβρυα του δελφινιού επίσης χαρακτηρίστηκαν και προτάθηκε το όνομα “*Brucella delphini*” (Miller et al, 1999).

Η ανάλυση με μοριακές μεθόδους έχει δείξει ότι όλα αυτά τα στελέχη που βρέθηκαν σε διάφορα θαλάσσια θηλαστικά είναι είδη *Brucella*, αλλά διαφέρουν τόσο μεταξύ τους όσο και από τα υπάρχοντα είδη από πολλές απόψεις, συμπεριλαμβανομένου της δομής του λιποπολυσακχαριδίου (Lipopolysaccharide-LPS) και των πρωτεϊνών της εξωτερικής μεμβράνης (Bricker et al, 2000; Baucheron et al, 2002). Έχει προταθεί, με βάση την προτίμηση σε ξενιστή και τις μοριακές μεθόδους ταξινόμησης, ότι τα στελέχη από τόσο διαφορετικά είδη θαλάσσιων θηλαστικών συνθέτουν τουλάχιστον δύο νέα είδη: τη *Brucella ceti*, που κατά προτίμηση μολύνει θαλάσσια κήτη, και τη *Brucella pinnipedialis*, που κατά προτίμηση προσβάλλει φώκιες (Gottfried et al, 2005).

Σχετικά πρόσφατα ένα νέο είδος, η *Brucella microti*, απομονώθηκε από τον κοινό αρουραίο (*Microtus arvalis*) και τις κόκκινες αλεπούδες. Δεν έχει συνδεθεί ακόμη με ανθρώπινη νόσο αλλά αν αποκτήσει τέτοια δυνατότητα, οι κυνηγοί θα είναι στην πρώτη γραμμή κινδύνου (Scholz et al, 2008). Δύο ακόμη νέα είδη περιγράφηκαν πρόσφατα, η *Brucella inopinata* που απομονώθηκε από εμφύτευμα ανθρώπινου μαστού και συνδέεται φυλογενετικά με τη *B. onis* (De et al, 2008; Mayer-Scholl et al, 2010; Scholz et al, 2010) και το BO2 που παρουσιάζει ομοιότητες με το προηγούμενο και απομονώθηκε από ασθενή με χρόνια πνευμονική νόσο (Tiller et al, 2010). Έχει αναφερθεί επίσης και νέο στέλεχος με τυπικά χαρακτηριστικά *Brucella* αλλά διακριτό από τα ήδη περιγεγραμμένα είδη, προερχόμενο από δύο μεγάλους πιθήκους με θνησιγενή έμβρυα (Schlabritz-Loutsevitch et al, 2009).

2. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ

Με βάση την αλληλουχία βάσεων του γονιδίου του 16S rRNA (Moreno et al, 1990) και την ανάλυση πρωτεϊνών της εξωτερικής μεμβράνης (Cloeckaert et al, 1996) το γένος *Brucella* ταξινομείται στην α₂ υποδιαίρεση της φυλής Proteobacteria μαζί με τα *Ochrobactrum*, *Rhizobium*, *Rhodobacter*, *Agrobacterium*, *Bartonella* και *Rickettsia* (Moreno et al, 1990).

Το γένος *Brucella* καθώς και τα *Mycoplasma* και *Ochrobactrum* ανήκουν στην οικογένεια Brucellaceae. Τα είδη του γένους *Mycoplasma* είναι μικροοργανισμοί του εδάφους που δεν έχουν συνδυασθεί με

ανθρώπινη νόσο ενώ το *Ochrobactrum anthropi* είναι επίσης μικροοργανισμός του εδάφους αλλά ευκαιριακά παθογόνο για τον άνθρωπο (Lindquist et al, 2007). Ένα νέο είδος το *Ochrobactrum intermedium* κατέχει φυλογενετικά θέση ανάμεσα στο *O. anthropi* και τη *Brucella* (Velasco et al, 1998). Η στενή φυλογενετική σχέση των μελών της οικογένειας Brucellaceae αποτελεί ένδειξη κοινής προέλευσης από μικροοργανισμό του εδάφους.

Η οικογένεια Brucellaceae ανήκει στην υποτάξη (order) Rhizobiales, που υπάγεται στην τάξη (class) Alphaproteobacteria της φυλής (phylum) Proteobacteria και domain Bacteria (Garrity and Holt, 2001). Στα Rhizobiales ανήκουν επίσης τα γένη *Bartonella*, *Afipia*, *Methylobacterium* και *Roseomonas*.

Τα κριτήρια για την ταξινόμηση ενός μικροοργανισμού ως μέλους του γένους *Brucella* έχουν καθοριστεί απ' την Υπο-Επιτροπή για τη *Brucella* της Διεθνούς Επιτροπής για τη Συστηματική Βακτηριολογία (Corbel and Morgan, 1975):

- Gram αρνητικά κοκκοβακτηρίδια, ακίνητα που το DNA τους περιέχει το ζεύγος G+C σε αναλογία 58-59 mol% και είναι τουλάχιστον κατά 90% ομόλογο με το DNA των στελεχών αναφοράς, ενώ η ομολογία της αλληλουχίας των βάσεων του 5S και του 16S rRNA πρέπει να είναι πλήρης.
- Σύμπτωση στις περισσότερες πρωτεϊνικές μπάντες με αυτές των στελεχών αναφοράς στην ηλεκτροφόρηση σε gel πολυακρυλαμίδης.
- Χαρακτηριστική σύνθεση λιπαρών οξέων.
- Λιποπολυσακχαρίδιο (Lipopolysaccharide-LPS) χωρίς επτόζες και με τα πολυμερή της Ο αλυσίδας αποτελούμενα από 4-formamido-4,6-dideoxymannose.
- Ορολογικές διασταυρούμενες αντιδράσεις ενδοκυτταρικών αντιγόνων με αυτά των στελεχών αναφοράς.

Όπως αναγράφεται στο προηγούμενο κεφάλαιο υπάρχουν έξι ιστορικά αναγνωρισμένα είδη *Brucella*: *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. neotomae* και *B. onis*. Ο διαχωρισμός γίνεται με βάση τους φυσικούς ξενιστές, την επιδεκτικότητα στη λύση από συγκεκριμένους φάγους και την οξείδωση μιας ποικιλίας από υδρογονάνθρακες και αμινοξέα.

Τα πρώτα τρία είδη διαχωρίζονται περαιτέρω σε βιότυπους με βάση την ικανότητα τους ν' αναπτύσσονται σε υλικά που περιέχουν ορισμένες χρωστικές της ανιλίνης, συγκολλητινοαντιδράσεις με μονοειδικούς αντιορούς και την παραγωγή υδρόθειου. Έτσι η *B. melitensis* υποδιαιρείται σε 3 βιότυπους (1-3), η *B. abortus* σε 7 βιότυπους (1-6, 9) και η *B. suis* σε 5 βιότυπους (1-5) (Corbel and Brinley-Morgan, 1984).

Για τα υπόλοιπα είδη δεν έχουν διαχωρισθεί βιότυποι αλλά υπάρχουν στοιχεία ετερογένειας για τις *B. onis* και *B. canis* (Corbel and Thomas,

1985). Όλα τα είδη *Brucella* φαίνεται να έχουν προέλθει από ένα κοινό πρόγονο που μοιάζει σημαντικά με τον βióτυπο 3 της *B. suis* (Moreno et al., 2002).

Ωστόσο, μελέτες του γενετικού υλικού (DNA/DNA υβριδισμός, αλληλουχία του 16S rRNA) και πολυεστιακής ηλεκτροφόρησης ενζύμων προτείνουν ότι όλα αυτά τα είδη συμπεριλαμβανομένων και των πρόσφατα απομονωθέντων στελεχών από θαλάσσια θηλαστικά, αντιπροσωπεύουν ένα και μόνο είδος (*B. melitensis*) και ότι τα αναγνωρισμένα είδη πρέπει να θεωρούνται βióτυποι της *B. melitensis* (Verget et al, 1985; Yanagi and Yamasato, 1993; Bricket et al, 2000; Candara et al, 2001).

Αυτή η πρόταση δεν έχει γίνει γενικά αποδεκτή λόγω των βιοχημικών και ορολογικών διαφορών ανάμεσα στα είδη, τους διαφορετικούς φυσικούς ξενιστές, τις αναγνωρισμένες διαφορές στην παθογόνο δράση και την παρουσία ειδικών για κάθε είδος πρωτεϊνών στη εξωτερική μεμβράνη (outer membrane proteins-OMPs) καθώς και γονιδίων (Moreno et al, 2002).

Μοριακές γενετικές μελέτες (χαρτογράφηση με τη βοήθεια περιοριστικών ενδονουκλεασών) απεκάλυψαν πολυμορφισμούς σε γονίδια μεταξύ των ειδών (Allardet-Servent et al, 1988; Vizcaino et al, 2000). Ένα από τα πολυμορφικά γονίδια που βοηθούν στην διαφοροποίηση των ειδών του γένους *Brucella* είναι το γονίδιο της πορίνης omp2, που κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη της εξωτερικής μεμβράνης 36-kDa, υπεύθυνη για τον καθορισμό της επιδεκτικότητας στις χρωστικές που χρησιμοποιείται για την ταυτοποίηση των συμβατικών ειδών (Fight et al, 1989).

Ο όρος “nomenspecies”, αντί για είδη, προτιμάται από πολλούς γιατί αντανακλά την έλλειψη πειστικών στοιχείων για διαφορετικά γενετικά είδη.

Τα στελέχη που απομονώθηκαν από θαλάσσια θηλαστικά ταυτοποιήθηκαν ως μέλη του γένους *Brucella* με βάση μορφολογικά, χρωστικά χαρακτηριστικά, τις βιοχημικές ιδιότητες, τη συγκόλληση με μονοειδικούς αντιορούς, τη λύση με ειδικούς βακτηριοφάγους και τη μεταβολική τους δραστηριότητα. Ωστόσο, τα γενικά τους χαρακτηριστικά δεν ήταν απολύτως συμβατά με αυτά των έξι ήδη αναγνωρισμένων ειδών (Jahans et al, 1997; Foster et al, 2002). Το αποτύπωμα της αλληλουχίας IS711 έδειξε ότι μεγαλύτερος αριθμός αντιγράφων της αλληλουχίας αυτής υπάρχει στο γένωμα των στελεχών αυτών σε σχέση με αυτά των χερσαίων στελεχών (Bricker et al, 2000) καθώς και ότι βρίσκεται σε διαφορετική θέση στο χρωμόσωμα. Ένας ειδικός δείκτης των στελεχών αυτών είναι η εντόπιση ενός αντιγράφου κάτω (downstream) από το γονίδιο bp26 (Cloeckaert et al, 2000).

Επιπρόσθετα, ενώ τα έξι ιστορικά αναγνωρισμένα είδη περιέχουν δύο γονίδια omp2 αποτελούμενα από ένα αντίγραφο omp2a και ένα αντίγραφο omp2b, τα θαλάσσια στελέχη φέρουν δύο αντίγραφα του γονιδίου omp2b. Η ανάλυση της αλληλουχίας των γονιδίων αυτών απεκάλυψε επίσης και σημαντική ετερογένεια μεταξύ των θαλάσσιων στελεχών, καταδεικνύοντας ότι αυτοί οι μικροοργανισμοί αποτελούν περισσότερα του ενός είδη (“*B. maris*”), που είχε αρχικά προταθεί. Με σεβασμό στην τρέχουσα ταξινόμηση των ειδών *Brucella* σύμφωνα με την προτίμηση σε ξενιστή αλλά και τον πολυμορφισμό του omp2 γονιδίου, προτάθηκαν τα νέα είδη *B. pinnipedialis* και *B. ceti* (Foster et al, 2007).

Στον Πίνακα 1, συνοψίζονται τα είδη με τους αντίστοιχους ξενιστές (Pappas et al, 2005a; Corbel, 1998 ;Young, 2005):

	Βιότυποι	Φυσικοί ξενιστές	Πρώτη περιγραφή
<i>B. melitensis</i>	1 – 3	Αιγοπρόβατα, καμήλες	Bruce, 1887
<i>B. abortus</i>	1 – 6, 9	Βοοειδή, (καμήλες, βουβάλια, άλογα,)	Bang, 1897
<i>B. suis</i>	1 και 3 2 4 5	Χοίροι Χοίροι, άγριοι λαγοί Τάρανδοι, Άγρια τρωκτικά	Traum, 1914
<i>B. canis</i>	-	Σκύλοι, κογιότ, αλεπούδες	Carmichael και Bruner, 1968
<i>B. ovis</i>	-	Πρόβατα	Buddle και Boyes (Αυστραλία) Simmons και Hall (N. Ζηλανδία)
<i>B. neotomae</i>	-	Άγρια τρωκτικά	Stoenner and Lackman, 1957
<i>B. pinnipedialis</i> , <i>B. ceti</i> (προσωρινά)	-	Φώκιες, θαλάσσια κήτη	Ewalt και Ross, 1994

2.1. Η *Brucella* ως βιολογικό όπλο

Με την έναρξη του Β΄ Παγκοσμίου Πολέμου η *Brucella* συγκέντρωνε αρκετά πλεονεκτήματα για τη χρησιμοποίηση της στην πρόωρη, τότε, βιομηχανία του βιολογικού πολέμου. Μπορεί να προκαλέσει παρατεταμένη και δύσκολη στη θεραπεία με αντιβιοτικά νόσο, με πολύ χαμηλή θνητότητα, με αποτέλεσμα μεγάλος μέρος των εχθρικών στρατευμάτων να εξουδετερωθεί και, ταυτόχρονα, ένα σημαντικό ποσοστό των μη προσβεβλημένων στρατιωτών να ασχολείται με τη φροντίδα τους. Μπορεί επίσης να μεταδοθεί με αερογενή διασπορά (εισπνοή λίγων μόνο μικροοργανισμών είναι επαρκής να προκαλέσει νόσο) και έχει την ικανότητα να επιζεί στο έδαφος και το νερό για αρκετές εβδομάδες, παρέχοντας έτσι άμεση και καθυστερημένη περίοδο μολυσματικότητας. Τα χαρακτηριστικά αυτά σε συνδυασμό με την έλλειψη ασφαλών και αποτελεσματικών εμβολίων για τον άνθρωπο, κατέστησαν το παθογόνο αυτό ελκυστικό υποψήφιο παράγοντα βιοτρομοκρατίας (Godfroid et al, 2005; Pappas et al, 2006b).

Τα είδη του γένους αυτού ταξινομήθηκαν τόσο από Center for Disease Control and Prevention (CDC) όσο και από το National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID) στην κατηγορία Β των παθογόνων που μπορεί να χρησιμοποιηθούν για βιολογικό πόλεμο. Η κατηγορία αυτή περιλαμβάνει παράγοντες (παθογόνα ή τοξίνες) που μεταδίδονται σχετικά εύκολα, προκαλούν μέτριου βαθμού νοσηρότητα και χαμηλή θνητότητα και αποτελούν πρόκληση για την ικανότητα ενός έθνους όσον αφορά την επιτήρηση και την διάγνωση. Συμπεριλαμβάνονται παθογόνα που μεταδίδονται τροφογενώς ή υδατογενώς π.χ. είδη *Salmonella* spp., *Shigella dysenteriae*, *Escherichia coli* O157:H7, *Vibrio cholerae* και *Cryptosporidium parvum* (Humes and Snyder, 2007).

Η *Brucella* ήταν ένας από τους παράγοντες με τους οποίους πειραματίστηκε η Ιαπωνία στην 731 μονάδα της Μαντζουρία πριν και κατά τη διάρκεια του Β΄ Παγκοσμίου Πολέμου. Στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής (ΗΠΑ), η *B. suis* πρωτοχρησιμοποιήθηκε για την κατασκευή βομβών το 1952 και εκτεταμένες ασκήσεις με τις βόμβες αυτές έλαβαν χώρα αργότερα (Christopher et al, 2005). Στην πρώην Σοβιετική Ένωση, η *Brucella* χρησιμοποιήθηκε για αμυντικούς σκοπούς στα πλαίσια του εκτεταμένου Σοβιετικού προγράμματος βιολογικών όπλων Biopreparat. Ο Ken Alibek, ένας πρώην αναπληρωτής διευθυντής που μετακόμισε στις ΗΠΑ το 1992, ανέφερε ότι μη θεραπεύσιμες, ανθεκτικές στα αντιβιοτικά μορφές είχαν αναπτυχθεί τόσο σε ξερή όσο και σε υγρή μορφή με ικανότητα παραγωγής που έφτανε τους 100 τόνους βακτηρίων

και με μέσα μεταφοράς του παθογόνου εξαιρετικά εξελιγμένα. Εκτεταμένες ασκήσεις έλαβαν χώρα στο νησί Vozroshdeniye, στην θάλασσα Αράλη. Ωστόσο, στο τέλος του 20^{ου} αιώνα το ενδιαφέρον για τη *Brucella* εξασθένησε: αναφέρεται χαρακτηριστικά ότι εγκαταλείφθηκε από το Σοβιετικό πρόγραμμα προς χάριν της *Burkholderia pseudomallei*, που θεωρήθηκε πιο ισχυρή (Pappas et al, 2006b).

Γενικά, η χρησιμοποίηση βιολογικών όπλων έχει το πλεονέκτημα του χαμηλού κόστους παραγωγής καθώς και ότι ο εξοπλισμός διασποράς αεροσταγονιδίων από εμπορικές πηγές μπορεί να προσαρμοστεί για τη διάδοση τους. Σε ένα θεωρητικό μοντέλο βιοτρομοκρατικής επίθεσης, από τα 100.000 άτομα που θα εκτεθούν στη *B. melitensis*, 82.500 θα νοσήσουν απαιτώντας παρατεταμένη θεραπεία και καταλήγοντας σε 413 θανάτους. Η οικονομική ζημιά υπολογίζεται σε 477,7 εκατομύρια δολάρια (Kaufmann et al, 1997).

3. ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑ

3.1. Μορφολογία

Οι βρουκέλλες είναι μικρά Gram-αρνητικά κοκκοβακτηρίδια, αλλά κοκκοειδείς και βακτηριακές μορφές επίσης παρατηρούνται. Τα κύτταρα είναι κοντά και λεπτά με ευθύ άξονα, αποστρογγυλεμένα άκρα και πλευρές παράλληλες ή κυρτές προς τα έξω. Το μήκος τους ποικίλλει από 0,6 έως 1,5 μm και η διάμετρος τους από 0,5 έως 0,7 μm . Είναι μικρότερα απ' όλους τους άλλους Gram-αρνητικούς κόκκους. Η *B. melitensis* τείνει να είναι περισσότερο κοκκοειδή στη μορφή σε σχέση με τη *B. abortus* και σπάνια ξεπερνά το 1 μm σε μήκος ενώ οι βακτηριακές μορφές των *B. abortus* και *B. suis* είναι περισσότερο εμφανείς όταν αναπτύσσονται σε πλούσιο υλικό, όπου μεμονωμένα κύτταρα μπορεί να φθάσουν μήκος 2-3 μm .

Διατάσσονται μοναχικά, κατά ζεύγη, σε μικρές ομάδες και μερικές φορές σε κοντές αλυσίδες 4-6 μελών, κυρίως σε υγρά υλικά. Είναι ακίνητα, άσπορα και συνήθως δεν φέρουν έλυτρο. Χρωματίζονται καλά με τις συνήθεις χρωστικές αλλά διπολική χρώση μπορεί να εμφανιστεί καθώς και ανομοιογένεια στο χρώμα κυρίως σε παλιά καλλιέργηματα με ανώμαλες μορφές. L-μορφές έχουν απομονωθεί από φυσικές πηγές και από καλλιέργειες υπό την επίδραση πενικιλίνης, γλυκίνης και ορμονών. Έχουν την μορφολογία και τη δομή βακτηρίων με ελαττωματικό κυτταρικό τοίχωμα. Αν και έχουν απομονωθεί από μολυσμένα άτομα, δεν έχει αποδειχθεί ότι διατηρούν την παθογένεια τους (Corbel, 1998).

Αν και έχουν αρκετά δομικά χαρακτηριστικά κοινά με τα άλλα Gram-αρνητικά βακτήρια έχουν και σημαντικές διαφορές με την *Escherichia coli* (ένα τυπικό Gram-αρνητικό βακτήριο). Σε μελέτες με τη βοήθεια του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου, η επιφάνεια του κυττάρου εμφανίζεται πτυχωτή, πιθανώς απ' την παρουσία δομών σχηματιζόμενων από συμπλέγματα λιποπολυσακχαριδίου(LPS)-πρωτεϊνών που περιλαμβάνουν και την εξωτερική μεμβράνη. Αυτό το στρώμα, πάχους περίπου 9 nm, περικλείει ένα στρώμα πεπτιδογλυκάνης 3-5 nm παχύ, που είναι πολύ περoσσότερο προεξέχον στη *Brucella* σε σχέση με την *E. coli* (Dubray and Plommet, 1976). Εσωτερικά βρίσκεται ο περιπλασματικός χώρος. Στενά συνδεδεμένα με την κυτταροπλασματική μεμβράνη είναι συμπλέγματα πολυριβοσωμάτων. Το κυτταρόπλασμα περιέχει μικρά κενοτόπια και κοκκία που περιέχουν πολυσακχαρίδια (Dubray, 1972) καθώς και το χρωμοσωματικό υλικό.

3.2. Φυσιολογία

Άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης είναι 37°C, με εύρος 20-40°C (η βιωσιμότητα των καλλιεργειών πέφτει γρήγορα σε θερμοκρασίες πάνω από 45°C). Το άριστο pH είναι κοντά στο ουδέτερο (6,6-7,4). Πολλά στελέχη παράγουν αλκάλια κατά τον μεταβολισμό τους γι' αυτό είναι βασικό να χρησιμοποιούνται υλικά με καλά ρυθμισμένο pH μεταξύ 6,6 και 6,8 ώστε να εμποδισθεί η αναστολή της ανάπτυξης απ' την παραγωγή αλκάλιων (Corbel, 1998). Τα περισσότερα στελέχη είναι εξαιρετικά ανθεκτικά στα οξέα και μπορούν να επιβιώσουν μετά από έκθεση σε pH 4 για πάνω από 24 ώρες με μικρή επίδραση στη βιωσιμότητα και γενικά η *Brucella* είναι πολύ περισσότερο ανθεκτική σε σχέση με τα Εντεροβακτηριακά σε εξαιρετικά χαμηλό pH (pH 3,2) (O'Callaghan and MacMillan, 2002).

Σε υδάτινα εναιωρήματα μέτριας πυκνότητας καταστρέφονται με θέρμανση στους 60°C για 10 λεπτά αλλά σε πολύ πυκνά εναιωρήματα μπορούν να επιζήσουν πολύ υψηλότερων θερμοκρασιών (Swann et al, 1981). Τα καλλιεργήματα σε άγαρ, κρατημένα σφραγισμένα στους 4°C, γενικά επιζούν τουλάχιστον για ένα μήνα ενώ σε λυοφυλιοποιημένη μορφή επιζούν για δεκαετίες. Καταστρέφονται με την παστερίωση του γάλακτος και το ηλιακό φως. Σκοτώνονται ταχέως με την υπεριώδη και την ακτινοβολία γ. Η αιθανόλη, η ισοπροπανόλη, οι φαινόλες, το υποχλωριώδες, το οξείδιο του αιθυλενίου και η φορμαλδεΰδη είναι αποτελεσματικά απολυμαντικά (π.χ. σκοτώνονται με φαινόλη 1% σε 15 λεπτά) (Corbel, 1998).

3.3. Μεταβολισμός – Βιοχημικές ιδιότητες

Όλα τα στελέχη βρουκέλλας είναι αερόβια χρησιμοποιώντας το οξυγόνο σαν τελικό δέκτη ηλεκτρονίων στο σύστημα μεταφοράς ηλεκτρονίων του κυτοχρώματος. Δεν αναπτύσσονται σε αυστηρά αναερόβιο περιβάλλον αν και έχει αναφερθεί ότι τα νιτρικά μπορούν να αντικαταστήσουν το μοριακό οξυγόνο σε μερικές περιπτώσεις. Πολλά στελέχη *B. abortus* και σχεδόν όλα της *B. onis* χρειάζονται για την ανάπτυξη τους ατμόσφαιρα 5-10% CO₂ που χρησιμεύει σαν μεταβολίτης και δεν μειώνει απλά το pH ή την τάση οξυγόνου όπως έχουν αποδείξει μελέτες με ραδιοενεργά ισότοπα στις οποίες σημασμένο CO₂ ενσωματώνεται σε αλανίνη, γλυκίνη και πυριμιδίνες (Newton et al, 1954).

Αν και η παραγωγή οξέος από υδρογονάνθρακες μπορεί να καταδειχθεί κάτω από ορισμένες συνθήκες, ο μεταβολισμός τους είναι κατά κύριο λόγο οξειδωτικός και έχει σαν υποστρώματα υδρογονάνθρακες και πολυυδροξυλιακές αλκοόλες (Lindquist et al, 2007). Οι αλκοόλες αυτές καταβολίζονται μέσω του κύκλου των μονοφωσφορικών εξοζών και του τρικαρβοξυλικού οξέος. Έχουν την ικανότητα να χρησιμοποιούν μια σακχαριδική αλκοόλη, την ερυθριτόλη και μάλιστα κατά προτίμηση σε σχέση με τη γλυκόζη. Αυτό αφορά κυρίως στελέχη της *B. melitensis*, *B. abortus* και *B. suis*. Το γεγονός ότι ο πλακούντας των μηρυκαστικών περιέχει ερυθριτόλη σε υψηλές συγκεντρώσεις ίσως εξηγεί την προτίμηση τους γι' αυτό το όργανο. Θεωρητικά, ο καταβολισμός της ερυθριτόλης παράγει 27 μόρια ATP, με αποτέλεσμα να είναι καλύτερη πηγή άνθρακα για τη *Brucella* που χρησιμοποιεί τον μη αποδοτικό κύκλο των μονοφωσφορικών πεντοζών παρά τη γλυκόλυση για τον καταβολισμό της γύκόζης (Sperry and Robertson, 1975). Η *B. onis* δείχνει μικρή δραστηριότητα και για τα δύο υποστρώματα.

Είναι καταλάση θετικά και, εκτός από τη *B. onis*, τη *B. neotomae* και μερικά στελέχη *B. canis*, και οξειδάση θετικά. Τα περισσότερα στελέχη ανάγουν τα νιτρικά σε νιτρώδη και μερικά μπορεί επίσης να ανάγουν τα νιτρώδη σε αέριο, ειδικά ο βιότυπος 1 της *B. suis*. Παράγουν υδρόθειο από αμινοξέα που περιέχουν θείο και μάλιστα στελέχη της *B. abortus*, της *B. neotomae* και ο βιότυπος 1 της *B. suis* σε επαρκείς ποσότητες που βοηθούν στην ταυτοποίηση τους ενώ τα άλλα είδη σε μικρές ποσότητες ή καθόλου. Δίνουν αρνητικές τις δοκιμές παραγωγής ινδόλης από τρυπτοφάνη, τη Voges-Proskauer (VP-παραγωγή ακετυλομεθυλοκαρβινόλης από γλυκόζη), τη δοκιμή ερυθρού του μεθυλίου (methyl red-MR), χρησιμοποίησης κιτρικών και παραγωγής β-γαλακτοσιδάσης ή υδρόλυσης της ο-νιτρο-φαινυλ-γαλακτοπυρανοσιδής (o-Nitrophenyl-β-D-galactopyranoside-ONPG) (Corbel, 1998).

Ουρεάση παράγεται από τα περισσότερα στελέχη. Συγκεκριμένα η *B. canis* και η *B. suis* δίνουν κόκκινο χρώμα στο υλικό Christensen εντός 5 λεπτών (έντονη αντίδραση ουρεάσης). Στο άλλο άκρο, η *B. onis* παράγει ουρεάση ασθενώς και μερικά στελέχη μπορεί να δίνουν αρνητικές αντιδράσεις ακόμη και μετά από επώαση 7 ημερών. Η *B. abortus*, η *B. melitensis* και η *B. neotomae* συνήθως δίνουν θετικές αντιδράσεις μετά από μία ώρα ή περισσότερο. Ωστόσο, ποικίλλες αντιδράσεις παρατηρούνται μεταξύ των στελεχών και η δοκιμασία είναι περιορισμένης αξίας για την ταυτοποίηση των ειδών (Corbel and Henry, 1985).

3.4. Καλλιέργεια

Επειδή η *Brucella* έχει μικρότερο ρυθμό ανάπτυξης από πολλά βακτήρια που συναντάμε στο κλινικό εργαστήριο, μοιάζει περισσότερο απαιτητική απ' ό τι πραγματικά είναι. Εκτός από τις διαφορετικές απαιτήσεις σε CO₂ που αναφέρθηκαν στην προηγούμενη ενότητα, όλα τα μέλη του γένους *Brucella* ταιριάζουν στις καλλιεργητικές ιδιότητες. Στο θρεπτικό άγαρ, αναπτύσσονται αργά και με μικρές αποικίες. Αρκετά αμινοξέα, θειαμίνη, βιοτίνη, νικοτιναμίδιο, μαγνήσιο, σίδηρος και μαγγάνιο απαιτούνται για την ανάπτυξη ενώ έχει ήδη αναφερθεί η σημασία της ερυθριτόλης. Η ανάπτυξη ενισχύεται από την προσθήκη αίματος, ορού και ιστικού εκχυλίσματος. Αναπτύσσονται σε θρεπτικά υλικά πλούσια σε τρυπτικάση όπως είναι το TSA (Trypticase soya agar) αν και τα πιο απαιτητικά στελέχη της *B. onis*, του βιότυπου 2 της *B. abortus* καθώς και μερικά στελέχη των βιοτύπων 3 και 4 απαιτούν υλικά εμπλουτισμένα με αίμα ή ορό. Λιγότερο απαιτητικά στελέχη ειδικά της *B. melitensis* και *B. suis*, αναπτύσσονται σε υλικά με άλατα χολής όπως είναι το MacConkey άγαρ μετά από 48-72 h και με μικρές άχρωμες αποικίες. Στο αιματούχο άγαρ δεν προκαλούν πραγματική αιμόλυση αλλά αποχρωματισμό του υλικού γύρω από την αποικία (Corbel, 1998). Το *Brucella* άγαρ σχεδιάστηκε αρχικά για την απομόνωση της *Brucella* από γαλακτοκομικά προϊόντα. Το άγαρ αυτό με 5% αίμα αλόγου, μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν γενικής χρήσης υλικό για την απομόνωση τόσο αερόβιων απαιτητικών όσο και αναερόβιων μικροοργανισμών. Η θρεπτική βάση περιλαμβάνει μίγμα πεπτονών, μεταξύ των οποίων και πεπτονών κρέατος, δεξτρόζη και εκχύλισμα μυκήτων (Chapin KC and Lauderdale T, 2007).

Σε άγαρ δεξτρόζης με ορό ή σε παρόμοιο υλικό μετά από επώαση στους 37°C για 48 h, συνήθως θα δούμε αποικίες σε λεία (S-Smooth) μορφή δηλαδή κυρτές, κυκλικές, ημιδιαφανείς 0,5-1mm σε διάμετρο. Σε καλλιέργημα που παρέμεινε για περισσότερο από 4 ημέρες ή και μετά από ανακαλλιέργεια η μορφολογία των αποικιών καθώς και η

λοιμογονικότητα του στελέχους, οι αντιγονικές ιδιότητες και η ευαισθησία σε φάγους θα αλλάξουν. Οι αποικίες είναι λιγότερο κυρτές και περισσότερο θαμπές, αδιαφανείς με κιτρινόλευκη κοκκιώδη εμφάνιση (αποικίες σε τραχειά [R-Rough] μορφή). Οι βλεννώδεις αποικίες είναι διάφανες, γκρι ή ανεπαίσθητα πορτοκαλί και γλοιώδεις. Πρέπει να σημειωθεί ότι αποικίες απ' τις δύο τελευταίες μορφές αυτοσυγκολλώνται σε μη ρυθμισμένα αλατούχα διαλύματα και παρουσία ακριφλαβίνης. Η διάκριση μεταξύ S- και R-αποικιών μπορεί να αυξηθεί με χρώση π.χ. με αραιό διάλυμα κρυσταλλικού ιώδους 0,05%, κατά την οποία οι R- αποικίες χρωματίζονται ερυθροϊώδεις (Corbel, 1998).

Για την απομόνωση της *Brucella* από επιμολυσμένα υλικά μπορούν να χρησιμοποιηθούν εκλεκτικά υλικά που περιέχουν αμφοτερική Β, βακίτρακίνη, κυκλοεξιμίδη/ναταμυκίνη, d-κυκλοσερίνη, ναλιδιξικό οξύ, πολυμυξίνη Β και βανκομυκίνη. Αυτό το μείγμα αντιβιοτικών είναι κατάλληλο για την απομόνωση των περισσότερων στελεχών *B. abortus*, *B. melitensis* και *B. suis*, αλλά μπορεί να είναι ανασταλτικό για στελέχη *B. abortus* των βιοτύπων 2,3 και 4 και μερικών στελεχών *B. melitensis*, *B. onis* και *B. canis*. Για την αποφυγή ανασταλτικής επίδρασης, μπορεί να χρησιμοποιηθεί μείγμα βανκομυκίνης, κολιστιμεθανικού νατρίου, νιτροφουραντοΐνης και νυστατίνης (Dahook, 2003). Εκλεκτικά υλικά για την απομόνωση της *Neisseria gonorrhoeae*, όπως το Martin-Lewis ή το Tayer-Martin άγαρ είναι κατάλληλα και για την απομόνωση Βρουκέλλας (Lindquist et al, 2007). Καλή ανάπτυξη μπορεί να επιτευχθεί και σε BCYE άγαρ (Buffered Charcoal Yeast Extract) που χρησιμοποιείται για την απομόνωση της *Legionella spp.* (Raad et al, 1990).

Το τροποποιημένο εκλεκτικό για *Brucella* (modified *Brucella* selective-MBS) υλικό, που περιέχει βελτιωμένο μείγμα αντιβιοτικών, ερυθριτόλη σαν μόνη πηγή άνθρακα και ουδέτερο ερυθρό σαν δείκτη pH, έχει καλή εκλεκτική ικανότητα απομόνωσης στελεχών *B. abortus*, συμπεριλαμβανομένου και του στελέχους του εμβολίου RB51. Οι αποικίες της *Brucella* με ρόδινο χρώμα στο κέντρο τους, διακρίνονται εύκολα απ' αυτές των άλλων μικροοργανισμών. Έτσι το υλικό αυτό μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την απομόνωση στελεχών *Brucella* και από επιμολυσμένα δείγματα καθώς και από δείγματα που περιέχουν μικρό αριθμό βιώσιμων μικροοργανισμών. Επιπλέον, με την εφαρμογή του στον έλεγχο περιβαλλοντικών δειγμάτων είναι χρήσιμο σε επιδημιολογικές έρευνες που στόχο έχουν την εξακρίβωση της πηγής διασποράς της νόσου (Her et al, 2010).

Οι *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis* και *B. canis* αναπτύσσονται στη χοριοαλλαντοϊκή μεμβράνη εμβρύου όρνιθας όπου πολλαπλασιάζονται και προκαλούν θάνατο του εμβρύου σε λίγες μέρες με βλάβες στο σπλήνα και στο συκώτι.

3.4.1. Καλλιέργεια παρουσία χρωστικών

Ο Huddleson το 1929 επινόησε μια μέθοδο για τη διάκριση μεταξύ *B. abortus*, *B. melitensis*, και *B. suis* με βάση τη διαφορετική επιδεκτικότητα τους στην αναστολή από ορισμένες συνθετικές χρωστικές με βακτηριοστατική επίδραση. Η μέθοδος αυτή όμως δεν βοηθά στον απόλυτο διαχωρισμό των ειδών αυτών γιατί η ευαισθησία ποικίλει μεταξύ των βιοτύπων, ειδικά όσον αφορά τη *B. abortus*. Οι πιο χρήσιμες χρωστικές είναι η βασική φουξίνη και η θειονίνη που ενσωματώνονται σ' ένα κατάλληλο βασικό υλικό όπως το άγαρ δεξτρόζης με ορό σε τελική συγκέντρωση 20 µg/ml. Τα αποτελέσματα της μεθόδου αυτής καθώς και οι βιοχημικές και καλλιεργητικές διαφορές που παρατηρούνται μεταξύ των διαφόρων ειδών και βιοτύπων της *Brucella* συνοψίζονται στον πίνακα 2.

Όσον αφορά τη δοκιμή ευαισθησίας στις χρωστικές έχουν παρατηρηθεί διαφοροποιήσεις όπως στην περίπτωση στελεχών του βιότυπου 1 της *B. suis* από τη Βόρεια Αμερική που συχνά είναι ανθεκτικά στη βασική φουξίνη. Δύο άλλες χρήσιμες χρωστικές είναι η μπλε θειονίνη και η σαφρανίνη Ο. Η μπλε θειονίνη σε συγκέντρωση 2 mg/L επιτρέπει την ανάπτυξη των 3 κύριων ειδών αλλά αναστέλλει το εξασθενημένο στέλεχος εμβολίου *B. abortus* S19 και τον βιότυπο 2 της *B. abortus*. Η σαφρανίνη Ο σε συγκέντρωση 100-200 mg/L αναστέλλει τη *B. suis* αλλά, με λίγες εξαιρέσεις, όχι άλλα στελέχη *Brucella* (Corbel, 1998).

Η ευαισθησία στις χρωστικές βασίζεται μοριακά στην έκφραση συγκεκριμένων πορινών (πρωτεϊνών της εξωτερικής μεμβράνης 36 kDa) (Douglas et al, 1984). Τα αντίστοιχα γονίδια έχουν κλωνοποιηθεί και είναι πολυμορφικά (Fight et al, 1989). Στη *B. abortus* υπάρχουν 2 ποικιλίες του γονιδίου της πορίνης, το omp2a και το omp2b. Μόνο το τελευταίο εκφράζεται κάτω από φυσιολογικές καλλιεργητικές συνθήκες.

Πίνακας 2: Διαχωριστικές ιδιότητες των ειδών και βιοτύπων της *Brucella*

Είδη	Βιότυπος	Συγκόλληση με μονοειδικό αντιγόνο			Ανάγκη CO ₂	Παραγωγή H ₂ S	Υδρόλυση ουρίας	Ανάπτυξη παρουσία 1/50.000 (20 µg/ml)	
		A	M	R				θειονίνη	Βασική φουξίνη
<i>B.melitensis</i>	1	-	+	-	-	-	ποικίλη	+	+
	2	+	-	-	-	-	ποικίλη	+	+
	3	+	+	-	-	-	ποικίλη	+	+
<i>B.abortus</i>	1	+	-	-	(+) ¹	+	1 – 2 h	-	+
	2	+	-	-	(+)	+	1 – 2 h	-	-
	3	+	-	-	(+)	+	1 – 2 h	+ ²	+
	4	-	+	-	(+)	+	1 – 2 h	-	(+)
	5	-	+	-	-	-	1 – 2 h	+	+
	6	+	-	-	-	-	1 – 2 h	+ ²	+
<i>B.suis</i>	9	-	+	-	-	+	1 – 2 h	+	+
	1	+	-	-	-	+	0– 30 min	+	(-)
	2	+	-	-	-	-	0– 30 min	+	-
	3	+	-	-	-	-	0– 30 min	+	+
	4	+	+	-	-	-	0– 30 min	+	(-)
	5	-	+	-	-	-	0– 30 min	+	-
<i>B.canis</i>		-	-	+	-	-	0– 30 min	+	(-)
<i>B.ovis</i>		-	-	+	+	-	-	+	(-)
<i>B.neotomae</i>		+	-	-	-	+	0– 30 min	-	-
<i>B."maris"</i>		+	+ή+	-	+ ή -	-	ποικίλη	+	+

1. (+): τα περισσότερα στελέχη θετικά

(-): τα περισσότερα στελέχη αρνητικά

2. Ο βιότυπος 3 της *B. abortus* αναπτύσσεται παρουσία 1/.25.000 θειονίνη, ενώ ο βιότυπος 6 όχι

3.5. Αντιγονική δομή

3.5.1. Επιφανειακά αντιγόνα

Αντιγόνα λιποπολυσακχαριδίου (Lipopolysaccharide-LPS)

Όπως και στα άλλα Gram-αρνητικά βακτήρια το LPS είναι βασικό συστατικό της εξωτερικής μεμβράνης αποτελούμενο από τρία μέρη:

Το λιπίδιο A, ένα υδρόφοβο λιπιδικό μόριο που αποτελεί το τοξικό μέρος, ο πολυσακχαριδικός πυρήνας που συμβάλλει στη μη διαπερατότητα της εξωτερικής μεμβράνης και η πλευρική πολυσακχαριδική αλυσίδα που αποτελεί το σωματικό O-αντιγόνο μιας και συνίσταται από επαναλαμβανόμενα ολιγοσακχαρίδια, συχνά με

μεγάλη ποικιλία ακόμη και μεταξύ στελεχών του ίδιου είδους. Η δομή του λιπιδίου A της *Brucella* διαφέρει απ' αυτή των Εντεροβακτηριακών. Περιέχει διαμινογλυκόζη επιπρόσθετα με τη γλυκοζαμίνη ενώ δεν περιέχει αιθανολαμίνη, ουδέτερα σάκχαρα και φώσφορο. Ο πολυσακχαριδικός πυρήνας επίσης διαφέρει έχοντας σαν κύρια συστατικά γλυκόζη, μανόζη και 2-αμινο-2,6-διδεοξυ-D-γλυκόζη ενώ απουσιάζουν οι επτόζες (O 'Callaghan and MacMillan, 2002).

Η αντιγονική σύνθεση της επιφάνειας του κυττάρου της *Brucella* εξαρτάται από τη φάση της αποικίας και την αντίστοιχη φαινοτυπική μορφή: λεία (S-LPS) και τραχειά (R-LPS). Το S-LPS βρίσκεται στα περισσότερα άγρια στελέχη των περισσότερων ειδών και βιοτύπων, ενώ το R-LPS στα είδη *B. canis* και *B. onis*. Το S-LPS περιέχει 2 κύριους αντιγονικούς καθοριστές αποκαλούμενους A (για την 'Abortus') και M (για την 'Melitensis') (Bundle et al, 1992). Οι πλευρικές πολυσακχαριδικές αλυσίδες του S-LPS αποτελούνται από ομοπολυμερή 4,6-διδεοξυ-4-φορμαμιδο-D-μανόζης. Στη *B. abortus* η O-αλυσίδα περιέχει περίπου 100 μόρια 4,6-διδεοξυ-4-φορμαμιδο-D-μανόζης σχεδόν όλα συνδεδεμένα με α-1,2 γλυκοσιδικούς δεσμούς και με μικρό ποσοστό α-1,3 γλυκοσιδικών δεσμών (A καθοριστές). Στη *B. melitensis* οι δεσμοί α-1,2 και α-1,3 εμφανίζονται σε αναλογία 4:1. Η διαφορά στη σύνδεση επηρεάζει το σχήμα των επιτόπων του LPS. Το A αντιγόνο έχει σχήμα ραβδίου λόγω των 5 συνεχών α-1,2 συνδεδεμένων μορίων, ενώ το M αντιγόνο είναι κεκαμένο γιατί το τέταρτο μόριο συνδέεται με το πέμπτο με α-1,3 δεσμό. Η κοινή παρουσία μη τελικών τετρασακχαριδικών μονάδων α-1,2 συνδεδεμένων 4,6-διδεοξυ-4-φορμαμιδο-D-μανόζης εξηγεί τις διασταυρούμενες αντιδράσεις που παρατηρούνται μεταξύ όλων των στελεχών σε S-φάση. Οι ειδικοί επίτοποι A και M υπάρχουν ως μειοψηφία και στους 2 τύπους του LPS. Στην περίπτωση *B. abortus* βιότυπου 1, οι O-αλυσίδες περιέχουν κυρίως A επιτόπους με μικρή αναλογία M επιτόπων λόγω των λίγων α-1,3 συνδεδεμένων μορίων ενώ στην περίπτωση *B. melitensis* βιότυπου 1 ισχύει το αντίθετο.

Συγκολλητινοαντίδραση σε πλάκα ή ενζυμοαναστολογική μέθοδος (Enzyme immunoassay-EIA) με τη βοήθεια μονοκλωνικών ή πολυκλωνικών αντισωμάτων ειδικών για τους A και M επιτόπους, χρησιμοποιούνται για τον καθορισμό της επικράτησης του A ή του M αντιγόνου συμβάλλοντας έτσι στο διαχωρισμό των στελεχών σε βιοτύπους (Bundle et al, 1992). Η παρουσία της 4,6-διδεοξυ-4-φορμαμιδο-D-μανόζης στο LPS είναι επίσης υπεύθυνη για διασταυρούμενες αντιδράσεις με την *Yersinia enterocolitica* O:9 και πιο σπάνια με τα βακτήρια: *Francisella tularensis*, *Vibrio cholerae* O:1, *Escherichia hermannii*, *E. coli* O:157 και *Salmonella* O:30 (Ko et al, 2003).

Η δομή του R-LPS είναι βασικά ίδια μ' αυτή του S-LPS εκτός του ότι η Ο-αλυσίδα είναι είτε απύσα ή περιορίζεται σε λίγα μόρια. Η ειδικότητα του R-LPS καθορίζεται κατά κύριο λόγο από τον πολυσακχαριδικό πυρήνα με τα μόρια γλυκόζης και μανόζης να είναι οι κύριοι καθοριστές. Διασταυρούμενες αντιδράσεις έχουν αναφερθεί μεταξύ R-στελεχών και *Actinobacillus equuli*, *Pasteurella multocida* και βλενωδών στελεχών *Pseudomonas aeruginosa* (Corbel, 1998).

Το S-LPS δεν αποτελεί μόνο το κυρίαρχο αντίγονο αλλά είναι και ο κύριος παράγοντας παθογόνου δράσης. Έχει δράση ενδοτοξίνης (λιπίδιο A) αλλά λόγω των δομικών διαφορών που αναφέρθηκαν είναι λιγότερο τοξικό απ' το αντίστοιχο των Εντεροβακτηριακών και επίσης δεν συνδέει κατιονικά πεπτίδια, όπως η πολυμυξίνη, με αποτέλεσμα ανοχή σε αυτά.

Άλλα πολυσακχαριδικά αντιγόνα

Η *Brucella* παράγει κυκλική β(1-2) γλυκάνη, ένα πολυσακχαρίδιο χαμηλού μοριακού βάρους, γνωστό και ως πολυσακχαρίδιο B, που παράγεται επίσης και από τα είδη *Agrobacterium* και *Rhizobium*, άλλα δύο μέλη των α-proteobacteria. Η σύνθεση της εξαρτάται από μια συνθετάση της εσωτερικής μεμβράνης. Μεταλλάξεις στο αντίστοιχο γονίδιο προκαλούν μειωμένη λοιμογόνο ικανότητα στα ποντίκια (O Callaghan and MacMillan, 2002). Είναι μη αντιγονική κυκλική D-γλυκόζη που σχηματίζει συμπλέγματα με το LPS.

Πρωτεΐνες της εξωτερικής μεμβράνης

Χωρίζονται σε 3 κύριες ομάδες: Η ομάδα 1 περιλαμβάνει 88-94 kDa υψηλού μοριακού βάρους πρωτεΐνες. Η ομάδα 2 αποτελείται από τις πορίνες με μοριακό βάρος 43 kDa και 36-38 kDa. Η ομάδα 3 περιλαμβάνει πρωτεΐνες 25-27 kDa καθώς και μικρές πρωτεΐνες 15-31 kDa. Μια λιποπρωτεΐνη 8 kDa συνδέεται επίσης με την πεπτιδογλυκάνη. Οι πρωτεΐνες αυτές υπάρχουν σ' όλα τα είδη με ποσοτικές διαφορές. Επιπρόσθετα η *B. melitensis* περιέχει δύο άλλες πρωτεΐνες με MB 31 kDa και 39-40 kDa. Σ' όλα τα στελέχη οι πορίνες της ομάδας 2 είναι οι αφθονότερες. Δύο γονίδια, τα *omp2a* και *omp2b*, που είναι ομόλογα σε ποσοστό >85% κωδικοποιούν τις πορίνες 36 kDa που πλέον ονομάζονται *Omp2a* και *Omp2b* αντίστοιχα (Cloeckaert et al, 1996). Ο προστατευτικός τους ρόλος αφορά κυρίως αντιδράσεις κυτταρικής ανοσίας μιας και μονοκλωνικά και πολυκλωνικά αντισώματα έδειξαν χαμηλή δραστηριότητα απουσία αντισωμάτων στο S-LPS.

3.5.2. Ενδοκυττάρια αντιγόνα

Πρόκειται για πρωτεΐνες, γλυκοπεπτίδια και πεπτίδια που απελευθερώνονται κατά τη ρήξη των κυττάρων της *Brucella*. Διαγνωστικές δοκιμασίες βασιζόμενες σε τέτοια αντιγόνα είχαν χαμηλή ευαισθησία μιας και η ανοσογόνο δράση τους είναι πολύ μικρότερη αυτής του LPS. Το ενδιαφέρον αναζωπυρώθηκε με ριβοσωμικές πρωτεΐνες. Οι L7/L12 ριβοσωμιακές πρωτεΐνες διεγείρουν αντιδράσεις κυτταρικής ανοσίας. Προκαλούν αντιδράσεις επιβραδυνόμενης υπερευαισθησίας ως συστατικά της βρουκελλίνης (Bachrach et al, 1994).

3.6. Γονιδιακή δομή

Το γενετικό υλικό της *Brucella* αποτελείται από δύο κυκλικά χρωμοσώματα μεγέθους περίπου 2,1 και 1,2 Mb με ποσοστό G+C 58-59%. Το ποσοστό αυτό είναι αρκετά διαφορετικό από τα αντίστοιχα των ειδών *Bordetella bronchiseptica* και *Francisella tularensis* που είχαν αρχικά ταξινομηθεί ως είδη *Brucella* ενώ είναι ταυτόσημο με του *Ochrobactrum anthropi* και πολύ κοντά στα ποσοστά των *Agrobacterium*, *Rhizobium* και *Phylobacterium* (Corbel, 1998). Σε αντίθεση με το μεγαλύτερο χρωμόσωμα I, το μικρότερο χρωμόσωμα II έχει περιοχή έναρξης αντιγραφής και γενετικό περιεχόμενο που προτείνουν αρχική προέλευση από μεγαπλασμίδιο. Καθώς όμως κάθε χρωμόσωμα κωδικοποιεί λειτουργίες βασικές για τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση του μικροοργανισμού ταξινομούνται ως χρωμοσώματα και όχι ως πλασμίδια.

Αρχικά τα δύο κυκλικά χρωμοσώματα βρέθηκαν στο στέλεχος 16M της *B. melitensis* (Michaux et al., 1993), αλλά γρήγορα η γνώση αυτή εξαπλώθηκε σε τυπικά στελέχη όλων των κύριων ειδών με εξαίρεση το βιότυπο 3 της *B. suis* που περιέχει ένα κυκλικό χρωμόσωμα μεγέθους 3,3 Mb (Paulsen et al., 2002) αλλά με γενετικό περιεχόμενο παρόμοιο με αυτό των άλλων ειδών καθώς η ομολογία στο DNA μεταξύ των ειδών είναι >95%. Ειδικότερα στο στέλεχος 16M (βιότυπου 1, ATCC 23456) της *B. melitensis* το μέγεθος του γενώματος είναι 3,29 Mb και κατανέμεται σε δύο κυκλικά χρωμοσώματα μεγέθους 2,12 και 1,18 Mb αντίστοιχα (DelVecchio et al., 2002) με προσδιορισμένη την πλήρη νουκλεοτιδική αλληλουχία. Γονίδια που κωδικοποιούν την αντιγραφή του DNA, σύνθεση πρωτεϊνών, το μεταβολισμό του πυρήνα και τη βιοσύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος βρέθηκαν και στα δύο χρωμοσώματα.

Η αλληλουχία του γενώματος του στελέχους 1330 (σταθερό στέλεχος αναφοράς για τον βιότυπο 1 της *B. suis*) είναι επίσης γνωστή.

Αποτελείται από δύο κυκλικά χρωμοσώματα μεγέθους 2.107.792 bp και 1.207.381 bp αντίστοιχα (Paulsen et al., 2002) ενώ έχει ήδη αναφερθεί η εξαίρεση του βιότυπου 3. Οι βιότυποι 2 και 4 έχουν επίσης δύο κυκλικά χρωμοσώματα μεγέθους 1,85 και 1,35 Mb αντίστοιχα. Έχει προταθεί ότι τα διαφορετικά στελέχη *Brucella* εξελίχθηκαν από ένα πρόγονο με ένα κυκλικό χρωμόσωμα, δομή αντίστοιχη με του βιότυπου 3 (Jumas-Bilak et al, 1998).

Με την ολοκλήρωση του προσδιορισμού της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του γενώματος του στελέχους 9-941 της *B.abortus* (Halling et al, 2005) και τη σύγκριση με τις αντίστοιχες των *B. melitensis* και *B. suis* καταδείχθηκε ότι το περιεχόμενο και η οργάνωση του γενώματος είναι σε μεγάλο βαθμό διατηρημένα μεταξύ των ειδών και έχει ομοιότητες με τους συμβιώντες οργανισμούς των φυτών *Mesorhizobium loti* και *Sinorhizobium meliloti* καθώς και με το παθογόνο *Agrobacterium tumefaciens*. Το χρωμόσωμα I της *Brucella* περιέχει περίπου 2,100 με 2,200 ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης (open reading frames, ORFs) ενώ το χρωμόσωμα II 1,100 με 1,200 αντίστοιχα. Μεταξύ των τριών γνωστών νουκλεοτιδικών αλληλουχιών στελεχών *Brucella*, η μεγάλη πλειοψηφία των ORFs μοιράζεται ταυτότητα αλληλουχίας μεγαλύτερη από 99%. Ωστόσο, με συγκριτικές γενετικές μελέτες, ένας περιορισμένος αριθμός ειδικών για τα είδη ORFs καθώς και ποικίλων ORFs, σημαντικός αριθμός των οποίων κωδικοποιεί πρωτεΐνες επιφάνειας, έχει ταυτοποιηθεί (Halling et al, 2005).

Η σύγκριση των γενωμάτων κατέδειξε επίσης ότι η πλειοψηφία (>90%) των γονιδίων των *B. melitensis* και *B. suis* είναι σε ποσοστό 98-100% ταυτόσημα σε επίπεδο νουκλεοτιδίων. Τα περισσότερα ποικίλα γονίδια (<95% ταυτότητα) ίσως να συμβάλλουν σημαντικά στις διαφορές στην παθογένεια και στους διαφορετικούς φυσικούς ξενιστές μεταξύ των δύο ειδών. Είναι αξιοσημείωτο ότι μόνο 32 γονίδια της *B. melitensis* απουσιάζουν πλήρως από το γενετικό υλικό της *B. suis* ενώ μόνο 42 γονίδια της *B. suis* από το γενετικό υλικό της *B. melitensis* αντίστοιχα (Paulsen et al, 2002).

Ανάλυση με περιοριστικές ενδονουκλεάσες κατέδειξε πολυμορφικά γονίδια όπως το γονίδιο omp 2 που κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη της εξωτερικής μεμβράνης 36 kDa υπεύθυνη για την ευαισθησία στις χρωστικές (Fight et al, 1988). Η διαγραφή ενός τμήματος 7,2 kbp στο γονίδιο του γονιδίου ery στο στέλεχος 19 της *B. abortus* μπορεί να εξηγήσει την ευαισθησία του στην ερυθριτόλη που είναι σημαντικός παράγοντας της εξασθένησης του (Sangari et al, 1994).

Λεπτομερής εξέταση του γενώματος για κλασσικούς λοιμογόνους παράγοντες όπως κάψα, ινίδια και τοξίνες είχε σαν αποτέλεσμα αξιοσημείωτη απουσία αντίστοιχων γονιδίων (Delguc et al., 2004). Αντίθετα ταυτοποιήθηκαν γονίδια που κωδικοποιούν υποτιθέμενα

συστατικά βλεφαρίδων. Μιας και η *Brucella* είναι ακίνητη το αν αυτά τα γονίδια είναι λειτουργικά και εκφράζονται είναι αντικείμενο έντονης συζήτησης. Πιθανά να έχουν κάποιο ρόλο in vivo που μένει να αποσαφηνισθεί (Cutler et al, 2005).

3.6.1. Πλασμίδια και ανταλλαγή γενετικού υλικού

Φυσικά(λυτικά) πλασμίδια δεν έχουν ανχνευθεί στη *Brucella*. Παρόμοια, δεν έχει αναφερθεί σύζευξη ή μεταμόρφωση από χρωμοσωμικό DNA. Αυτή η σχετική έλλειψη στοιχείων για ανταλλαγή γενετικού υλικού μεταξύ των βρουκελλών μπορεί να είναι αποτέλεσμα της προτίμησής τους να παραμένουν προστατευμένες στη φωλιά τους εντός των κυττάρων, συνεπώς να τυγχάνουν μειωμένων ευκαιριών (Cutler et al., 2005). Ωστόσο, μεταφορά με σύζευξη του πλασμιδίου R751 από την *E. coli* στη *Brucella* και μεταξύ των ειδών *Brucella* έχει καταδειχθεί, με αποτέλεσμα αντοχή στην τριμεθοπριμη (Vergier et al., 1993). Μεταβίβαση αντοχής στην τετρακυκλίνη μέσω πλασμιδίου προερχόμενου επίσης από την *E. coli* έχει επίσης αναφερθεί (Rigby and Fraser, 1989). Η μεταγωγή αντοχής στα αντιβιοτικά μέσω φάγων απομονωμένων από άτυπα στελέχη *Brucella* έχει επίσης περιγραφεί (Corbel, 1998).

3.6.2. Φάγοι

Αν και η ύπαρξη βακτηριοσινών ειδικών για τη *Brucella* δεν έχει επιβεβαιωθεί, έχουν απομονωθεί αρκετοί λυτικοί φάγοι. Πρόκειται για στενά σχετιζόμενους DNA φάγους της ίδιας μορφολογικής ομάδας (Pedoviridae). Έχουν ταξινομηθεί σε 6 ομάδες με βάση τους αντίστοιχους ξενιστές: 1=Tbilisi (Tb), 2=Firenze(Fi75/13), 3=Weybridge (Wb), 4=Berkeley (BK2), 5=R(rough) και 6=Izatnagar (Iz) (Corbel,). Η λυτική δραστηριότητα των τεσσάρων πρώτων ομάδων συνοψίζεται στον Πίνακα 3. Οι φάγοι R (R/O και R/C) είναι λυτικοί για rough στελέχη *B. abortus*, *B. ovis* ή *B. canis* (Corbel and Thomas, 1985). Οι φάγοι της έκτης ομάδας είναι λυτικοί για smooth καλλιέργειες όλων των ειδών και για rough καλλιέργειες κυρίως των *B. melitensis* και *B. suis*. Έχει προταθεί και μια έβδομη ομάδα, οι φάγοι Nepean (Np) που μοιάζουν με την πρώτη ομάδα ως προς τους ξενιστές (Corbel, 1998).

Πίνακας 3: Λύση παρουσία φάγου σε RTD⁴

Είδη	Βιότυπος	Tb (Tbilisi)	Bk2 (Berkeley)	Wb (Waybridge)	Fi (Firenze)
<i>B. melitensis</i>	1	ΟΛ ³	Λ	ΟΛ	ΟΛ
	2	ΟΛ	Λ	ΟΛ	ΟΛ
	3	ΟΛ	Λ	ΟΛ	ΟΛ
<i>B. abortus</i>	1	Λ	Λ	Λ	Λ
	2	Λ	Λ	Λ	Λ
	3	Λ	Λ	Λ	Λ
	4	Λ	Λ	Λ	Λ
	5	Λ	Λ	Λ	Λ
	6	Λ	Λ	Λ	Λ
	7	Λ	Λ	Λ	Λ
	8	Λ	Λ	Λ	Λ
	9	Λ	Λ	Λ	Λ
<i>B. suis</i>	1	ΟΛ	Λ	Λ	ΜΛ
	2	ΟΛ	Λ	Λ	ΜΛ
	3	ΟΛ	Λ	Λ	ΜΛ
	4	ΟΛ	Λ	Λ	ΜΛ
	5	ΟΛ	Λ	Λ	ΜΛ
<i>B. canis</i>		ΟΛ	ΟΛ	ΟΛ	ΟΛ
<i>B. ovis</i>		ΟΛ	ΟΛ	ΟΛ	ΟΛ
<i>B. neotomae</i>		ΜΛ	Λ	Λ	Λ

4. RTD: Routine test dilution

3. ΟΛ: ΟΧΙ Λύση Λ: Λύση

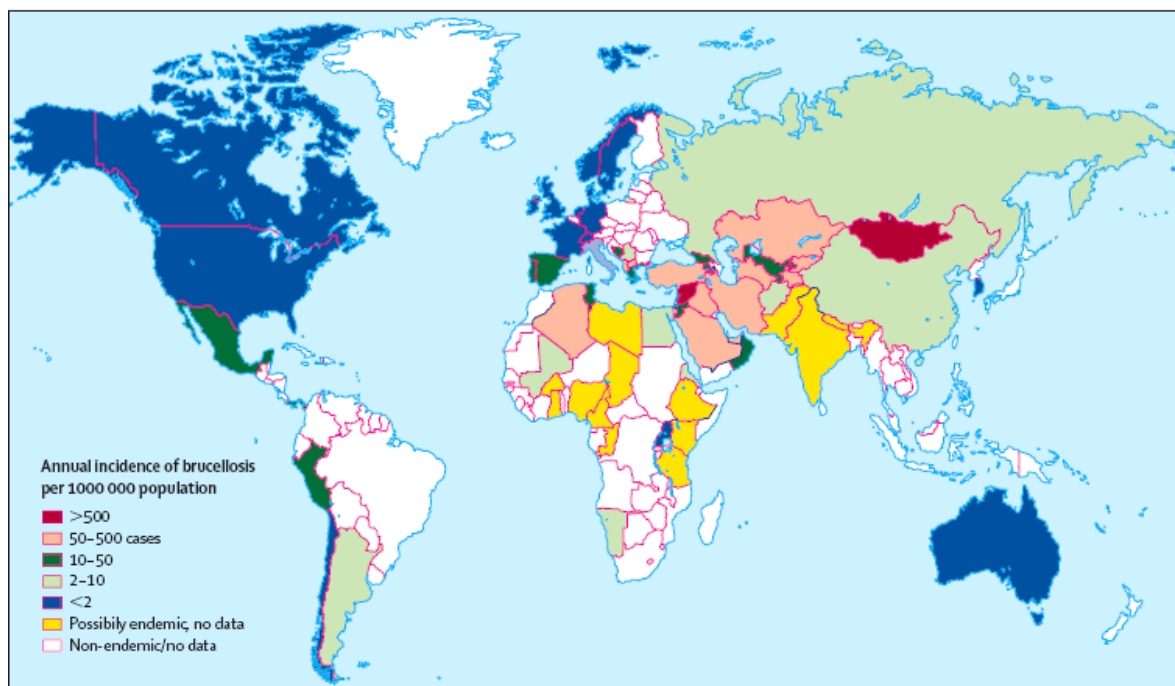
ΜΛ: Μερική Λύση

4. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ-ΟΙΚΟΛΟΓΙΑ

4.1. Γεωγραφική κατανομή-Επιδημιολογικά χαρακτηριστικά

Η βρουκέλλωση είναι η συνηθέστερη ζωνόσος παγκοσμίως με πάνω από 500.000 νέες περιπτώσεις ετησίως (Cutler and Whatmore, 2005; Surucuoglu et al, 2009)). Η κλασική αντίληψη σχετικά με την επιδημιολογία της νόσου είναι ότι αυτή παραμένει ενδημική σε χώρες της Μέσης Ανατολής, της Ανατολικής Ασίας, της υπο-Σαχάριας Αφρικής, της Νοτίου Αμερικής, καθώς και σε χώρες γύρω από τη λεκάνη της Μεσογείου (Young, 1995). Όμως, τα τελευταία 15 χρόνια, κοινωνικοοικονομικές παράμετροι, βελτίωση των συστημάτων

καταγραφής, εφαρμογή μεγάλων προγραμμάτων εξάλειψης της νόσου στα ζώα, καθώς και το φαινόμενο της παγκοσμιοποίησης, τόσο στη διακίνηση ζώων και τροφίμων, όσο και στη μετακίνηση ανθρώπων (διεθνής τουρισμός) (Mernish and Balkhy, 2004), έχουν οδηγήσει σε αλλαγές του «παγκόσμιου χάρτη» της βρουκέλλωσης στον άνθρωπο



Εικόνα 1: Παγκόσμια ετήσια επίπτωση ανθρώπινης βρουκέλλωσης ανά εκατομμύριο πληθυσμού (από Pappas et al, 2006a).

Μόνο 17 χώρες ισχυρίζονται ότι έχουν εξαλείψει τη νόσο όπως αρκετές χώρες της Β. Ευρώπης μεταξύ των οποίων και το Ηνωμένο Βασίλειο (Cutler and Whatmore, 2005). Στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής (ΗΠΑ) η επιτυχής εφαρμογή των προγραμμάτων εκρίζωσης της βρουκέλλωσης στο ζωικό κεφάλαιο έχει μειώσει την επίπτωση σε λιγότερες από 0,5 περιπτώσεις ανά 100.000 πληθυσμό (Young, 2005). Για την περίοδο 1993-2002 1.056 περιπτώσεις καταγράφηκαν εκ των οποίων πάνω από τις μισές προέρχονταν από το Τέξας και την Καλιφόρνια. Το 2002 παρατηρήθηκε μια μικρή μείωση. Οι περισσότερες περιπτώσεις οφείλονται στη *B. melitensis*. Στις βόρειες πολιτείες πιθανά αντιπροσωπεύουν εισαγόμενη νόσο λόγω διεθνούς τουρισμού ή κατανάλωσης μολυσμένων τροφίμων εισαχθέντων από ενδημικές περιοχές. Αυτό δεν ισχύει για τις νοτιοδυτικές κεντρικές, ορεινές και τις πολιτείες του Ειρηνικού όπου παρουσιάζεται η πραγματική εικόνα της βρουκέλλωσης στις ΗΠΑ σήμερα: νόσος προκαλούμενη από *B. melitensis*, που προσβάλλει τον ισπανικό πληθυσμό, και εντοπίζεται σε

περιοχές που γειτνιάζουν με το Μεξικό (Doyle and Bryan, 2000; Fosgate et al, 2002), απ' όπου εισάγεται μέσω μολυσμένων γαλακτοκομικών προϊόντων, ειδικά μεξικάνικου μαλακού τυριού.

Από τις χώρες της Λατινικής Αμερικής το Μεξικό παραμένει μια από τις πιο σημαντικές δεξαμενές ανθρώπινης βρουκέλλωσης με 3008 καταγεγραμμένα περιστατικά το 2003 (Pappas et al, 2006a). Η Νότιος Αμερική παραδοσιακά θεωρείται ενδημική περιοχή με επικρατούσα τη *B. melitensis* στο Περού και τη Δυτική Αργεντινή και τη *B. abortus* στην Ανατολική Αργεντινή και τις υπόλοιπες χώρες (Trujillo and Zavala, 1994; Samartino, 2002). Με εξαίρεση το Περού και την Αργεντινή, η Νότιος Αμερική πρέπει να εξαιρεθεί από τις υψηλά ενδημικές περιοχές παγκοσμίως.

Από τις χώρες της Ερωπαϊκής Ένωσης ως ελεύθερες βρουκέλλωσης (officially brucellosis free, OBF) έχουν κατοχυρωθεί οι εξής χώρες: Σουηδία, Δανία, Φινλανδία, Γερμανία, Ηνωμένο Βασίλειο (με εξαίρεση τη Β. Ιρλανδία), Αυστρία, Ολλανδία, Βέλγιο, Λουξεμβούργο, Νορβηγία και Ελβετία (Pappas et al, 2006a) και οι περισσότερες των χωρών αυτών αναφέρουν ένα μικρό αριθμό περιπτώσεων ετησίως, κυρίως σε ταξιδιώτες σε ενδημικές περιοχές ή σε μετανάστες από ενδημικές περιοχές (Eriksen et al, 2002). Από τις χώρες της λεκάνης της Μεσογείου η Γαλλία είναι ένα παράδειγμα επιτυχούς εξάλειψης με μόνο 44 περιπτώσεις το 2000 και με χαμηλό ετήσιο αριθμό τα επόμενα χρόνια που αφορά κυρίως τοπικές εξάρσεις στις νότιες επαρχίες, σχετιζόμενες με την κατανάλωση γαλακτοκομικών προϊόντων εισαγόμενων από Ισπανία (Pappas et al, 2006a).

Αν και μαζικά προγράμματα έχουν επιτύχει τη μείωση της νόσου στην Ισπανία, η χώρα έχει ακόμη μια από τις υψηλότερες ετήσιες επιπτώσεις στην Ευρώπη με 642 περιπτώσεις το 2003 (αριθμός που αντιπροσωπεύει ουσιαστική και συνεχή μείωση στην ετήσια επίπτωση για την περίοδο 1997-2003) και παραμένει ενδημική περιοχή. Η Πορτογαλία έχει επιτύχει σημαντική πρόοδο στον περιορισμό της ανθρώπινης βρουκέλλωσης με μείωση στην ετήσια επίπτωση από 70 περιπτώσεις ανά εκατομμύριο το 1999 σε λιγότερες από 14 το 2003. Ωστόσο, η ετήσια επίπτωση παραμένει υψηλή στις νότιες περιοχές που γειτνιάζουν με την ενδημική περιοχή Extremadura της Ισπανίας. Στην γειτονική μας Ιταλία η νόσος έχει ταξιδέψει τα τελευταία χρόνια στο νότο λόγω κοινωνικοοικονομικών παραγόντων με 488(93,2%) από τις 520 περιπτώσεις που καταγράφηκαν το 2003 να προέρχονται από νότιες περιοχές (Pappas et al, 2006a).

Η Ελλάδα παραμένει στη λίστα των 25 χωρών με την υψηλότερη επίπτωση παγκοσμίως. Από το 1981 έως το 1992, παρατηρήθηκε σημαντική μείωση στις αναφερόμενες περιπτώσεις ανθρώπινης βρουκέλλωσης, λόγω της εφαρμογής του προγράμματος εξάλειψης της νόσου στο ζωϊκό κεφάλαιο. Στο μεσοδιάστημα ανάμεσα στο 1994 και το

2004 καταγράφηκε νέα αύξηση στον αριθμό των κρουσμάτων και πάνω από 350 νέες περιπτώσεις έχουν αναφερθεί για κάθε χρόνο στο Υπουργείο Υγείας (Mitka et al, 2007). Ανάμεσα στο 2000 και το 2007 η μέση ετήσια επίπτωση της βρουκέλλωσης ήταν 2.9/100.000 πληθυσμού. Η ετήσια επίπτωση δείχνει πτωτική τάση αφού ήταν 5 το 2000 και 1.38 το 2007. Η νόσος παρατηρείται κυρίως στις αγροτικές περιοχές της ηπειρωτικής χώρας ενώ η πλειοψηφία των νησιών είναι ελεύθερη κρουσμάτων (Vogou et al, 2008). Προβληματισμός υπάρχει για το αν τα στοιχεία αντιπροσωπεύουν την πραγματική κατάσταση. Για παράδειγμα σύμφωνα με μια πρόσφατη επιδημιολογική μελέτη που αφορούσε τη βορειοδυτική περιοχή της Ηπείρου κατά τη διετία 2002-2004, μόνο 21 περιπτώσεις δηλώθηκαν στο Υπουργείο Υγείας ενώ κατεγράφησαν 152 (στη χώρα μας η δήλωση των κρουσμάτων είναι υποχρεωτική) (Avdikou et al, 2005).

Εκτός απ' την ανεπαρκή επαγρύπνηση των ιδιωτικών ιατρείων, για την ελλειπή αναφορά ευθύνεται και το γεγονός ότι ένα ποσοστό νέων περιπτώσεων αποτελείται από ασθενείς που ζουν στην νότια Αλβανία και πολύ συχνά αναζητούν ιατρική συμβουλή στην Ελλάδα χωρίς να καταγράφονται ούτε στην Ελλάδα ούτε στην Αλβανία. Ακόμη και με επίσημες εκτιμήσεις η επίπτωση είναι αυξημένη στην Ήπειρο – πάνω από 70 περιπτώσεις ανά εκατομμύριο ανά έτος με ποικίλες παραμέτρους υπεύθυνες: παράνομη διακίνηση αγελάων ή ακόμη και γαλακτοκομικών προϊόντων στα Ελληνοαλβανικά σύνορα, ανεπαρκή εφαρμογή προγραμμάτων περιορισμού (Godfroid and Kasbohrer, 2002), φτώχη ιατρική γνώση τόσο του γενικού πληθυσμού όσο και των ιατρών, φόβος οικονομικών απωλειών λόγω σφαγής των μολυσμένων ζωντανών που ανήκουν σε ασθενείς που βρίσκονται σε επιδημιολογική επιτήρηση, και κυρίως η γενική κοινωνικοοικονομική κατάσταση της περιοχής. Νόσο στη χώρα μας προκαλεί σχεδόν αποκλειστικά η *B. melitensis*, η οποία προσβάλλει τα αιγοπρόβατα και τα βοοειδή και κατ' επέκταση τον άνθρωπο (Κανσουζίδου και συν, 2002).

Εκτός από την Ελλάδα δύο άλλες χώρες στη Βαλκανική χερσόνησο έχουν την υψηλότερη επίπτωση στην Ευρώπη. Στη FYROM η ανθρώπινη βρουκέλλωση είναι σχεδόν επιδημία, αν και η ετήσια επίπτωση σταδιακά μειώνεται, ενώ η επίπτωση είναι επίσης υψηλή στην Αλβανία (Pappas et al, 2006a).



Εικόνα 2: Η βρουκέλλωση στην Ευρώπη (από Pappas et al, 2006a).

Στη Μέση Ανατολή βρίσκονται οι χώρες με την υψηλότερη επίπτωση τόσο στην ανθρώπινη όσο και στην βρουκέλλωση των ζώων: η Συρία (έχει την υψηλότερη ετήσια επίπτωση παγκοσμίως), η Σαουδική Αραβία, το Ιράν, the Palestinian Authority, η Ιορδανία και το Αμάν (Refai, 2002). Στις 25 χώρες με τον μεγαλύτερο αριθμό κρουσμάτων ετησίως ανήκουν και επτά δημοκρατίες της πρώην Σοβιετικής Ένωσης, ενώ άλλη μια χώρα αυτής της περιοχής, η Μογγολία, κατατάσσεται δεύτερη. Η κατάσταση στην Κεντρική και Δυτική Ασία είναι δραματική: η βρουκέλλωση στο Κιργκιστάν ανακυρήχθηκε πρόσφατα από την κυβέρνηση του σε «εθνική τραγωδία» (Pappas and Paradimitriou, 2007). Στο Ταζικισταν και στο Καζακστάν οι περιπτώσεις που αναφέρονται ετησίως αυξάνονται ταχέως. Στο Αζερμπαϊτζάν η ετήσια επίπτωση μειώνεται ενώ παραμένει σταθερή στην Αρμενία, τη Γεωργία, το Ουζμπεκιστάν και το Τουρκμενιστάν. Αυτές οι χώρες έχουν αναδειχθεί στις πιο σημαντικές εστίες ανθρώπινης βρουκέλλωσης παγκοσμίως τα τελευταία χρόνια (Pappas et al, 2006a).

Αν και η *B. abortus* έχει την ευρύτερη γεωγραφική κατανομή, η *B. melitensis* είναι η κύρια αιτία ανθρώπινης βρουκέλλωσης παγκοσμίως

(Lindquist et al, 2007) ενώ η *B. canis* αποτελεί το σπανιότερο αίτιο και τα περισσότερα κρούσματα οφείλονται σε έκθεση στο εργαστήριο (Young, 2005). Η *B. melitensis* θεωρείται το είδος με την μεγαλύτερη λοιμογονικότητα για τον άνθρωπο και ακολουθείται από τις *B. suis* και *B. abortus*. Η νόσος προσβάλλει όλες τις ηλικίες, συχνότερα άνδρες απ' ότι γυναίκες γεγονός που ίσως οφείλεται στον μεγαλύτερο κίνδυνο λόγω της επαγγελματικής έκθεσης (Mantur et al, 2006). Κατ' εξαίρεση στο Λίβανο νοσούν συχνότερα γυναίκες γεγονός που αντανακλά πιθανά την αυξημένη μετάδοση διαμέσου της κατανάλωσης γάλακτος ή την αυξημένη συμμετοχή των γυναικών σε διαδικασίες όπως το άρμεγμα (Pappas et al, 2006a). Δεν είναι σπάνια στα παιδιά ενώ οι κλινικές εκδηλώσεις είναι παρόμοιες σε νεογνά, παιδιά και ενήλικες (Young, 2005).

Η *B. melitensis* των βοοειδών έχει αναδειχθεί σε σοβαρό πρόβλημα δημόσιας υγείας σε χώρες της Ν. Ευρώπης, το Ισραήλ, το Κουβέιτ και τη Σαουδική Αραβία ως αποτέλεσμα της κατανάλωσης μη παστεριωμένου γάλακτος καθώς μπορεί να αποικίζει τους μαστούς των ζώων αυτών. Η *B. melitensis* βρίσκεται στα βοοειδή σχεδόν πάντα λόγω έμμεσης επαφής με μολυσμένα κοπάδια αιγοπροβάτων και γι' αυτό είναι πιθανό να μην προκαλεί επιμένουσες λοιμώξεις (Godfroid et al, 2005; Corbel, 1997). Αντίθετα εκτρώσεις σε αιγοπρόβατα και χοίρους οφειλόμενες σε *B. abortus* έχουν αναφερθεί σπάνια στο παρελθόν χωρίς να έχουν αποδειχθεί. Στις χώρες της Β. Ευρώπης εκτός από μερικές οικιακές περιπτώσεις λοιμώξεων από *B. abortus* τα περισσότερα κρούσματα βρουκέλλωσης είναι εισαγόμενα και οφείλονται στη *B. melitensis* (Godfroid and Kasbohrer, 2002).

Παρόμοιο πρόβλημα έχει παρατηρηθεί στο Μεξικό και σε μερικές χώρες της Ν. Αμερικής (κυρίως στην Κολομβία και τη Βραζιλία) όπου η *B. suis* βιότυπος 1 έχει εδραιωθεί επίσης στα βοοειδή με αποτέλεσμα σε μερικές περιοχές των χωρών αυτών τα βοοειδή να θεωρούνται πιο σημαντική πηγή του βιότυπου αυτού για τον άνθρωπο σε σχέση με τους χοίρους (Godfroid et al, 2005).

Τα κρούσματα βρουκέλλωσης που προκαλούνται από τους βιοτύπους 1 και 3 της *B. suis* είναι πολύ λιγότερα σε σχέση με αυτά των *B. melitensis* και *B. abortus* και παρατηρούνται κυρίως σε εργάτες σε σφαγεία ή στη συσκευασία κρεάτων. Ο βιότυπος 4 της *B. suis*, που ενδημεί στην Αλάσκα, το Β. Καναδά και τη Ρωσία, προκαλεί λοίμωξη που κλινικά και επιδημιολογικά είναι παρόμοια με αυτή που προκαλείται από τις *B. melitensis* και *B. abortus* (Corbel, 1998).

Άλλη μια ανησυχητική πτυχή της σύγχρονης επιδημιολογίας της νόσου είναι η παρουσία της βρουκέλλωσης στην άγρια ζωή με αποτέλεσμα να είναι δυνατή η συνεχής μετάδοση στα κατοικίδια ζώα. Για παράδειγμα ο βιότυπος 2 της *B. suis* είναι ευρέως διαδεδομένος στους αγριόχοιρους

στην Ευρώπη αποτελώντας πηγή μετάδοσης τόσο για τα βοοειδή όσο και για τους χοίρους ελεύθερης βοσκής. Ο βιότοπος αυτός δεν είναι παθογόνος για τον άνθρωπο και δεν επιμένει στα βοοειδή (Godfroid, 2002).

4.2. Τρόποι μετάδοσης

Στα ζώα η βρουκέλλωση είναι μια χρόνια λοίμωξη που επιμένει εφ' όρου ζωής. Οι κύριες εκδηλώσεις, που είναι οι εκτρώσεις και η στειρότητα, οφείλονται στην εγκατάσταση της *Brucella* στα όργανα αναπαραγωγής. Αν και το ζώο μπορεί να αποβάλλει μόνο μια φορά η φορεία είναι ισόβια. Ο μικροοργανισμός αποβάλλεται σε μεγάλους αριθμούς στο γάλα, τα ούρα και τα προϊόντα της κύησης του μολυσμένου ζώου. Η κατανάλωση μη παστεριωμένου γάλακτος και προϊόντων γάλακτος (όπως τυρί και ξινόγαλο) είναι ο κύριος τρόπος μετάδοσης (Godfroid et al, 2005). Η *Brucella* παραμένει για αρκετές μέρες στο γάλα (ακόμα και όταν ξινίζει) ενώ το φρέσκο μαλακό τυρί από γάλα μικρών μηρυκαστικών αποτελεί ευνοϊκό περιβάλλον για την ανάπτυξη της. Παραμένει επίσης για εβδομάδες στο παγωτό και για μήνες στο βούτυρο (Memish and Balkhy, 2004). Τα προϊόντα του κρέατος σπάνια αποτελούν πηγή μόλυνσης γιατί συνήθως δεν τρώγονται ωμά ενώ παράλληλα ο αριθμός των μικροοργανισμών στον μυϊκό ιστό είναι χαμηλός (Young, 2005). Αξίζει εδώ να αναφερθεί ότι στο Εκουαδόρ συνηθίζουν να τρώνε τα αποβληθέντα έμβρυα των μολυσμένων ζώων.

Η άμεση δερματική επαφή, αν υπάρχει λύση της συνέχειας του δέρματος, με πάσχοντα ζώα και τα απεκκρίματα τους, αποτελεί άλλη οδό μόλυνσης και αφορά κυρίως κτηνοτρόφους, κτηνιάτρους, εργαζόμενους σε σφαγεία, βυρσοδεψία. Οι επαγγελματίες αυτοί κινδυνεύουν επίσης και μέσω της εισπνοής ή του ενοφθαλμισμού στον επιπεφυκότα μολυσμένης σκόνης και μικροσταγονιδίων (Λεβειδιώτου-Στεφάνου και Παπαπαρασκευάς, 2005).

Οι κτηνίατροι και οι κτηνοτρόφοι κινδυνεύουν επίσης και από άστοχο χειρισμό (κατά λάθος τραυματισμός με τη σύριγγα εμβολίου ή εκτόξευση μικροσταγονιδίων στον επιπεφυκότα) των εμβολίων των ζώων. Το στέλεχος 19 της *B. abortus* και το στέλεχος 'Rev 1' της *B. melitensis* είναι δύο ζωντανά στελέχη που διατηρούν μια χαμηλή λοιμογονικότητα για τον άνθρωπο και μπορούν να προκαλέσουν νόσο (Sadusk et al., 1957; Young, 1983). Το 1997 στο Κάνσας, εννέα άτομα μολύνθηκαν όταν συμμετείχαν στον επιχειρούμενο τοκετό και την νεκροψία ενός θνησιγενούς εμβρύου βοός που πέθανε από το στέλεχος RB51 της *B. abortus*. Το κόψιμο του ομφάλιου λώρου νεογέννητων αμνών με τα δόντια καθώς και το γδάρισμα αποβληθέντων εμβρύων αποτελούν δύο

άλλες επικίνδυνες συνήθειες στα πλαίσια της επαγγελματικής ενασχόλησης (Godfroid et al, 2005).

Η βρουκέλλωση αποτελεί μια από τις συχνότερες αιτίες μολύνσεων για το προσωπικό των εργαστηρίων και αντιπροσωπεύει το 2% των λοιμώξεων που συνδυάζονται με έκθεση στο εργαστήριο. Ο κύριος τρόπος μετάδοσης είναι μέσω έκθεσης των ματιών, της μύτης και του στόματος σε μικροσταγονίδια (Robishaud et al, 2004).

Η μετάδοση από άνθρωπο σε άνθρωπο είναι σπάνια. Μπορεί να γίνει μέσω μεταμόσχευσης μυελού των οστών ή μετάγγισης μολυσμένου αίματος ενώ έχει αναφερθεί και μέσω της σεξουαλικής επαφής. Μάλιστα έχει απομονωθεί *Brucella* σε τράπεζα σπέρματος (Vandercam et al, 1990). Αναφέρεται στη βιβλιογραφία περίπτωση πιθανής σεξουαλικής μετάδοσης μεταξύ συζύγων και απομόνωσης του παθογόνου από το σπέρμα, ενώ απουσίαζαν τα συμπτώματα από το γεννητικό, με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase chain reaction-PCR) (Meltzer et al, 2010). Αξιοσημείωτη είναι και η μετάδοση λόγω εισαγωγής βόιου ιστού για κοσμητικούς λόγους (O'Callaghan and MacMillan, 2002). Η νεογνική λοίμωξη μπορεί να γίνει διαμέσου του πλακούντα κατά τη διάρκεια του τοκετού ή λόγω θηλασμού με μολυσμένο μητρικό γάλα (Palanduz et al, 2000 ; Tikare et al, 2008).

5. ΛΟΙΜΟΓΟΝΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ – ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ

Η *Brucella* ζει σε στενή συσχέτιση με τους ξενιστές της και όχι ελεύθερα στο περιβάλλον. Αν και σε πολλά κείμενα αναφέρεται ως δυνητικά ενδοκυττάριο παράσιτο, έχει προταθεί ότι ο πιο σωστός όρος είναι «δυναμικά εξωκυττάριο ενδοκυττάριο παράσιτο» (Moreno and Moriyo, 2002). Αυτό βασίζεται στο γεγονός ότι αν και καλλιεργείται εύκολα σε τεχνητά υλικά, στους ξενιστές της ανευρίσκεται κυρίως ενδοκυττάρια. Καταλαμβάνει «επαγγελματικά» και «μη επαγγελματικά» φαγοκύτταρα (όπως είναι οι τροφοβλάστες του πλακούντα στους φυσικούς ξενιστές και τα επιθηλιακά κύτταρα) και οι αλληλεπιδράσεις της με αυτά τα κύτταρα-ξενιστές καθορίζουν το αποτέλεσμα της λοίμωξης (Kohler et al, 2003).

Εισβάλλει στο ανθρώπινο σώμα διαμέσου του γαστρεντερικού σωλήνα, του αναπνευστικού σωλήνα, του επιπεφυκότα και του δέρματος. Οι αλληλεπιδράσεις του βακτηρίου στους βλενογονικούς αυτούς φραγμούς με τα επιθηλιακά κύτταρα του ξενιστή είναι βασικής σημασίας για την αρχική επαφή μεταξύ παθογόνου και ξενιστή. Η αποτελεσματικότητα με την οποία η *Brucella* εισβάλλει στα επιθηλιακά κύτταρα είναι μικρή και έχει προταθεί ότι τα Μ κύτταρα στις βλενογονικές επιφάνειες

αποτελούν την κύρια θέση εισόδου στον οργανισμό (Martin Roop II et al, 2009).

Στη συνέχεια φαγοκυτταρώνεται από πολυμορφοπύρηνα που φθάνουν στο σημείο του ενοφθαλμισμού με χημειοταξία. Μέσω των λεμφαγγείων φθάνει στους επιχώριους λαμφαδένες και αιματογενώς σε διάφορα μέρη του δικτυοενδοθηλιακού συστήματος όπως το ήπαρ, ο σπλήνας και ο μυελός των οστών (Memish et al, 2000). Στα μέρη αυτά τα πολυμορφοπύρηνα τελικά εκφυλίζονται και απελευθερώνουν τους ενδοκυττάρους μικροοργανισμούς που ενδοκυτταρώνονται από μακροφάγα και μονοκύτταρα. Ο πολλαπλασιασμός συνεχίζεται εντός των κυττάρων αυτών που τελικά σκοτώνονται απελευθερώνοντας τους μικροοργανισμούς. Ο κυματοειδής πυρετός της βρουκέλλωσης είναι αποτέλεσμα της περιοδικής απελευθέρωσης των βακτηρίων και των συστατικών τους από τα φαγοκύτταρα. Η απελευθέρωση στη περιφερική κυκλοφορία καταλήγει σε αιματογενή διασπορά σε άλλα όργανα και ιστούς με αποτέλεσμα τις ποικίλες κλινικές εκδηλώσεις της νόσου (Corbel, 1998).

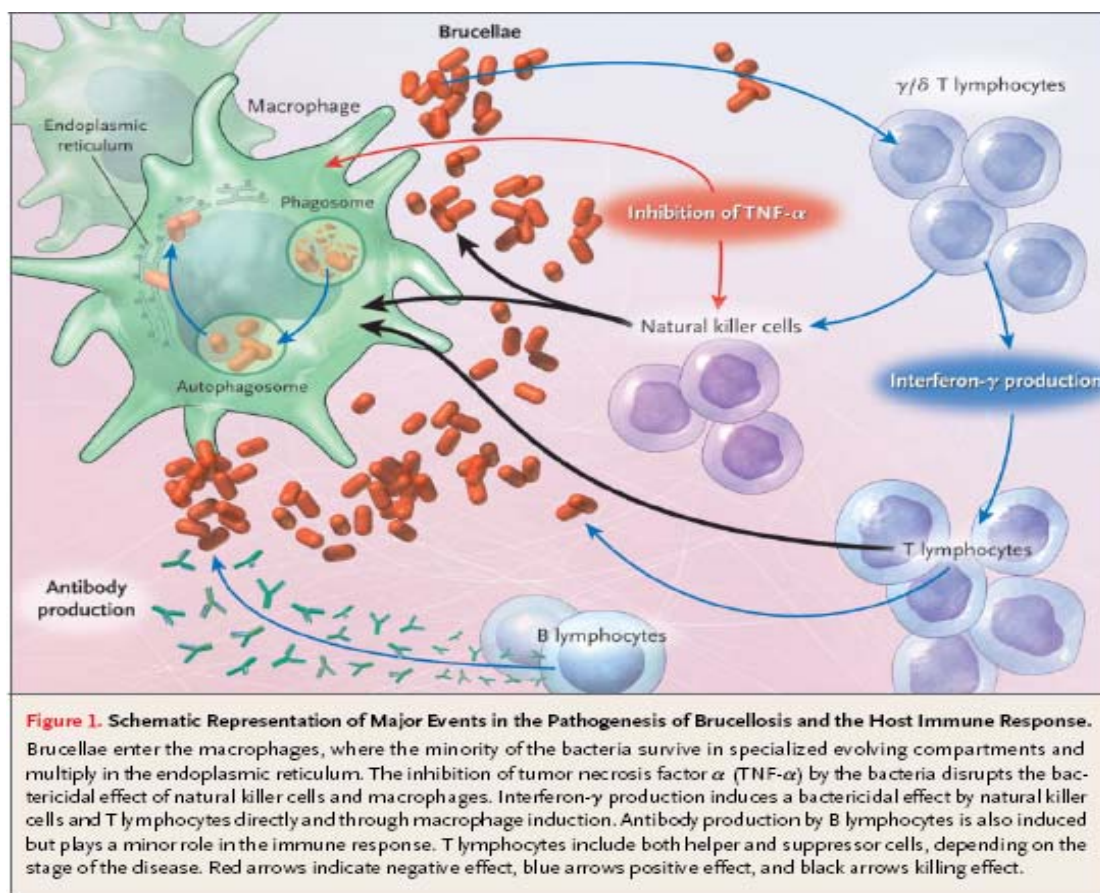
Ως εδοκυττάριο παθογόνο, όχι μόνο αντιστέκεται στη θανάτωση από τα πολυμορφοπύρηνα μετά τη φαγοκυττάρωση, αλλά επίσης πολλαπλασιάζεται εντός των μακροφάγων και των «μη επαγγελματικών» φαγοκυττάρων (Domand et al, 2002). Ως εκ τούτου οι μηχανισμοί ενδοκυττάριας επιβίωσης είναι απαραίτητο να διευκρινισθούν για την κατανόηση της παθογένειας .

Δεν διαθέτει τους κλασσικούς λοιμογόνους παράγοντες όπως εξωτοξίνες, κυτταρολυσίνες , έλυτρο, ινίδια, βλεφαρίδες ή πλασμίδια (Gorvel and Moreno, 2002). Το λιποπολυσακχαρίδιο των στελεχών σε λεία φάση (S-LPS) θεωρείται ο κύριος καθοριστής της παθογόνου δράσης αλλά και το ανοσοκυρίαρχο αντιγόνο. Ωστόσο συγκρινόμενο με το LPS των Εντεροβακτηριακών έχει σχετικά χαμηλή τοξικότητα, χαμηλή πυρετογόνο ικανότητα και χαμηλή ικανότητα πρόκλησης υποσιδηραιμίας (Corbel, 1997). Επίσης είναι ασθενής επαγωγέας της φλεγμονώδους απάντησης του ξενιστή: επάγει ασθενώς την παραγωγή προφλεγμονωδών κυτταροκονών όπως IL-1β, IL-6 ή TNF-α και δεν ενεργοποιεί την εναλλακτική οδό του συμπληρώματος. Οι διαφορές αυτές αποδίδονται στις βιοχημικές διαφορές του λιπιδίου A σε σχέση με το κλασσικό λιπίδιο A άλλων Gram-αρνητικών βακτηρίων (Roop RM II et al, 2009).

Επιπρόσθετα με την ικανότητα τους να αποτρέπουν την πλήρη επαγωγή φλεγμονώδους αντίδρασης από τον ξενιστή, τα στελέχη της *Brucella* ενεργώς εμπλέκονται και στην επίκτητη ανοσολογική αντίδραση. Η Ο αλυσίδα του LPS αποδομείται φτωχά από τα μακροφάγα και σχηματίζει συμπλέγματα με συστατικά του τάξης II μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (Major histocompatibility complex-

MHC) αυτών των φαγοκυττάρων, γεγονός που εμπλέκεται με την αντιγονοπαρουσιαστική τους ικανότητα (Forestier et al, 2000).

Εντός των πολυμοφοπυρήνων η *Brucella* απελευθερώνει μονοφωσφορική αδενίνη και μονοφωσφορική γουανίνη και αναστέλλει το αλατοειδές σύστημα μυελοϋπεροξειδάσης-υπεροξειδίου του υδρογόνου παραβιάποντας την αποκοκκίωση. Διαθέτει ένζυμα όπως η δισμουτάση του υπεροξειδίου και η καταλάση που περιορίζουν τις τοξικές ελεύθερες ρίζες οξυγόνου και αναστέλλει επίσης την αναπνευστική οξειδωτική έκρηξη των πολυμοφοπυρήνων (Young, 2005).



Εικόνα 3: Σχηματική αναπαράσταση των γεγονότων κατά την είσοδο της βρουκέλλας στα κύτταρα του ξενιστή (από Pappas et al, 2005a).

5.1. Η *Brucella* αλλάζει την ενδοκυττάρια κυκλοφορία εντός των κυττάρων ξενιστών

Η ικανότητα του βακτηρίου να επιβιώνει και να πολλαπλασιάζεται για παρατεταμένες περιόδους εντός των μακροφάγων μπορεί να προκαλέσει

χρόνιες λοιμώξεις . Αυτή η ενδοκυττάρια φωλιά προσφέρει προστασία έναντι του συμπληρώματος και των αντισωμάτων κατά την περίοδο διασποράς εντός του ξενιστή. Επίσης η εντόπιση επίμονα μολυσμένων μακροφάγων σε όργανα του ΔΕΣ δημιουργεί χρόνιες εστίες (Kohler et al, 2003). Διεισδύει στο μακροφάγο διαμέσου μιας συγκεκριμένης δομής που βρίσκεται στα ευκαρυωτικά κύτταρα, τα λιπιδικά rafts. Συγκεκριμένα η Ο-αλυσίδα του S-LPS αλληλεπιδρά με μια κυτταρική πρωτεΐνη του μακροφάγου (PgpC), αγκυροβολημένη στα λιπιδικά rafts. Αυτή η αλληλεπίδραση μεσολαβείται από την μεμβρανική έκφραση της πρωτεΐνης HSP60 της βρουκέλλας (Watarai et al, 2003).

Το κενοτόπια που περιέχουν τη *Brucella* (*Brucella* containing vacuoles-BCVs) μπαίνουν σε ένα ενδοκυττάριο μονοπάτι κυκλοφορίας που καταλήγει στην ανάπτυξη των πολλαπλασιαστικών φαγοσωμάτων ή βρουκελλοσωμάτων (*brucellosomes*) (Kohler et al, 2003). Η αλληλεπίδραση ανάμεσα στην Ο-αλυσίδα του S-LPS και τα λιπιδικά rafts του μακροφάγου είναι σημαντική για την ανάπτυξη του πολλαπλασιαστικού φαγοσώματος. Η καταστροφή με φάρμακα των λιπιδικών rafts οδηγεί σε φαγοκυττάρωση με άλλο μηχανισμό και στην εξόντωση όλων των βακτηρίων (Porte et al, 2003). Η σημασία της αλληλεπίδρασης αυτής και συγκεκριμένα του S-LPS για την ενδοκυττάρια επιβίωση της *Brucella*, αναδεικνύεται και από το γεγονός ότι στελέχη με R-LPS φαγοκυτταρώνονται με μηχανισμό που δεν εμπλέκει τα λιπιδικά rafts και γρήγορα καταλήγουν στα λυσοσώματα με αποτέλεσμα την εξάλειψή τους (Porte et al, 2003).

Κατά τα αρχικά στάδια της ενδοκυττάριας κυκλοφορίας τους τα BCVs υφίστανται παροδικές αλληλεπιδράσεις με τα λυσοσώματα (Starr et al, 2008) με αποτέλεσμα την οξινοποίηση τους (Arenas et al, 2000). Τα κενοτόπια αυτά στη συνέχεια αντιδρούν εκτεταμένα με το ενδοπλασματικό δίκτυο και τελικά το pH τους αυξάνει σε επίπεδο που επιτρέπει τον ενδοκυττάριο πολλαπλασιασμό των μικροβίων. Αφού επιτευχθεί ο πολλαπλασιασμός τα μικρόβια απελευθερώνονται πιθανά χρησιμοποιώντας αιμολυσίνες. Έχει βρεθεί ότι αιμολυσίνες της *Legionella* spp. σχηματίζουν πόρους και διαλύουν το κενοτόπιο και τις κυτταρικές μεμβράνες σύντομα μετά τον ενδοκυττάριο πολλαπλασιασμό. Ένα παρόμοιο φαινόμενο θα μπορούσε να ισχύει και για τη *Brucella* (Gorvel and Moreno, 2002).

5.1.1. Το σύστημα BvrRS

Το αποτελούμενο από δύο συστατικά ρυθμιστικό σύστημα BvrRS που διαθέτει η *Brucella* ρυθμίζει την έκφραση βακτηριακών γονιδίων, δια μέσου ενός καταρράκτη φωσφορυλίωσης πρωτεϊνών και θεωρείται σημαντικός παράγοντας στην προσκόλληση και είσοδο στα κύτταρα του

ξενιστή. Έχει προφανές αποτέλεσμα στην έκφραση διαφόρων επιφανειακών πρωτεϊνών μεταξύ των οποίων η Omp25(ή Omp3a) και η Omp22(ή Omp3b). Υποστηρίζεται ότι η αλλαγμένη έκφραση των επιφανειακών πρωτεϊνών επιτρέπει στο παθογόνο να συνδεθεί και να εισέλθει στα κύτταρα του ξενιστή αποφεύγοντας παράλληλα το μονοπάτι των λυσοσωμάτων (Franco et al, 2007).

Το σύστημα αυτό ρυθμίζει επίσης την έκφραση γονιδίων τα προϊόντα των οποίων συμβάλλουν στη σωστή ακυλίωση του λιπιδίου A του LPS. Τα γονίδια αυτά παίζουν σημαντικό ρόλο στο υψηλό επίπεδο αντοχής των στελεχών βρουκέλλας σε αντιμικροβιακά κατιονικά πεπτίδια (Manterola et al, 2005).

5.1.2. Το σύστημα έκκρισης τύπου IV

Η *Brucella* διαθέτει σύστημα έκκρισης τύπου IV παρόμοιο με το σύστημα VirB του φυτοπαθογόνου *Agrobacterium tumefaciens*. Πρόκειται γενικά για σύστημα έκκρισης μακρομορίων, είτε στο περιβάλλον ή απευθείας στα κύτταρα του ξενιστή. Παρόμοια συστήματα διαθέτουν επίσης η *Bordetella pertussis*, η *Legionella pneumophila* και το *Helicobacter pylori*. Στη *Brucella* είναι απαραίτητο για την ανάπτυξη του πολλαπλασιαστικού κενοτοπίου, άρα για την ενδοκυττάρια επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό του μικροβίου (Boschioli et al, 2001).

Κωδικοποιείται από την περιοχή virB της οποίας τα 12 γονίδια αποτελούν ένα οπερόνιο. Ο εκκινητής του virB επάγεται αφού το παθογόνο βρεθεί εντός των μακροφάγων και μάλιστα εντός τριών ωρών από τη λοίμωξη. Το όξινο pH και η στέρση θρεπτικών συστατικών αποτελούν σημαντικούς επαγωγείς. Έχει βρεθεί ότι το pH εντός του φαγοσώματος πέφτει στο 4,0 ταχέως μετά την πρόσληψη του παθογόνου. Μπλοκάροντας την οξינוποίηση με φάρμακα όπως η βαφιλομυσίνη ή ουδετεροποιώντας το pH με χλωριούχο αμμώνιο στα πρώιμα στάδια της λοίμωξης αναστέλλεται ο ενδοκυττάριος πολλαπλασιασμός. Οι τακτικές αυτές, ωστόσο, δεν έχουν αποτέλεσμα αν εφαρμοστούν επτά ώρες μετά τη λοίμωξη, γεγονός που δείχνει ότι η πρώιμη οξינוποίηση του φαγοσώματος επάγει βασικούς λοιμογόνους παράγοντες και το οπερόνιο virB είναι ένας από αυτούς (Boschioli et al, 2001).

Το σύστημα έκκρισης τύπου IV αλληλεπιδρά με το ενδοπλασματικό δίκτυο κατά τέτοιο τρόπο ώστε το pH να γίνει ουδέτερο, νιτρικά ιόντα να χρησιμοποιηθούν για αναερόβια αναπνοή και η *Brucella* να πολλαπλασιαστεί (Cutler et al, 2005). Πρόσφατα έχουν ταυτοποιηθεί δύο πρωτεΐνες που πιθανά εκκρίνονται από το σύστημα έκκρισης τύπου IV της *B. abortus* 2308, οι VceA και VceC (de Jong et al, 2008). Οι βιολογικές τους λειτουργίες απομένει να διευκρινισθούν.

Ένας άλλος λοιμογόνος παράγοντας που βοηθά στην ενδοκυττάρια επιβίωση είναι η περιπλασματική κυκλική β-1,2-γλυκάνη, ένα πολυσακχαρίδιο χαμηλού μοριακού βάρους. Διασπά την ακεραιότητα των λιπιδικών rafts στην μεμβράνη των BCVs κατά την ενδοκυττάρια κυκλοφορία τους, εμποδίζοντας έτσι εκτεταμένες αλληλεπιδράσεις με τα λυσοσώματα (Arellano-Reynoso et al, 2005).

5.2. Φυσιολογική προσαρμογή της *Brucella* στο ενδοκυττάριο περιβάλλον

Αν και τα στελέχη της *Brucella* μπορούν να αλλάξουν την ενδοκυττάρια κυκλοφορία των BCVs ώστε να αποτραπεί η σύντηξή τους με τα λυσοσώματα και να αποφύγουν την επαγωγή μιας πλήρους φλεγμονώδους αντίδρασης, έχουν ωστόσο να αντιμετωπίσουν ποικίλες καταστάσεις stress ώστε να προσαρμοσθούν στο ενδοκυττάριο περιβάλλον των μακροφάγων. Τέτοιες καταστάσεις αντιμετωπίζουν και εντός των «μη επαγγελματικών» φαγοκυττάρων όπως είναι τα επιθηλιακά κύτταρα αλλά είναι λιγότερο σοβαρές (Roop RM II et al, 2009).

5.2.1. Αντίσταση στη οξειδωτική ζημιά

Προϊόντα ενεργού οξυγόνου, όπως είναι το ανιόν υπεροξειδίου (O_2^-) και το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2), παράγονται είτε ενδογενώς, σαν αποτέλεσμα του αερόβιου μεταβολισμού του μικροβίου, είτε εξωγενώς από το μακροφάγα. Επειδή το O_2^- είναι φορτισμένο μόριο δεν διαπερνά εύκολα τις βακτηριακές μεμβράνες. Κατά συνέπεια τα βακτήρια διαθέτουν διαμερισματοποιημένους μηχανισμούς άμυνας εναντίον του όπως είναι οι περιπλασματικές δισμουτάσες του υπεροξειδίου (Superoxide dismutase-SOD) (π.χ. η Cu/Zn δισμουτάση). Κυτταροπλασματικές δισμουτάσες όπως είναι η Mn δισμουτάση (SodA) προστατεύουν από το εδογενές O_2^- (Lynch and Kuramitsu, 2000). Το H_2O_2 αποδομείται από την περιπλασματική καταλάση KatE και την υπεροξειρεδοξίνη AhpC. Η *Brucella* μπορεί έμμεσα να αποφύγει την οξειδωτική ζημιά. Διαθέτει τελικές οξειδάσες του κυττοχρώματος (οι οξειδάσες bd και οι τύπου cbb3 c οξειδάσες) που έχουν υψηλή συγγένεια με το O_2 απομακρύνοντας το. Επίσης διαθέτει μηχανισμούς επισκευής των βλαβών του DNA που προκαλούνται από το οξειδωτικό stress (Roop RM II et al, 2009).

5.2.2. Αντίσταση στα προϊόντα ενεργού αζώτου

Η *Brucella* διαθέτει το ένζυμο αναγωγάση του μονοξειδίου του αζώτου που απομακρύνει το αντίστοιχο οξείδιο (NO). Το προϊόν αυτό πιθανά συμμετέχει στον έλεγχο του ενδοκυττάριου πολλαπλασιασμού του μικροβίου (Jiang X et al, 1993). Η αντίδραση μεταξύ του O_2^- και του NO έχει σαν προϊόν ένα υβρίδιο ($ONOO^-$) με ισχυρή μικροβιοκτόνο δράση. Το ένζυμο AhpC δρα πιθανά και σαν αναγωγάση με υπόστρωμα το υβρίδιο αυτό (Bryk et al, 2000).

5.2.3. Αντίσταση στο όξινο pH

Διάφορα γονιδιακά προϊόντα έχουν συνδεθεί με τη λειτουργία αυτή όπως οι πρωτεΐνες HdeA και Asp24. Τα περισσότερα στελέχη παράγουν μια λειτουργική ουρεάση που τα προστατεύει από εξαιρετικά χαμηλό pH (pH 2) σε συνθήκες εργαστηρίου όταν η ουρία είναι παρόν στο θρεπτικό υλικό. Αν και το ένζυμο αυτό πιθανά προστατεύει από τις όξινες συνθήκες που συναντά το παθογόνο στο γαστρεντερικό σωλήνα του ξενιστή, δεν ασκεί την ίδια δράση και εντός των κυττάρων (Roop RM II et al, 2009).

5.2.4. Αντίσταση σε αντιμικροβιακά πεπτίδια

Τα στελέχη της *Brucella* έχουν εγγενώς μεγαλύτερη αντοχή σε βακτηριοκτόνα κατιονικά πεπτίδια σε σχέση με άλλα Gram-αρνητικά παθογόνα γεγονός που συνδέεται με την κατάσταση ακυλίωσης του λιπιδίου A του LPS (Manterola et al, 2005). Το γνώρισμα αυτό πιθανά παρέχει προστασία και από τα λυτικά πεπτίδια των λυσοσωμάτων κατά τις παροδικές αλληλεπιδράσεις των κεντοπίων που περιέχουν *Brucella* με τα οργανίδια αυτά των κυττάρων του ξενιστή (Starr et al, 2008).

5.2.5. Αντίσταση στη στέρηση θρεπτικών συστατικών

Ένα από τα κύρια συστατικά υπό περιορισμό στο περιβάλλον αυτό είναι το μοριακό οξυγόνο. Η *Brucella* χρησιμοποιώντας τις οξειδάσες του κυττοχρώματος bd και τις τύπου cbb3 c που έχουν υψηλή συγγένεια με το O_2 , μπορεί να αναπνέει αποτελεσματικά σε χαμηλές συγκεντρώσεις O_2 . Επίσης έχει τη δυνατότητα να χρησιμοποιεί NO_3^- σαν τελικό δέκτη ηλεκτρονίων (Roop RM II et al, 2009).

5.3. Άλλοι πιθανοί λοιμογόνιοι παράγοντες

Αν και είναι ακίνητο μικρόβιο στοιχεία της γονιδιακής ανάλυσης δείχνουν ότι έχει το γενετικό υλικό για την παραγωγή βλεφαρίδων. Επιπλέον κάτω από ορισμένες συνθήκες ανάπτυξης το στέλεχος 16Μ της *B. melitensis* παράγει πολικό οργανίδιο που μοιάζει με βλεφαρίδα (Fretin et al, 2005). Το οργανίδιο είναι μάλλον μια συσκευή έκκρισης και δεν έχει σχέση με την κινητικότητα.

Τα στελέχη της *Brucella* έχουν εξωτερικές μεμβράνες πλούσιες σε φωσφατιδυλχολίνη, ένα φωσφολιπίδιο που τυπικά συνδέεται με τις μεμβράνες των ευκαρυωτικών κυττάρων. Πιθανολογείται ότι παίζει σημαντικό ρόλο στην διατήρηση της ακεραιότητας και των χαρακτηριστικών της διαπερατότητας της εξωτερικής μεμβράνης και συγκεκριμένα μπορεί να εμπλέκεται στην αντίσταση στο συμπλήρωμα και σε άλλα αντιμικροβιακά πεπτιδία (Conde- Alvarez et al, 2006).

5.4. Αντίσταση των φαγοκυττάρων στην απόπτωση

Αρκετοί μικροοργανισμοί όπως η *Shigella flexneri*, η *Legionella pneumophila* και η *Yersinia enterocolitica* προκαλούν την καταστροφή των μονοκυτταρικών φαγοκυττάρων μέσω της απόπτωσης (δηλαδή του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου), καταστρατηγώντας έτσι την πρώτη γραμμή άμυνας. Η *Brucella*, ωστόσο, λειτουργεί αντίθετα αναστέλλοντας την αυτόματα εμφανιζόμενη απόπτωση των μονοκυττάρων του ανθρώπου. Η παρεμπόδιση αυτή δεν μεσολαβείται από το λιποπολυσακχαρίδιο και απαιτεί επιβίωση του βακτηρίου εντός των μολυσμένων κυττάρων. Προστατεύονται τόσο τα κύτταρα που έχουν προσβληθεί όσο και τα μη προσβεβλημένα, γεγονός που υποδεικνύει ότι στο φαινόμενο αυτό εμπλέκονται διαλυτοί μεσολαβητές, πιθανά κυτταροκίνες όπως η IL-1, η IL-6 και η IL-12. Ανάλυση των μολυσμένων με *Brucella* μονοκυττάρων αποκάλυψε υπερέκφραση του A1 γονιδίου, που αποτελεί μέλος της οικογένειας bcl-2. Η οικογένεια αυτή εμπλέκεται στην επιβίωση των αιμοποιητικών κυττάρων. Προστασία στα μονοκυτταρικά φαγοκύτταρα παρέχεται επίσης και έναντι της επαγόμενης από το σύνδεσμο (ligand) Fas ή την IFN-γ απόπτωση (Gross et al, 2000). Με τον τρόπο αυτό το παθογόνο εμποδίζει την εξάλειψη των κυττάρων ξενιστών του που του παρέχουν ένα προστατευτικό περιβάλλον για την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό του.

5.5. Λοιμογονικότητα στα rough στελέχη της *Brucella*

Τα στελέχη των *B. canis* και *B. ovis* αν και εγγενώς στερούνται την Ο-αλυσίδα του LPS, παράγουν νόσο στους φυσικούς τους ξενιστές. Προσλαμβάνονται από τα κύτταρα του ξενιστή με μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα σε σχέση με τα smooth στελέχη δεν πολλαπλασιάζονται όμως όπως αυτά. Αυτό συμβαίνει γιατί όπως έχει ήδη αναφερθεί δεν φαγοκυτταρώνονται δια μέσω των λιπιδικών rafts και συνεπώς τα κενοτόπια που τα περιέχουν συντήκονται περισσότερο με τα λυσοσώματα οδηγώντας στην εξάλειψη τους (Ferrero et al, 2009).

Rough στελέχη *B. abortus* εγαστηριακά προερχόμενα, επιδεικνύουν κυτταροτοξικότητα σε καλλιέργειες μακροφάγων. Με βάση αυτό έχει υποστηριχθεί ότι η αυθόρμητη εμφάνιση τέτοιων κυτταροτοξικών μεταλλακτών μπορεί να διευκολύνει την εξάπλωση από κύτταρο σε κύτταρο των smooth στελεχών in vivo. Ωστόσο, είναι αξιοσημείωτο ότι στελέχη *B. canis* και *B. ovis* δεν είναι κυτταροτοξικά σε καλλιέργειες μακροφάγων (Pei and Ficht, 2004).

5.6. Ανοσιακή απάντηση στη *Brucella*

Όπως συμβαίνει και με τα άλλα ενδοκυττάρια βακτήρια ενώ παράγονται αντισώματα, οι μηχανισμοί της κυτταρικής ανοσίας είναι απαραίτητοι για την αναχαίτιση του παθογόνου. Στο πρώιμο στάδιο της λοίμωξης επιστρατεύονται οι μηχανισμοί της φυσικής (innate) ανοσίας με σκοπό τη μείωση του αρχικού αριθμού των βακτηρίων που εισέβαλαν στον οργανισμό και την δημιουργία περιβάλλοντος κατάλληλου για την ανάπτυξη ειδικής ανοσοαπάντησης προερχόμενης από τα T1 βοηθητικά (T helper 1-Th1) κύτταρα (Ko and Splitter, 2003).

Στα πλαίσια της φυσικής ανοσίας δρουν το συμπλήρωμα, τα ουδετερόφιλα, τα φυσικά κυτταροκτόνα (natural killer-NK) κύτταρα και τα μακροφάγα. Γενικά τα smooth στελέχη είναι περισσότερο ανθεκτικά στη βακτηριοκτόνο ικανότητα του ορού σε σχέση με τα rough γιατί δεν ενεργοποιούν τη εναλλακτική οδό του συμπληρώματος (Hoffmann and Houle, 1983). Τα ουδετερόφιλα είναι πιθανά τα πρώτα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος που συναντούν τη *Brucella*. Η κύρια λειτουργία τους είναι η φαγοκυττάρωση μετά από οψωνοποίηση των μικροβιακών κυττάρων (Young et al, 1985).

Οι λειτουργίες της επίκτητης (adaptive) ανοσίας στη βρουκέλλωση μπορούν να ταξινομηθούν σε τρεις μηχανισμούς και επιτελούνται μέσω των $\alpha\beta$ CD4⁺, CD8⁺ και $\gamma\delta$ T λεφοκυττάρων, των B λεμφοκυττάρων και πλήθους κυτταροκινών. Πιο συγκεκριμένα, η IFN- γ που παράγεται από τα CD4⁺, CD8⁺ και $\gamma\delta$ T κύτταρα ενεργοποιεί τη βακτηριοκτόνο

λειτουργία των μακροφάγων. Τα κυτταροτοξικά CD8⁺ και γδ T κύτταρα σκοτώνουν τα μολυσμένα μακροφάγα. Οι ισότυποι των αντισωμάτων IgG2a και IgG3, αποτέλεσμα της ανάπτυξης του τύπου Th1 της ειδικής ανοσίας, οψωνιοποιούν το παθογόνο διευκολύνοντας τη φαγοκυττάρωση (Ko and Splitter, 2003).

Οι κυτταροκίνες που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη βρουκέλλωση είναι η IL-12, η IFN-γ και ο TNF-α. Η IL-12 παράγεται από τα B κύτταρα και τα μακροφάγα και οδηγεί την Th1 ανοσοαπάντηση με αποτέλεσμα την παραγωγή IFN-γ από τα T κύτταρα. Η IFN-γ ενεργοποιεί τη βακτηριοκτόνο λειτουργία των μακροφάγων με τη σύμπραξη και του TNF-α που παράγεται από τα μακροφάγα και τα NK κύτταρα (Ko and Splitter, 2003).

Έχει βρεθεί ότι μια πρωτεΐνη της εξωτερικής μεμβράνης της *Brucella* και συγκεκριμένα η Omp25 αναστέλλει την παραγωγή TNF-α από τα μακροφάγα (Jubier-Maurin et al, 2001). Η πρωτεΐνη αυτή ανήκει στην ομάδα 3 των πρωτεϊνών της εξωτερικής μεμβράνης που είναι σε μεγάλο βαθμό διατηρημένο μεταξύ των ειδών, των βιοτύπων και των στελεχών της *Brucella* και έχει ομολογία στην αλληλουχία με την OmpA των Εντεροβακτηριακών (Cloeckert et al, 1996).

Τα T λεμφοκύτταρα που έχουν τον γδ υποδοχέα φυσιολογικά αποτελούν το 0,5-4% των T λεμφοκυττάρων του περιφερικού αίματος. Η πλειοψηφία τους (περίπου 90%) χρησιμοποιεί έναν υποδοχέα T κυττάρων (T cell receptor-TcR) που περιλαμβάνει το ζεύγος των Vγ9 και Vδ2 περιοχών (Dornand et al, 2002). Ο αριθμός των Vγ9Vδ2 T κυττάρων αυξάνει δραματικά στο περιφερικό αίμα ασθενών με λοίμωξη από *B. melitensis* φθάνοντας το 30% των T λεμφοκυττάρων (Bertotto et al, 1993).

Αυτό είναι αποτέλεσμα της έκκρισης από τη *Brucella* ή από τα μονοκύτταρα τα μολυσμένα με *Brucella* ενός χαμηλού μοριακού βάρους (<3000 Kd) μη πεπτιδικού κλάσματος (*Brucella* soluble factor-BSF). Ο παράγοντας αυτός διεγείρει τον πολλαπλασιασμό των Vγ9Vδ2 T κυττάρων και την παραγωγή από αυτά κυτταροκινών όπως ο TNF-α και η IFN-γ. Επιπλέον τα κύτταρα αυτά γίνονται κυτταροτοξικά για τα μονοκύτταρα τα μολυσμένα με *Brucella* και τα βακτήρια αυτά κάθε αυτά (Ottonnes et al, 2000).

Η έκβαση της λοίμωξης μπορεί να υποθεθεί ότι εξαρτάται από τις ακόλουθες αντιφατικές διεργασίες που προκαλούνται από το βακτήριο στην αρχή της λοίμωξης και ευνοούν είτε αυτό είτε τον ξενιστή. Η αναστολή της παραγωγής TNF-α από τα μακροφάγα από την Omp25 έχει τις ακόλουθες επιπτώσεις: η αυτοκρινή ενεργοποίηση των μακροφάγων και η ενεργοποίηση των NK κυττάρων παραβλάπτονται. Η παραγωγή IFN-γ και η κυτταροτοξική δράση των NK κυττάρων αναστέλλονται. Επιπρόσθετα λόγω της μη ενεργοποίησης των

μακροφάγων, από την απουσία TNF- α και IFN- γ , αναστέλλεται η παραγωγή IL-12 και η ανάπτυξη της Th1 ανοσοαπάντησης. Η διεργασία αυτή είναι απαραίτητη για την παραγωγή CD4⁺ T κυττάρων, που παράγουν IFN- γ , και κυτταροτοξικών CD8⁺ T κυττάρων και τελικά την εξάλειψη του παρασίτου. Παράλληλα η ενεργοποίηση και ο πολλαπλασιασμός των V γ 9V δ 2 T κυττάρων μέσω του BSF, έχει σαν αποτέλεσμα την παραγωγή TNF- α και IFN- γ (γεγονός που αντισταθμίζει την απουσία του TNF- α) και επάγει την ενεργοποίηση των μακροφάγων και των NK κυττάρων και την ανάπτυξη της Th1 ανοσοαπάντησης (Dornand et al, 2002).

Το μονοπάτι μεταβίβασης σημάτων (signaling pathway) cAMP/PKA των μακροφάγων εμπεριέχει μέρος των παραπάνω παρατηρήσεων. Η είσοδος της *Brucella* στα μακροφάγα προκαλεί αύξηση της κυκλικής μονοφωσφορικής αδενοσίνης (cyclic adenosine 5'-monophosphate-cAMP) με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση μιας κινάσης πρωτεϊνών (protein kinase-PKA) (Gross et al, 2003). Η ενεργοποίηση του μονοπατιού cAMP/PKA έχει σαν αποτέλεσμα να επάγει την αντίσταση των μακροφάγων στην απόπτωση μέσω των μεταγραφικών παραγόντων cAMP και CREB που είναι και αντιαποπτωτικοί μεσολαβητές. Η αύξηση του cAMP, ενός αναστολέα της παραγωγής TNF- α από τα μακροφάγα, πιθανά επαυξάνει την αναστολή της παραγωγής TNF- α που μεσολαβείται από την Omp25 κατά τη διάρκεια της λοίμωξης. Η αντίσταση στην ενεργοποίηση από την IFN- γ των μακροφάγων των μολυσμένων με το βακτήριο μπορεί να σχετίζεται με τις επιδράσεις του μονοπατιού cAMP/PKA. Συνοψίζοντας η *Brucella* χρησιμοποιεί το μονοπάτι αυτό του κυττάρου ξενιστή προς όφελος της (Jimenez de Bagues et al, 2005).

6. ΠΑΘΟΓΟΝΟΣ ΔΡΑΣΗ

6.1. Κλινικές εκδηλώσεις

Η βρουκέλλωση έχει ένα ευρύ φάσμα κλινικών εκδηλώσεων γεγονός που την καθιστά έναν απ' τους «μεγάλους μιμητές» (μαζί με τη σύφιλη και τη φυματίωση). Η περίοδος επώασης ποικίλλει από μία εβδομάδα έως δύο με τρεις μήνες αν και έχει αναφερθεί ότι μπορεί να διαρκέσει και δέκα μήνες (Georgiou and Young, 1991). Το μήκος της περιόδου αυτής εξαρτάται από τη λοιμογονικότητα του στελέχους, την ποσότητα του μικροβίου που εισήχθη στον οργανισμό, την πύλη εισόδου και την αντίσταση του ξενιστή. Η μολυσματική δόση, ειδικά για τη *B. melitensis* είναι πολύ χαμηλή (10 μικροοργανισμοί).

Η έναρξη των συμπτωμάτων μπορεί να είναι αιφνίδια, κυρίως όταν το αίτιο είναι η *B. melitensis*, ή να εκδηλωθούν σε μια περίοδο αρκετών ημερών έως και πάνω από μια εβδομάδα. Ποικίλα μη ειδικά συμπτώματα όπως πυρετός, νυχτερινές εφιδρώσεις, ρίγη, κακουχία, σοβαρή κεφαλαλγία, μυαλγίες, αρθραλγίες, ανορεξία και απώλεια βάρους παρατηρούνται στις περισσότερες περιπτώσεις (Memish et al, 2000). Ο δύσοσμος ιδρώτας θεωρείται σχεδόν παθογνωμονικός (Pappas et al, 2005a).

Το πιο συχνό σύμπτωμα είναι ο πυρετός. Πρόκειται για κυματοειδή πυρετό λόγω των περιοδικών κυμάτων που μπορούν να εμφανισθούν σε μια περίοδο εβδομάδων, μηνών ή ακόμα και ετών (Young, 1995). Οι πυρετοί συνήθως εμφανίζονται κατά τη διάρκεια του απογεύματος και της νύχτας, ενώ η θερμοκρασία παραμένει φυσιολογική κατά τη διάρκεια της ημέρας, σε μια περίοδο δύο έως τριών εβδομάδων. Μετά από αυτό μπορεί να ακολουθήσουν αρκετές ημέρες κατά τις οποίες ο ασθενής είναι άπυρετος και αισθάνεται σχετικά καλά μέχρι το επόμενο πυρετικό κύμα.

Η μέγιστη θερμοκρασία συνήθως κυμαίνεται μεταξύ 38-41°C, αλλά μπορεί να είναι και υψηλότερη. Η πτώση της θερμοκρασίας είναι γρήγορη και συνοδεύεται από έντονη εφίδρωση. Η υπερπυρεξία, που εμφανίζεται σε μερικές περιπτώσεις, είναι σημαντική αιτία θανάτου. Αυτή η περιοδική εμφάνιση των συμπτωμάτων οφείλεται στην συγκράτηση του μικροοργανισμού σε κοκκιώματα στους ιστούς και στην επακόλουθη απελευθέρωση του (ή απελευθέρωση συστατικών του όπως το LPS) στην κυκλοφορία.

Σε αντίθεση με την πληθώρα των συμπτωμάτων τα ευρήματα της αντικειμενικής εξέτασης μπορεί να είναι λίγα και συνήθως πρόκειται για ηπατομεγαλία, σπληνομεγαλία και λεμφαδενοπάθεια (Namiduru et al, 2003).

Η βρουκέλλωση ανάλογα με την διάρκεια των συμβατών με αυτή σημείων και συμπτωμάτων διακρίνεται, αν και κάπως αυθαίρετα, σε οξεία (διάρκεια μικρότερη των δύο μηνών), υποξεία (διάρκεια δύο έως δώδεκα μήνες) και χρόνια (διάρκεια μεγαλύτερη του έτους) (Mantur et al, 2007). Η χρόνια βρουκέλλωση οφείλεται συνήθως σε επίμονες εν τω βάθει εστίες όπως διαπυημένες βλάβες οστών, αρθρώσεων, ήπατος, σπλήνα ή νεφρών. Σε αντίθεση, μερικοί ασθενείς παραπονιούνται για καθυστερημένη ανάρρωση, με επίμονα μη ειδικά συμπτώματα, αλλά χωρίς αντικειμενικά σημεία νόσου ή ανεβασμένους τίτλους αντισωμάτων. Η αιτία της κατάστασης αυτής δεν έχει γίνει σαφής, αλλά κάποιοι συγγραφείς πιστεύουν ότι μπορεί να αντιπροσωπεύει προϋπάρχουσα ψυχονευρωτική διαταραχή που επιτείνεται από τη λοίμωξη (Young, 2005).

Το σύνδρομο αυτό των επίμονων αλλαγών στη συμπεριφορά που συνοδεύεται από παθολογικά νευρολογικά σύνδρομα, απώλεια βάρους

και κόπωση, σε απουσία εργαστηριακών ευρημάτων υποτροπής της νόσου μοιάζει εντυπωσιακά με το σύνδρομο χρόνιας κόπωσης (chronic fatigue syndrome-CFS). Πρόκειται για ένα εξίσου ασαφές στην περιγραφή σύνδρομο που παρουσιάστηκε σε βετεράνους μετά τον πρώτο πόλεμο του κόλπου. Η βρουκέλλωση ήταν ενδημική στην εμπόλεμη περιοχή και ο φόβος της εσκεμμένης έκθεσης σε αεροσταγονίδια *Brucella* από το στρατό του Ιρακ, προεξείχε επίσης. Γι' αυτό η νόσος αυτή ήταν από τις πρώτες διαγνώσεις που ενεπλέχθησαν στη μελέτη του CFS, χωρίς ωστόσο να υπάρξουν ακόμη σημαντικές αποδείξεις (Pappas et al, 2006b).

Υπάρχουν αναφορές που συσχετίζουν τα νέα είδη *Brucella*, τα προερχόμενα από τα θαλάσσια θηλαστικά, με ικανότητα πρόκλησης νόσου στον άνθρωπο. Στην Αγγλία, ένας εργαζόμενος σε εργαστήριο μολύνθηκε και κατόπιν ανέπτυξε νόσο γιατί χειριζόταν καλλιεργήματα στελέχους *Brucella* που απομονώθηκε από φώκια (Brew et al, 1999). Τον Απρίλιο του 2003, δημοσιεύτηκε η πρώτη αναφορά ανθρώπινης λοίμωξης στην κοινότητα σχετιζόμενης με στελέχη από θαλάσσια θηλαστικά (Sohn et al, 2003). Συγκεκριμένα σε δύο ασθενείς με νευροβρουκέλλωση και εγκεφαλικά κοκκιώματα, ταυτοποιήθηκαν τα στελέχη αυτά. Επρόκειτο για δύο νέους άνδρες από το Περού και η πηγή της λοίμωξης δεν βρέθηκε. Μια πιθανή πηγή ήταν η κατανάλωση μολυσμένων προϊόντων από θαλάσσια θηλαστικά. Μια άλλη εκδοχή είναι η πιθανή μεταφορά των στελεχών αυτών από άλλα είδη ζώων. Έχει αναφερθεί ορομετατροπή και απόβολή σε βοοειδή πειραματικά μολυνθέντα από στέλεχος *Brucella* προερχόμενο από φώκια (*Phoca vitulina richardsi*). Το στέλεχος αυτό απομονώθηκε και από τα νεκρά έμβρυα αποδεικνύοντας ότι είναι παθογόνο και για τα θαλάσσια θηλαστικά (Rhyan et al, 2001).

Ένα άλλο περιστατικό λοίμωξης στην κοινότητα από θαλάσσιο στέλεχος αφορά έναν ασθενή στη Νέα Ζηλανδία με οστεομυελίτιδα στη σπονδυλική στήλη (McDonald et al, 2006). Στη Νορβηγία, υπάρχει μεγάλη παράδοση κατανάλωσης κρέατος από θαλάσσια θηλαστικά που κατά καιρούς έχουν βρεθεί μολυσμένα με *Brucella*. Ωστόσο, βρουκέλλωση δεν έχει αναφερθεί σε άτομα επαγγελματικά εκτεθειμένα στη Νορβηγία (π.χ. κυνηγούς φώκιας ή φάλαινας). Στην Ιαπωνία επίσης, παρόλο που οι φάλαινες κυνηγιούνται για ανθρώπινη κατανάλωση και βρουκέλλωση έχει αναγνωριστεί σε είδη φαλαινών του Βορειοδυτικού Ειρηνικού ωκεανού, δεν υπάρχει αναφορά τροφογενούς βρουκέλλωσης λόγω κατανάλωσης ωμού κρέατος από τα ζώα αυτά (Godfroid et al, 2005).

6.2. Επιπλοκές

6.2.1. Σκελετικό σύστημα

Η οστεοαρθρική νόσος είναι παγκοσμίως η πιο συχνή επιπλοκή της βρουκέλλωσης. Συνήθως πρόκειται για περιφερική αρθρίτιδα μη διαβρωτική, που αφορά τα γόνατα, τους αγκώνες, τα ισχία και τους καρπούς. Μπορεί να είναι λοιμώδης με μονοαρθρική συμμετοχή και απομόνωση της *Brucella* από το αρθρικό υγρό ή αντιδραστική με συμμετοχή πολλών αρθρώσεων και αποτυχία στην προσπάθεια απομόνωσής της. Οι προσθετικές αρθρώσεις μπορούν επίσης να προσβληθούν στην περιφερική αρθρίτιδα. Ακολουθεί η ιερολαγονίτιδα (Pappas et al, 2005a).

Η τρίτη μορφή οστεοαρθρικής νόσου είναι η σπονδυλίτιδα που προσβάλλει κυρίως την οσφυϊκή μοίρα της σπονδυλικής στήλης. Θεραπεύεται δύσκολα και συχνά έχει σαν αποτέλεσμα υπολειπόμενη βλάβη (Solera et al, 1999). Μια πολύ λιγότερο συχνή επιπλοκή είναι τα επισκληρίδια αποστήματα της σπονδυλικής στήλης που προκαλούν συμπίεση του νωτιαίου μυελού (Ates et al, 2005). Οι οστεοαρθρικές επιπλοκές συνδέονται μερικές φορές με γενετική προδιάθεση και προτείνεται συσχέτιση με το φαινότυπο HLA –B39 (Bravo et al, 2003).

6.2.2. Ηπατοχοληφόρο σύστημα

Επειδή το ήπαρ είναι το μεγαλύτερο όργανο του δικτυοενδοθηλιακού συστήματος, εμπλέκεται σχεδόν σε όλες τις περιπτώσεις βρουκέλλωσης. Ωστόσο η τρανσαμινασαιμία είναι συνήθως ήπια. Ο ίκτερος και το ηπατικό απόστημα είναι σπάνια (Ariza et al, 2001). Το φάσμα των ιστολογικών ευρημάτων στην ηπατίτιδα από *Brucella* ποικίλλει. Η λοίμωξη από *B. abortus* χαρακτηρίζεται από κοκκιώματα. Σε αντίθεση, η *B. melitensis* παράγει βλάβες που ποικίλλουν από μικρές συσσωρεύσεις από μονοπύρρηνα κύτταρα που περιβάλλουν νεκρωτικές εστίες διασκορπισμένες σε όλο το παρέγχυμα έως μια διάχυτη, μη ειδική φλεγμονή που προσομοιάζει με ιογενή ηπατίτιδα. Η *B. suis* μπορεί να προκαλέσει διαπυημένα αποστήματα του ήπατος και του σπλήνα. Οι ηπατικές βλάβες υποστρέφουν με την αντιμικροβιακή θεραπεία και δεν καταλήγουν σε κίρρωση. Άλλες σπανιότερες επιπλοκές είναι η οξεία χολοκυστίτιδα, η παγκρεατίτιδα και η αυθόρμητη βακτηριακή περιτονίτιδα (Young, 2005).

6.2.3. Νευρικό σύστημα

Αν και η κατάθλιψη είναι συνήθης στη βρουκέλλωση, η άμεση εισβολή στο κεντρικό νευρικό σύστημα εμφανίζεται σε λιγότερο από το 5% των περιπτώσεων (Young, 1995). Με πιο συχνή επιπλοκή τη μηνιγγίτιδα (οξεία ή χρόνια) άλλες επιπλοκές είναι η εγκεφαλίτιδα, η μυελίτιδα, το εγκεφαλικό απόστημα, απομυελινωτικά και μηνιγγοαγγειακά σύνδρομα. Η μηνιγγίτιδα μπορεί να εμφανιστεί στην αρχή ή αργότερα στην πορεία της νόσου. Η αυχενική δυσκαμψία εμφανίζεται σε λιγότερο από 50% των περιπτώσεων (Bouza et al, 1987).

Η ανάλυση του εγκεφαλονωτιαίου υγρού (ENY) δείχνει επικράτηση των λεμφοκυττάρων, αυξημένα επίπεδα πρωτεΐνης και χαμηλά έως φυσιολογικά επίπεδα γλυκόζης. Η καλλιέργεια είναι θετική σε λιγότερο από 15% των περιπτώσεων. Η διάγνωση γίνεται με τα ειδικά αντισώματα που βρίσκονται στον ορό και στο ENY (Mantur et al, 2006, Sanchez-Sousa et al, 1990). Η νευροβρουκέλλωση θεωρείται ασυνήθης αιτία παροδικών ισχαιμικών επεισοδίων (Bingol and Togay-Isikay, 2006).

6.2.4. Καρδιαγγειακό σύστημα

Η ενδοκαρδίτιδα εμφανίζεται σε λιγότερο από 2% των περιπτώσεων αλλά ευθύνεται για την πλειοψηφία των θανάτων που σχετίζονται με τη βρουκέλλωση. Η αορτική βαλβίδα προσβάλλεται συχνότερα. Μπορούν να προσβληθούν τόσο οι φυσικές όσο και οι προσθετικές βαλβίδες (Reguera et al, 2003). Συνήθως απαιτείται συνδυασμός θεραπείας με αντιβιοτικά και χειρουργική αντικατάσταση βαλβίδας με ικανοποιητικά αποτελέσματα και βελτίωση της ποιότητας ζωής (Sasmazel et al, 2010).

6.2.5. Ουρογεννητικός σωλήνας

Η ορχεοεπιδιδυμίτιδα είναι η πιο συχνή ουρογεννητική επιπλοκή στους άνδρες και μπορεί να μπερδευτεί με καρκίνο των όρχεων ή φυματίωση (Navarro-Martinez A et al, 2001). Έχει περιγραφεί και περίπτωση προστατικού αποστήματος (Dakdouki and Al Awar, 2005). Αν και η *Brucella* έχει απομονωθεί από τα ούρα ασθενών με βρουκέλλωση, η συμμετοχή των νεφρών είναι ασυνήθης. Διάμεση νεφρίτιδα, εξιδρωματική σπειραματονεφρίτιδα, πυελονεφρίτιδα και IgA νεφροπάθεια έχουν αναφερθεί. Στις γυναίκες, σε σπάνιες περιπτώσεις, έχουν παρατηρηθεί σαλπινγίτιδα, τραχηλίτιδα και πυελικά αποστήματα (Young, 2005). Ασυνήθης εκδήλωση είναι και η ουρολοίμωξη (Mantur et al, 2006).

6.2.6. Αιματολογικές επιπλοκές

Συνήθως παρατηρείται ήπια λευκοπενία με σχετική λεμφοκυττάρωση, ήπια αναιμία και θρομβοπενία (Pappas et al, 2005a). Στο μυελό των οστών ανευρίσκονται μικρά κοκκιώματα στο 75% των περιπτώσεων. Σοβαρή θρομβοπενία με πορφύρα (πιο συχνή σε παιδιά) μπορεί να είναι αποτέλεσμα της παρουσίας αντισταμοπεταλιακών αντισωμάτων, υπερσπληνισμού ή αντιδραστικής αιμοφαγοκυττάρωσης (Young, 2005).

6.2.7. Αναπνευστικό σύστημα

Η συμμετοχή του αναπνευστικού κυμαίνεται από συμπτώματα που μοιάζουν με γρίπη και φυσιολογική ακτινογραφία θώρακος μέχρι βρογχίτιδα, βρογχοπνευμονία, πνευμονικά οζίδια, αποστήματα, κεχροειδείς βλάβες, πυλαία λεμφαδενοπάθεια και πλευριτικές συλλογές (Young, 2005).

6.2.8. Οφθαλμικές επιπλοκές

Η ραγοειδίτιδα είναι γενικά μια καθυστερημένη εκδήλωση αποτελούμενη από χρόνια ιριδοκυκλίτιδα, νομισματοειδή κερατίτιδα, πολυεστιακή χοριοειδίτιδα και οπτική νευρίτιδα. Θεωρείται μη λοιμώδους, ανοσολογικής αιτιολογίας που απαντά στη θεραπεία με κορτικοστεροειδή (Walker et al, 1992). Έχουν επίσης αναφερθεί σπάνιες περιπτώσεις ενδογενούς ενδοφθαλμίτιδας στις οποίες η *Brucella* έχει απομονωθεί από το υαλοειδές σώμα (Al Faran, 1990).

6.3. Η βρουκέλλωση στην παιδική ηλικία

Η βρουκέλλωση στα παιδιά είναι πολύ συχνή ειδικά λόγω *B. melitensis*. Αφορά κυρίως παιδιά σχολικής ηλικίας και συνήθως συνυπάρχουν κρούσματα και σε άλλα μέλη της οικογένειας. Έχει περισσότερο καλοήγη πορεία σε σχέση με τους ενήλικες όσον αφορά τη συχνότητα και τη σοβαρότητα των επιπλοκών και την απάντηση στη θεραπεία. Η πιο συχνή οστεοαρθρική επιπλοκή είναι μονοαρθρίτιδα γόνατος ή ισχίου (Franco et al, 2007). Η λευκή πιτυρίαση σε συνδυασμό με πυρετό είναι σταθερό εύρημα. Μια σπάνια επιπλοκή που έχει αναφερθεί σε παιδί είναι η οξεία παράλυση του αριστερού προσωπικού

νεύρου (Mantur et al, 2007). Αντίθετα η συμμετοχή του ήπατος και οι αιματολογικές επιπλοκές είναι συνήθεις. Η νόσος πρέπει να θεωρείται πιθανή διάγνωση σε παιδιά με πανκυτταροπενία και θρομβοπενική πορφύρα σε ενδημικές περιοχές (Citak et al, 2010).

Στον Πίνακα 4, συνοψίζονται οι κλινικές εκδηλώσεις της ανθρώπινης βρουκέλλωσης (από Pappas et al, 2005a):

Table 3. Clinical Presentation of Human Brucellosis.*

Features	Percentage of Cases
Signs and symptoms	
Fever	91
Constitutive symptoms (e.g., malaise, arthralgias)	26
Hepatomegaly	17
Splenomegaly	16
Lymphadenopathy	7
Complications	
Peripheral arthritis	22 (8 in hips, 7 in knees, 4 in elbows, 4 in wrists, 4 in other locations)†
Sacroiliitis	3
Spondylitis	19 (15 lumbar, 3 dorsal, 1 cervical)
Central nervous system disorders	3
Epididymo-orchitis	5.7‡
Vomiting and diarrhea	3
Respiratory disorders	6
Rashes	3
Cardiovascular disorders	0
Laboratory findings	
Hematologic	49 (40 relative lymphocyto- sis, 5 isolated thrombocyto- penia, 2 isolated leukopenia, 2 pancytopenia)
Transaminasemia	24
Positive blood cultures	16
Rate of relapse	4

* Data are from the most recent 100 patients who received the diagnosis of brucellosis at the University Hospital of Ioannina and whose cases were followed for at least a year.

† Some of the patients had polyarthritis.

‡ Data are for 70 male patients.

6.4. Ειδικές καταστάσεις

6.4.1. Βρουκέλλωση και εγκυμοσύνη

Η *Brucella* μπορεί να προκαλέσει αποβολή αλλά δεν έχει ξεκαθαριστεί αν η συχνότητα είναι μεγαλύτερη σε σχέση με άλλα λοιμογόνα αίτια (στον ανθρώπινο πλακούντα δεν υπάρχει ερυθριτόλη). Η έγκαιρη θεραπεία με αντιβιοτικά (cotrimoxazole ή cotrimoxazole/rifampicin) προστατεύει από ενδεχόμενη αυτόματη αποβολή (Khan et al, 2001). Σε μια τελευταία μελέτη του 2011, η βρουκέλλωση κατά την εγκυμοσύνη δεν επηρεάζει την επίπτωση των συγγενών ανωμαλιών ή τη γέννηση νεκρών εμβρύων. Ο πρόωρος τοκετός και η γέννηση ελλιποβαρών νεογνών μπορεί να είναι επιπλοκές της νόσου. Ο συνδυασμός ceftriaxone/rifampicin ήταν ο πιο αποτελεσματική θεραπεία εγκύων γυναικών με βρουκέλλωση (Gulsun et al, 2011).

6.4.2. Υποτροπές

Οι υποτροπές εμφανίζονται σε ποσοστό περίπου 10% και πιο συχνά εντός 6 μηνών από την αρχική λοίμωξη αν και μπορούν να παρουσιαστούν ακόμη και δύο χρόνια μετά τη θεραπεία. Είναι συνήθως ηπιότερες σε σχέση με την αρχική νόσο και μπορούν να αντιμετωπισθούν με επανάληψη κάποιου από τα συνήθη σχήματα αντιβιοτικών (Solera et al, 1998). Οι περισσότερες περιπτώσεις οφείλονται σε ανεπαρκή θεραπεία ή σχετίζονται με χαρακτηριστικά της αρχικής λοίμωξης όπως διάρκεια νόσου 10 ημερών ή λιγότερο πριν την έναρξη της θεραπείας, ανδρικό φύλο, βακτηριαιμία και θρομβοπενία (Ariza et al, 1995). Η υποτροπή συνήθως δεν οφείλεται σε αντοχή στα αντιβιοτικά γιατί τα στελέχη που απομονώνονται έχουν την ίδια ευαισθησία με το αρχικά απομονούμενο στέλεχος.

6.4.3. Βρουκέλλωση και ανοσοκατασταλμένοι

Αν και είναι γνωστή η σχέση μεταξύ βρουκέλλωσης και ανοσολογικής απάντησης μέσω των T κυττάρων, η νόσος δεν είναι ευκαιριακή λοίμωξη για τους ασθενείς που φέρουν τον ιό της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας (Human immunodeficiency virus-HIV) ή έχουν AIDS, ακόμη και σε ενδημικές περιοχές. Οι περισσότεροι ασθενείς με λοίμωξη από HIV και βρουκέλλωση έχουν καλοήγη κλινική πορεία στα αρχικά στάδια της λοίμωξης, σύμφωνα με τον αριθμό των CD4+ T λεμφοκυττάρων (Moreno et al, 1998).

Ωστόσο, σε ανοσοκατασταλαμένους ασθενείς σε χημειοθεραπεία, παρατεινόμενη εμπύρετη ουδετεροπενία που δεν ανταποκρίνεται σε ευρέως φάσματος αντιβιοτικά μπορεί να υποκρύπτει λοίμωξη από *Brucella*, ειδικά σε ενδημικές περιοχές (Sari et al, 2002).

7. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ

7.1. Μη ειδική

7.2. Ειδική

7.2.1. Καλλιέργεια

Λόγω των ειδικών παθογενετικών χαρακτηριστικών του μικροβίου η βακτηριαμία από *Brucella* μπορεί να είναι ένα παροδικό, αρχικό γεγονός ακολουθούμενο από την είσοδο στα μακροφάγα. Μετά τον ενδοκυττάριο πολλαπλασιασμό, η βακτηριαμία μπορεί να είναι συνεχόμενη ή διαλείπουσα. Καθώς η νόσος εξελίσσεται, τείνει να είναι απύουσα όπως συμβαίνει στην πλειονότητα των περιπτώσεων χρόνιας βρουκέλλωσης. Επιπλέον εκτός του ότι το μικροβιακό φορτίο που απαιτείται για την πρόκληση λοίμωξης μπορεί να είναι εξαιρετικά χαμηλό (10-100 μικροοργανισμοί), η *Brucella* διπλασιάζεται αργά (κατά μέσο όρο σε 2-3h) (Pappas et al, 2007). Τα χαρακτηριστικά αυτά εξηγούν, εν μέρει, τη δυσκολία απομόνωσης του μικροβίου.

Δείγμα: συλλογή και διατήρηση

Η απομόνωση της *Brucella* μετά από καλλιέργεια ισοδυναμεί με απόδειξη της νόσου. Απομονώνεται πιο συχνά κατά την οξεία φάση της λοίμωξης από *B. melitensis* ή *B. suis* και λιγότερο από *B. abortus*. Δείγματα οποιουδήποτε υγρού του σώματος ή ιστού που συλλέγεται χειρουργικά ή κατά τη διάρκεια νεκροψίας μπορούν να καλλιεργηθούν. Δείγματα που πιθανά περιέχουν *Brucella* πρέπει να καλλιεργούνται εντός δύο ωρών μετά τη λήψη ή, αν αυτό δεν είναι δυνατόν, να διατηρούνται σε θερμοκρασία 2-8°C. Τα δείγματα ιστών πρέπει να διατηρούνται υγρά π.χ. προσθέτοντας αρκετές σταγόνες φυσιολογικού ορού. Η *Brucella* σπάνια απομονώνεται από δείγματα που περιέχουν ανταγωνιστική μικροβιακή χλωρίδα (Corbel, 1997).

Συνήθως πρόκειται για δείγματα αίματος και μυελού των οστών. Ιστορικά, η καλλιέργεια μυελού των οστών είναι η μέθοδος αναφοράς ('gold standard') λόγω της μεγάλης συγκέντρωσης του μικροβίου στο δικτυοενδοθηλιακό σύστημα (ΔΕΣ) με αποτέλεσμα μεγαλύτερη ευαισθησία ειδικά σε περιπτώσεις χρόνιας βρουκέλλωσης και όταν ο ασθενής έχει ήδη λάβει θεραπεία με αντιβιοτικά. Επιπλέον, η εξάλειψη του μικροβίου από το μυελό των οστών ισοδυναμεί με εκκρίωση (Gotuzzo et al, 1986).

Απομόνωση από τα συνήθη δείγματα (αίμα-μυελός οστών)

Η εργαστηριακή απόδειξη της βακτηριαιμίας είναι σημαντική γιατί βοηθά στη διαφορική διάγνωση όταν η οροδιάγνωση είναι αρνητική. Επίσης η βακτηριαιμία ενέχει αυξημένο κίνδυνο για υποτροπή, δευτεροπαθή διασπορά και πρόκληση εστιακών επιπλοκών και αυτό πρέπει να ληφθεί υπόψη για την πιθανή τροποποίηση του θεραπευτικού σχήματος (Pappas and Papadimitriou, 2007). Τα δείγματα αίματος που προορίζονται για καλλιέργεια πρέπει να λαμβάνονται κατά τη φάση του πυρετού και κατά προτίμηση όταν η θερμοκρασία ανεβαίνει. Το ποσοστό απομόνωσης μπορεί να βελτιωθεί αν αρκετά δείγματα συλλέγονται κατά τη διάρκεια του εικοσιτετραώρου. Ανάλογα με τις πρακτικές των επιμέρους εργαστηρίων, το μικροβιακό φορτίο του δείγματος και τις μεθόδους που χρησιμοποιούνται το ποσοστό των περιπτώσεων με θετικές καλλιέργειες κυμαίνεται από 15-70% (Alişkan, 2008).

Τα συνήθη δείγματα, αίμα και μυελός των οστών, ενοφθαλμίζονται σε αερόβιες και αναερόβιες φιάλες αιμοκαλλιιεργειών. Όταν πρόκειται για αίμα ενοφθαλμίζονται 20 ml/set για ενήλικα και 1-20 ml/set (ανάλογα με το βάρος σώματος) για παιδιά που μεταφέρονται στο εργαστήριο εντός 2 ωρών σε θερμοκρασία δωματίου. Προτείνεται η λήψη τριών ζευγών/24h. Όταν το δείγμα είναι μυελός των οστών εμβολιάζεται σε φιάλες αιμοκαλλιιεργειών ή σε σωληνάριο του συστήματος λύσης φυγοκέντρησης 1,5 ml και μεταφέρεται στο εργαστήριο εντός 24h σε θερμοκρασία δωματίου (μία λήψη/24h) (Thomson, 2007). Λόγω του αργού ρυθμού ανάπτυξης της *Brucella* οι συμβατικές αιμοκαλλιέργειες πρέπει να επωάζονται στους 37°C για τουλάχιστον 4 εβδομάδες με τυφλές ανακαλλιέργειες ανά 3-5 ημέρες σε κατάλληλο στερεό θρεπτικό υλικό.

Οι συχνές ανακαλλιέργειες μπορούν να αποφευχθούν με τη χρήση του διφασικού συστήματος Castaneda. Η φιάλη καλλιέργειας περιέχει υγρό θρεπτικό υλικό (π.χ. brain heart infusion broth) καθώς και ένα στρώμα του ίδιου υλικού στερεοποιημένο με την προσθήκη 2-3% άγαρ. Κάθε δεύτερη με τρίτη μέρα οι πλευρές του άγαρ πρέπει να ελέγχονται και σε απουσία ανάπτυξης να υγραίνονται ξανά γέρνοντας τη φιάλη (Mantur

and Mangalgi, 2004). Ωστόσο, και με το σύστημα αυτό ανακαλλιέργειες σε στερεό θρεπτικό υλικό πρέπει να γίνονται όταν παρατηρηθεί ανάπτυξη για την αποφυγή μετάπτωσης των αποικιών από την S (smooth) στην R (rough) φάση.

Με τη μέθοδο λύσης φυγοκέντρωσης επιτυγχάνεται οσμωτική ή χημική (π.χ. με σαπωνίνη) λύση των ερυθροκυττάρων, ακολουθούμενη από συγκέντρωση των βακτηρίων με φυγοκέντρωση και άμεσο ενοφθαλμισμό του ιζήματος σε θρεπτικό υλικό. Τα τρυβλία επωάζονται στους 37°C με και χωρίς CO₂ για 7 ημέρες. Η μέθοδος αυτή έχει καλύτερη ευαισθησία και μικρότερο χρόνο ανίχνευσης σε σχέση με το διφασικό σύστημα. Επειδή είναι απλή τεχνολογικά είναι αναμφισβήτητα προτιμότερη από το σύστημα Castaneda για εργαστήρια που δεν έχουν αυτόματα συστήματα αιμοκαλλιιεργειών (Etemadi et al, 1984 ; Mantur and Mangalgi, 2004). Επιπλέον, είχε καλύτερα αποτελέσματα σε σχέση με τον άμεσο ενοφθαλμισμό όταν καλλιιεργήθηκε αρθρικό υγρό (Yagupsky and Peled, 2002). Στον Πίνακα 5 δίνονται συγκριτικά κάποια χαρακτηριστικά των παραπάνω μεθόδων:

	Χρόνος επώασης	Απαιτεί τυφλές ανακαλλιέργειες	Ευαισθησία (στάδιο νόσου)
Ruiz - Castaneda	7 – 21ημέρες	Ναι	70 – 80 % (οξεία) < 50 % (χρόνια)
Μέθοδος λύσης - φυγοκέντρωσης	2- 4 ημέρες	Όχι	> 90 % (οξεία) 70 % (χρόνια)
Καλλιιεργεια μυελού οστών	4 – 7 ημέρες	Ανάλογα με τη μέθοδο-υλικά που χρησιμοποιούνται	97 % (οξεία) 90 % (υποξεία) 50 % (χρόνια)

Πίνακας 5: Χαρακτηριστικά και ευαισθησία των μεθόδων καλλιιεργειών κλινικών δειγμάτων (από Franco et al, 2007).

Τα αυτόματα, ραδιομετρικά ή συνεχούς παρακολούθησης μη ραδιομετρικά συστήματα αιμοκαλλιιεργειών όπως το BACTEC (Becton Dickinson, Germany) ή το BACT/ALERT (BioMerieux, France) έχουν μειώσει την προαναλυτική διαδικασία και βελτιστοποιήσει την παρακολούθηση της ανάπτυξης και την ταχύτητα ανίχνευσης. Ανιχνεύουν τη βακτηριακή ανάπτυξη μετρώντας την επακόλουθη απελευθέρωση CO₂ και θεωρούνται ικανοποιητικά για την απομόνωση της *Brucella* (Ruiz et al, 1997).

Συγκρινόμενη με τις πρώιμες εκδοχές των συστημάτων αυτών, όπως το BACTEC 460 και το BACTEC NR, η μέθοδος της λύσης φυγοκέντρωσης

είχε μειωμένους χρόνους ανίχνευσης αλλά σε κάποιες περιπτώσεις τα αυτόματα συστήματα είχαν καλύτερη ευαισθησία (Kolman et al, 1991). Νεότερες μελέτες όμως με τις πιο σύγχρονες εκδοχές τους, καταδεικνύουν την ικανότητα τους να πετυχαίνουν χρόνους ανίχνευσης που είναι μικρότεροι αυτών της λύσης φυγοκέντρησης (>95% θετικές καλλιέργειες εντός 7 ημερών επώασης) και καλύτερη ευαισθησία (Yagupsky et al, 1997). Σε γενικές γραμμές τα σύγχρονα αυτόματα συστήματα αιμοκαλλιιεργειών μπορούν να ανιχνεύσουν τη *Brucella* εντός του συνήθους χρόνου επώασης (Baron et al, 2005) μειώνοντας το χρόνο απομόνωσης στις 2-4 ημέρες (Baysallar et al, 2006). Η μεγαλύτερη ευαισθησία των σύγχρονων αυτόματων συστημάτων καθιστά την πιο επεμβατική διαδικασία καλλιέργειας μυελού των οστών απαραίτητη μόνο σε περιπτώσεις όπου υπάρχει διαγνωστικό πρόβλημα και οι αιμοκαλλιιεργειες είναι αρνητικές.

Μετά τη θετικοποίηση της καλλιέργειας ακολουθεί ανακαλλιέργεια σε στερεό θρεπτικό υλικό. Η *Brucella* αναπτύσσεται στα περισσότερα υλικά που χρησιμοποιούνται στο εργαστήριο όπως το αιματούχο, το σοκολατούχο, το *Brucella* και το τρυπτικάση σόγια άγαρ (trypticase soy agar-TSA). Κάποια στελέχη αναπτύσσονται και στο MacConkey άγαρ. Επειδή αναπτύσσεται αργά μπορεί να χρειαστούν 48-72h για να εμφανιστούν ορατές αποικίες (Dahook et al, 2003).

Ταυτοποίηση

Λόγω του αποδεδειγμένου κινδύνου εργαστηριακής μετάδοσης της βρουκέλλωσης τα δείγματα που πιθανά είναι θετικά για *Brucella* καθώς και όλοι οι χειρισμοί των καλλιιεργειών πρέπει να γίνονται σε θάλαμο βιολογικής ασφάλειας με πρακτικές βιολογικής ασφάλειας επιπέδου 3 (Biosafety Level 3, BSL-3). Χειρισμοί που μπορεί να δημιουργήσουν αεροσταγονίδια πρέπει όσο γίνεται να αποφεύγονται (Robichaud et al, 2004).

Η *Brucella* μπορεί να ταυτοποιηθεί με βάση μορφολογικά, καλλιιεργητικά και ορολογικά χαρακτηριστικά: Μετά από επώαση 48-72h οι αποικίες είναι μικρές (με διάμετρο $\leq 1\text{mm}$), ημιδιαφανείς, απαλές και εύκολα ομογενοποιούμενες. Στο αιματούχο άγαρ είναι μη αιμολυτικές. Στη χρώση κατά Gram βλέπουμε πολύ μικρά, Gram αρνητικά κοκκοβακτηρίδια. Με εξαίρεση τη *Francisella tularensis* είναι ο πιο μικρός Gram αρνητικός μικροοργανισμός που μπορεί να συναντήσει κανείς στο κλινικό εργαστήριο. Σε κάποιες περιπτώσεις, ειδικά όταν ο αποχρωματισμός είναι ανεπαρκής, μπορεί να φαίνονται Gram θετικά οδηγώντας σε παραπλάνηση (Noviello et al, 2004).

Εκτός από τη μορφολογία στη χρώση Gram οι θετικές δοκιμασίες καταλάσης (με προσθήκη υπεροξειδίου του υδρογόνου 3%), οξειδάσης

(η *Brucella* πρέπει να αναπτύξει χρώμα εντός 10-30 sec από τον ενοφθαλμισμό) και υδρόλυσης της ουρίας συνηγορούν ότι πρόκειται για *Brucella*. Στον Πίνακα 6, περιλαμβάνονται μερικά οξειδάση και ουρεάση θετικά, Gram αρνητικά βακτήρια, από τα οποία, μαζί με τον *Haemophilus* spp., πρέπει να γίνει διαφορική διάγνωση. Η διαφορά στο μέγεθος είναι χρήσιμη στη διάκριση του *Psychrobacter phenylpyruvicus* από τη *Brucella*. Η μορφολογία καθώς και η κινητικότητα είναι χρήσιμες για τη διαφοροποίηση της *Bordetella bronchiseptica* και του *Ochrobactrum anthropi*. Ουρεάση θετικοί βιότυποι *Haemophilus* spp., επιπρόσθετα με την απαίτηση σε παράγοντες V και X (ή μόνο V), διαφέρουν από τη *Brucella* και στο ότι δεν αναπτύσσονται σε αιματούχο άγαρ. Η *Oligella ureolytica* μπορεί να είναι πιο δύσκολο να διακριθεί. Αν και περιγράφεται ως κινητή, η κινητικότητα μπορεί να είναι καθυστερημένη ή δύσκολο να καταδειχθεί. Συνήθως απομονώνεται από ούρα που δεν είναι συνηθισμένη πηγή για τη *Brucella*. Επίσης σε υλικό ζύμωσης-οξειδωσης η *Brucella* παράγει οξύ από την ξυλόζη ενώ η *O.ureolytica* όχι (Lindquist et al, 2007).

Η επιβεβαίωση ότι πρόκειται για αποικία *Brucella* μπορεί να γίνει και ορολογικά με συγκολλητινοαντίδραση σε σωληνάριο ή σε πλάκα χρησιμοποιώντας πολυδύναμο αντιορό. Φτιάχνεται ένα εναιώρημα του απομονωθέντος στελέχους ισοδύναμο με 2 McFarland σε 1% αλατούχο διάλυμα φορμαλίνης. Το εναιώρημα αφήνεται για 24h ώστε να σκοτωθούν οι μικροοργανισμοί και χρησιμοποιείται ως αντιγόνο. Αποικίες σε S-φάση πρέπει να χρησιμοποιούνται για να αποφευχθεί αυτοσυγκόλληση. Η *B. canis* δεν συγκολλάται με αυτό τον αντιορό αλλά η διαδικασία αυτή μπορεί να επιβεβαιώσει ως *Brucella* τα είδη που προκαλούν πιο συχνά ανθρώπινη βρουκέλλωση: *B. melitensis*, *B. abortus* και *B. suis* (Lindquist et al, 2007). Διασταυρούμενες αντιδράσεις με άλλους μικροοργανισμούς όπως *Afipia clevelandensis*, *Francisella tularensis*, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli* O:157, *Xanthomonas maltophilia*, *Salmonella* O:30 και *Yersinia enterocolitica* O:9 έχουν αναφερθεί.

Ταυτοποίηση είδους

Βασίζεται στα ακόλουθα χαρακτηριστικά:

- Ανάγκη για CO₂ : Ο ύποπτος μικροοργανισμός επωάζεται σε Columbia αιματούχο ή σοκολατούχο άγαρ σε ατμόσφαιρα με και χωρίς 5-10% CO₂. Καλύτερη ανάπτυξη παρουσία CO₂ παρατηρείται όταν πρόκειται για *B. abortus* και *B. ovis* (Corbel and MacMillan, 1998).

- Παραγωγή υδρόθειου (H_2S): Το υδρόθειο παράγεται από αμινοξέα που περιέχουν θείο. Μια χάρτινη ταινία οξεικού μολύβδου αναρτάται πάνω από λοξό καλλιέργημα σε σωληνάριο που περιέχει

TABLE 6: Presumptive differentiation of Francisella and Brucella from similar gram-negative genera^a (από Lindquist et al, 2007)

Test	Brucella spp.	F. tularensis	Bartonella spp. ^b	Acinetobacter spp.	Psychrobacter phenylpyruvicus ^c	Oligella ureolytica	Bortetella bronchiseptica	Haemophilus spp. ^d	Ochrobactrum antropi
Oxidase	+	-	-	-	+	+	+	v	+
Urease	+	-	-	-	+	+	+	v	+
Gram stain morphology	Tiny ccb	Very tiny ccb	Thin rob	Broad ccb	Broad ccb	Small to tiny ccb	Thin rod	Small ccb	Medium rod
Specimen source	Blood, bone marrow	Ulcer, wound, blood, aspirates	Blood, bone marrow, lymph node	v	v	Urinary tract	V	Blood, cerebrospinal fluid, other	v
X and/or V factor requirement	-	-	- ^e	-	-	-	-	+	-
Motility	-	-	-	-	-	+	+	-	+

^a +, greater than or equal to 90% positive; -, less than or equal to 10% positive; v, variable (11 to 89% positive); ccb, coccobacilli.

^b Does not include Bartonella bacilliformis, which is the only motile species.

^c Formerly Moraxella phenylpyruvica.

^d Haemophilus spp. requiring X and V factors or V factor only.

^e While not required, X factor (hemin) enhances growth for many strains.

TSA ή Brucella άγαρ. Η ταινία διαβάζεται και αλλάζει καθημερινά για το πολύ 6 ημέρες ή μέχρι η ταινία να μαυρίσει. Πρέπει να αποφεύγεται επαφή της ταινίας με το άγαρ ή την επιφάνεια της αποικίας. Στελέχη *B. abortus*, *B. neotomae* και *B. suis* βιότυπου 1 παράγουν υδρόθειο σε επαρκή ποσότητα για να προκαλέσουν μαύρο χρωματισμό της ταινίας.

- Υδρόλυση ουρίας: Η ουρεάση παράγεται από τα περισσότερα στελέχη αλλά η δραστηριότητα της ποικίλλει σημαντικά μεταξύ των ειδών. Άγαρ ουρίας κατά Christensen σε σωληνάριο ενοφθαλμίζεται με αρκετό υλικό από τις ύποπτες αποικίες και αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά. Σ' αυτό το χρονικό διάστημα θετική αντίδραση (ανάπτυξη κόκκινου χρώματος) θα δώσουν η *B. suis*, η *B. canis* και μερικά στελέχη *B. melitensis*. Η *B. abortus* και τα περισσότερα στελέχη *B. melitensis* θα χρειασθούν επιπλέον επώαση στους 37°C, καθ' όλη τη διάρκεια της νύχτας για δώσουν θετική αντίδραση (Lindquist et al, 2007).
- Ευαισθησία στις χρωστικές: Οι δοκιμασίες ανάπτυξης παρουσία χρωστικών βασίζονται στη βακτηριοστατική τους επίδραση στη *Brucella* που ποικίλλει ανάλογα με το είδος. Χρησιμοποιούνται η βασική φουξίνη και η θειονίνη που προστίθενται συνήθως σε συγκέντρωση 20μg/ml σε κατάλληλο υλικό όπως το Brucella άγαρ. Αφού ενοφθαλμιστεί το ύποπτο μικροβιακό εναιώρημα, τα τρυβλία επωάζονται στους 37°C για 3-4 ημέρες σε ατμόσφαιρα 5-10% CO₂. Εναλλακτικά μπορούν να χρησιμοποιηθούν εμπορικά διαθέσιμες χάρτινες ταινίες εμποτισμένες με τις παραπάνω χρωστικές σε αραιώσεις 1:25.000, 1:50.000 και 1:100.000. Όταν πρόκειται για στέλεχος *Brucella* ευαίσθητο στη χρωστική παρατηρείται ζώνη αναστολής $\geq 4\text{mm}$ γύρω από την ταινία. Η *B. abortus* αναπτύσσεται παρουσία βασικής φουξίνης (εκτός από τον βιότυπο 2 και κάποια στελέχη του βιότυπου 4) αλλά όχι παρουσία θειονίνης. Η *B. melitensis* αναπτύσσεται παρουσία και των δύο χρωστικών. Η *B. suis* αναπτύσσεται μόνο παρουσία θειονίνης αλλά όχι φουξίνης (εκτός από τον βιότυπο 3). Η *B. neotomae* αναστέλλεται από τη βασική φουξίνη καθώς και στελέχη της *B. canis* και *B. onis* (Dahook et al, 2003).
- Ευαισθησία στον φάγο Tbilisi (Tb): Αρκετές κηλίδες εναιωρήματος *Brucella* ενοφθαλμίζονται σε Brucella άγαρ. Μια σταγόνα του φάγου Tbilisi σε RTD (routine test dilution) και μια σε αραιώση 10⁴xRTD προστίθενται στο κέντρο των ενοφθαλμισμένων κηλίδων. Τα τρυβλία επωάζονται στους 37°C σε ατμόσφαιρα 5-10% CO₂ μέχρι 48h. Η *B. abortus* λύεται και στις

δύο συγκεντρώσεις. Το ίδιο ισχύει και για τη *B. neotomae*. Η *B. melitensis* και η *B. suis* δεν λύνονται σε καμία συγκέντρωση (η *B. suis* λύεται μερικά από τον φάγο σε συγκέντρωση $10^4 \times \text{RTD}$) (Dahook et al, 2003).

- Προσδιορισμός της S-(Smooth) ή R-(Rough) φάσης: Η *B. canis* (βρίσκεται σε R-φάση) θα αυτοσυγκολληθεί σε διάλυμα ακριφλαβίνης ενώ η *B. melitensis*, η *B. suis* και η *B. abortus* όχι. Για τη δοκιμασία αυτή εναιωρείται μια μικρή ποσότητα καλλιεργήματος σε μια σταγόνα διαλύματος ουδέτερης ακριφλαβλίνης 1:100.000 και παρατηρείται για πιθανή συγκόλληση (Lindquist et al, 2007).

7.2.2. Ορολογικές μέθοδοι

Οι περισσότεροι ασθενείς με οξεία βρουκέλλωση αναπτύσσουν IgM αντισώματα εναντίον κυρίως του λιποπολυσακχαριδίου (S-LPS), εντός των πρώτων 7-10 ημερών από την έναρξη της νόσου. Ακολουθεί γρήγορα, μετά τη δεύτερη εβδομάδα, η εμφάνιση των IgG και σε μικρότερο βαθμό των IgA αντισωμάτων. Την τρίτη ή την τέταρτη εβδομάδα της νόσου παρατηρούνται οι υψηλότεροι τίτλοι και στην συνέχεια πέφτουν αργά. Ωστόσο, συνήθως τα αντισώματα επιμένουν καθ' όλη τη διάρκεια της ενεργού φάσης της νόσου και σε μερικές περιπτώσεις και για πολύ αργότερα. Στην υποξεία και τη χρόνια βρουκέλλωση, η ορολογική απάντηση συνίσταται σε επίμονη παραγωγή IgG και σε μερικές περιπτώσεις IgA αντισωμάτων. Σε υποτροπή της νόσου παρατηρείται αύξηση των IgG και IgA αντισωμάτων ενώ τα επίμονα υψηλά επίπεδα IgG αντισωμάτων ή η μικρότερη μείωση του τίτλου μετά τη θεραπεία σε ασθενείς χωρίς υποτροπή, έχει συνδυασθεί με εστιακή νόσο (Ariza et al, 1992). Σε μερικούς ασθενείς έχουν βρεθεί και IgE αντισώματα. Στον Πίνακα 7, βλέπουμε την άνοδο των ειδικών ανοσοσφαιρινών ανάλογα με το στάδιο της νόσου:

Στάδια βρουκέλλωσης	IgM	IgG	IgA
Οξεία	↑↑↑↑	↑↑↑ (IgG1 και IgG3)	↑
Χρόνια	∅	↑↑ (IgG1 και IgG4)	↑↑
Υποτροπή	∅	↑↑	↑

Πίνακας 7: Αύξηση των ειδικών αντισωμάτων ανάλογα με το στάδιο της νόσου (από Araj, 1999 και Lulu et al, 1988)

Όπως έχει ήδη αναφερθεί η μέθοδος αναφοράς για τη διάγνωση της βρουκέλλωσης είναι η απομόνωση και ταυτοποίηση του υπεύθυνου βακτηρίου. Ωστόσο η διαδικασία αυτή απαιτεί εργαστήριο με υψηλό επίπεδο ασφάλειας, καλά εκπαιδευμένο προσωπικό και αρκετό χρόνο. Για τους λόγους αυτούς η νόσος συνήθως διαγιγνώσκεται από την ανίχνευση υψηλού επιπέδου αντισωμάτων στον ορό ή σε άλλο βιολογικό υγρό. Μέχρι σήμερα καμιά ορολογική δοκιμασία δεν είναι 100% ακριβής και συνήθως χρησιμοποιείται μια δοκιμασία διαλογής υψηλής ευαισθησίας ακολουθούμενη από επιβεβαιωτική εξέταση υψηλής ειδικότητας (Nielsen and Yu, 2010).

Πρέπει να επισημανθεί ότι τα συνήθη ορολογικά tests ανιχνεύουν αντισώματα εναντίον του S-LPS των στελεχών *Brucella*. Για τη διάγνωση, επομένως, λοιμώξεων από *B. canis* και *B. onis* απαιτείται η χρήση δοκιμασιών που ανιχνεύουν αντισώματα εναντίον πρωτεϊνών της εξωτερικής μεμβράνης ως αντιγόνων, μιας και οι αποικίες των ειδών αυτών βρίσκονται σε rough φάση και κατά συνέπεια δεν μοιράζονται διασταυρούμενα αντιγόνα με τα άλλα είδη (Araj and Kaufman, 1989).

7.2.2.1. Συγκολλητινοαντίδραση Wright (Serum agglutination test-SAT)

Αν και εισήχθη το 1897 από τον Wright και τους συνεργάτες του, παραμένει το πιο δημοφιλές και παγκοσμίως χρησιμοποιούμενο διαγνωστικό εργαλείο για την οροδιάγνωση της βρουκέλλωσης. Ανιχνεύει IgG και IgM αντισώματα έναντι *B. melitensis*, *B. abortus* και *B. suis*. Η αντίδραση γίνεται σε σωληνάρια με διαδοχικές αραιώσεις του ορού του ασθενούς από 1:20 μέχρι 1:1280. Το αντιγόνο που χρησιμοποιείται συνήθως είναι εναιώρημα καλλιεργήματος του στελέχους 1119-3 της *B. abortus*, σε S-φάση, προσαρμοσμένο σε pH 7.2-7.4. Το μείγμα επωάζεται σε υδατόλουτρο στους 37°C για 24 ώρες και εξετάζεται οπτικά η συγκόλληση στο κάτω μέρος των σωληναρίων. Τίτλος συγκόλλησης είναι η μεγαλύτερη αραιώση του ορού που δίνει

συγκόλληση τουλάχιστον 50%. Τετραπλάσια αύξηση στον τίτλο σε διαδοχικά δείγματα που λαμβάνονται με διαφορά 10-15 ημερών υποδεικνύει νόσο. Τίτλος συγκόλλησης $\geq 1:160$ σε ένα δείγμα είναι ενδεικτικός οξείας λοίμωξης (Lindquist et al, 2007). Μικρότεροι τίτλοι αξιολογούνται ανάλογα με το αν πρόκειται για συμπτωματικό ή όχι ασθενή, αν κατοικεί σε αστική ή αγροτική περιοχή όπου ενδημεί ή νόσος και αν υπάρχει επαγγελματική έκθεση.

Η SAT έχει χρησιμοποιηθεί και σε περιπτώσεις ανθρώπινης βρουκέλλωσης από θαλάσσια θηλαστικά. Από τις τρεις αναφερόμενες περιπτώσεις στις δύο ήταν θετική η αντίδραση και στη μία αρνητική (Lindquist et al, 2007).

Η αντίδραση μπορεί να είναι ψευδώς θετική λόγω διασταυρούμενων αντιδράσεων με άλλα παθογόνα: *Francisella tularensis*, *Escherichia coli* O:157, *Salmonella* group N, *Xanthomonas maltophilia*, *Vibrio cholerae* και *Yersinia enterocolitica* O:9 (Corbel et al, 1984). Οι αντιδράσεις αυτές μπορούν να εξαλειφθούν με την προσθήκη EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid-EDTA). Το EDTA αναστέλλει την μη ανοσογενή συγκόλληση που προκαλείται από τη σύνδεση της περιοχής Fc της IgM ανοσοσφαιρίνης με το αντιγόνο της *B. abortus*. Μιας και οι ορολογικές διαγνωστικές μέθοδοι, εκτός λίγων εξαιρέσεων ανοσοενζυμικών τεχνικών, στηρίζονται στην ανίχνευση αντισωμάτων έναντι του S-LPS, το μειονέκτημα των διασταυρούμενων αντιδράσεων είναι κοινό. Επίσης η παρουσία ρευματοειδούς παράγοντα (rheumatoid factor-RF) μπορεί να δώσει ψευδώς θετική την αντίδραση. Ο RF μπορεί να αποσπασθεί από τα ανοσοσυμπλέγματα μειώνοντας την τιμή του pH (Dahook et al, 2003).

Ψευδώς αρνητική μπορεί να είναι η αντίδραση στην αρχή της νόσου, λόγω χαμηλού τίτλου αντισωμάτων, αλλά και εξαιτίας του φαινομένου προζώνης. Το φαινόμενο προζώνης οφείλεται είτε σε περίσσεια αντισωμάτων, οπότε η συγκόλληση γίνεται εμφανής σε μεγαλύτερες αραιώσεις, είτε στην παρουσία ατελώς δεσμευτικών αντισωμάτων στον ορό του ασθενούς. Η προσθήκη αντιανθρώπινης σφαιρίνης εξαλείφει το φαινόμενο αυτό (Young, 1991). Τέλος, πρέπει πάντα να λαμβάνεται υπόψη η πιθανότητα λοίμωξης από *B. canis*.

Συμπερασματικά η συγκολλητινοαντίδραση Wright είναι κατάλληλη για την αρχική διαλογή των ασθενών με συμπτώματα και σημεία οξείας βρουκέλλωσης. Η χρήση της είναι επισφαλής στην περίοδο επώασης της νόσου καθώς και στις επιπλεγμένες και χρόνιες περιπτώσεις.

7.2.2.2. Συγκολλητινοαντίδραση Wright σε πλάκες μικροαραιώσεων (Microagglutination test-MAT)

Είναι μια προσαρμογή της Wright που γίνεται σε πλάκες μικροαραιώσεων. Έχει το πλεονέκτημα ότι χρησιμοποιεί μικρότερους όγκους ορού και αντιδραστήριου και μπορούν να εξεταστούν πολλαπλά δείγματα ταυτόχρονα στην ίδια πλάκα (Baum et al, 1995). Για τη γρήγορη, εντός λεπτών, διάγνωση υπάρχει και η ταχεία συγκολλητινοαντίδραση Wright στην πλάκα στην οποία το εναιώρημα του στελέχους 1119-3 της *B. abortus* είναι χρωματισμένο με κρυσταλλικό ιώδες και στίλβον πράσινο και η τιμή του pH κυμαίνεται από 6.4-7.0.

7.2.2.3. Συγκολλητινοαντίδραση με 2-Μερκαπτοαιθανόλη (2-ME)

Με τη μέθοδο αυτή προσδιορίζεται ο τίτλος των ειδικών IgG αντισωμάτων κατόπιν προσθήκης 0.05M 2-ME στη δράση της οποίας είναι ευαίσθητα τα IgM αντισώματα (Mantur et al, 2007). Τόσο η 2-ME όσο και η διθειοθρεϊτόλη (dithiothreitol-DTT), έχουν την ικανότητα να διασπών τους δισουλφιδικούς δεσμούς με αποτέλεσμα τον αποπολυμερισμό των πενταμερών των IgM αντισωμάτων ενώ δεν επηρεάζουν την συγκολλητική ικανότητα των IgG αντισωμάτων. Επομένως αν παρατηρηθεί συγκόλληση οφείλεται σε IgG αντισώματα. Η DTT είναι καλύτερη από τη 2-ME γιατί είναι άοσμη και δεν ερεθίζει του βλενογόνους (Klein and Behan, 1981).

7.2.2.4. Συγκολλητινοαντίδραση Rose Bengal σε πλάκα ή σε σκληρό χαρτί (Rose Bengal plate or card test)

Πρωτοχρησιμοποιήθηκε στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής σαν γρήγορη δοκιμασία ελέγχου των οικιακών βοοειδών, ειδικά στις ενδημικές περιοχές. Στηρίζεται στη συγκολλητινοαντίδραση του ορού με εναιώρημα κυττάρων *B. abortus* σε S-φάση, χρωματισμένο με Rose Bengal και pH 3.65+/-0.05. Η οξινοποίηση αλλάζει το ηλεκτροστατικό φορτίο τόσο στις ειδικές όσο και στις μη ειδικές συγκολλητίνες από αρνητικό σε θετικό. Καθώς το αντιγόνο συνδέεται πιο σταθερά με την ειδική παρά με τη μη ειδική συγκολλητίνη, η αλλαγή στο φορτίο μπορεί να χαλαρώσει το δεσμό του αντιγόνου με την μη ειδική συγκολλητίνη πιο εύκολα. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα καλύτερη ευαισθησία και ειδικότητα σε σχέση με τη SAT. Επιπλέον, το χαμηλό pH δεν επηρεάζει τη συγκολλητική ικανότητα. Η ευαισθησία της δοκιμασίας κυμαίνεται από 96-100% ανάλογα με το εμπορικό σκεύασμα (Dahook et al, 2003).

Προτιμάται η χρησιμοποίηση αντιγόνου *B. abortus* καθώς έχει καλύτερη ευαισθησία και ειδικότητα συγκρινόμενο με τη *B. melitensis*. Η ταυτόχρονη χρήση και των δύο αντιδραστηρίων δεν πλεονεκτεί έναντι της χρήσης του αντιγόνου της *B. abortus* μόνο (Dabdoob and Abdulla, 2000). Μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για την ταχεία επιβεβαίωση νευροβρουκέλλωσης, αρθρίτιδας, επιδιδυμορχίτιδας και υδροκήλης λόγω *Brucella*, αν η αντίδραση αποβεί θετική στο εγκεφαλονωτιαίο, στο αρθρικό υγρό, στο σπέρμα και στο υγρό της υδροκήλης αντίστοιχα (Mantur et al, 2007).

Ανιχνεύονται ολικά αντισώματα (IgM, IgG και IgA) έναντι *B. melitensis*, *B. abortus* και *B. suis*. Είναι απλή στη εφαρμογή, ταχεία (εντός 5-10 λεπτών) και έχει σχετικά καλά αποτελέσματα στη διάγνωση ασθενών με οξεία βρουκέλλωση, αλλά δίνει υψηλό ποσοστό ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων σε χρόνιες και επιπλεγμένες περιπτώσεις (Araj, 2010). Γενικά οι δοκιμασίες που χρησιμοποιούν εναιώρημα αντιγόνου σε ρυθμιστικό διάλυμα (buffered plate antigen tests) με pH 3.7+/-0.03 έχουν αποδειχθεί χαμηλού κόστους δοκιμασίες ελέγχου με μειωμένες μη ειδικές αντιδράσεις συγκριτικά με τη SAT (Lucero and Bolpe, 1998).

7.2.2.5. Δοκιμή αντιανθρώπινης σφαιρίνης (Coombs)

Ανιχνεύει ατελή ή δεσμευτικά αντισώματα που συνήθως δεν προκαλούν συγκόλληση στις συμβατικές συγκολλητινοαντιδράσεις εκτός και αν είναι παρόντα σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις όπως στην οξεία φάση της νόσου. Ανήκουν κυρίως στα IgG και IgA κλάσματα των ανοσοσφαιρινών. Τα αντισώματα αυτά προσκολλώνται άμεσα και ειδικά στα αντίστοιχα αντιγόνα. Η συγκόλληση επάγεται στη συνέχεια με την προσθήκη αντιανθρώπινης γ-σφαιρίνης (αντιδραστήριο Coombs). Η φυγοκέντρηση σε υψηλές στροφές μπορεί επίσης να επάγει μηχανικά τη συγκόλληση των ατελών αντισωμάτων με συγκρίσιμα αποτελέσματα σε σχέση με την περισσότερο «μπελαλίδικη» δοκιμή Coombs (Dahook et al, 2003).

Δεν είναι κατάλληλη για διαγνωστικά εργαστήρια που δέχονται μεγάλο αριθμό ύποπτων δειγμάτων ορού λόγω του χρόνου (48h) και των αντιδραστηρίων που απαιτούνται. Είναι καλή δοκιμασία για χρόνιες (τα ατελή αντισώματα εμφανίζονται αργότερα στην πορεία της νόσου) καθώς και για επιπλεγμένες περιπτώσεις και χάνει περίπου το 7% των περιπτώσεων σε σχέση με την ELISA (Araj and Awar, 1997).

7.2.2.6. Brucellacapt (Vircell, Granada, Spain)

Βασίζεται σε immunocapture agglutination τεχνική και ανιχνεύει μη συγκολλούντα IgG και IgA αντισώματα αλλά και συγκολλητίνες. Συγκεκριμένος όγκος από κάθε αραιώση του υπό εξέταση ορού προστίθεται σε μικροπλάκα με πηγαδάκια σε σχήμα U προεπικαλυμένα με αντιανθρώπινη ανοσοσφαιρίνη. Αφού προστεθεί και το έγχρωμο εναιώρημα του αντιγόνου (ολόκληρα κύτταρα *B. melitensis* αδρανοποιημένα με φορμαλδεΰδη) η πλάκα επωάζεται για 18-25h στους 37°C πριν διαβαστεί οπτικά για ενδεχόμενη συγκόλληση. Η δοκιμασία αυτή αποτελεί μια πολύτιμη εναλλακτική στη δοκιμή Coombs. Έχει παρόμοια ευαισθησία και ειδικότητα, ειδικά στη διάγνωση χρόνιων και επιπλεγμένων περιπτώσεων, και το πιο σημαντικό είναι ταχύτερη και πιο εύκολη στη εκτέλεση (Orduna et al, 2000).

7.2.2.7. Δοκιμή συνδέσεως συμπληρώματος (Complement fixation test-CFT)

Συνιστάται σαν επιβεβαιωτική δοκιμασία στη διάγνωση της βρουκέλλωσης. Το IgG κλάσμα των αντισωμάτων έναντι της *Brucella* συνδέει έντονα το συμπλήρωμα, το IgM σε μέτριο βαθμό ενώ το IgA όχι. Θεωρείται διαγνωστικό εργαλείο επιλογής ειδικά για την περίοδο της επώασης και στο χρόνιο στάδιο της νόσου όταν τα αποτελέσματα της Wright είναι αρνητικά ή συγκεχυμένα. Μπορεί να ανιχνεύσει δεσμευτικά αντισώματα. Τίτλος $\geq 1:64$ είναι αποδεικτικός οξείας λοίμωξης (Dahook et al, 2003).

7.2.2.8. Ανοσοενζυμική μέθοδος (Enzyme-linked immunosorbent assay-ELISA)

Η ELISA είναι η δοκιμασία επιλογής για επιπλεγμένες, εστιακές και χρόνιες περιπτώσεις βρουκέλλωσης, ειδικά όταν οι άλλες μέθοδοι είναι αρνητικές και η κλινική υποψία έντονη. Μπορεί να ανιχνεύσει είτε ολικά αντισώματα είτε χωριστά IgG, IgM και IgA ανοσοσφαιρίνες, γρήγορα (σε 4-6h), με υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα. Μπορεί επίσης να ανιχνεύσει και IgE αντισώματα καθώς και υποτάξεις των IgG. Η έμμεση ELISA πραγματοποιείται σε μικροπλάκα με 96 πηγαδάκια που είναι προεπικαλυμένα με ποικίλα αντιγόνα κυρίως *B. abortus* και *B. melitensis* (ολόκληρα κύτταρα, S-LPS, πρωτεΐνες της εξωτερικής μεμβράνης και κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες). Είναι μέθοδος εκλογής για τη διάγνωση της νευροβρουκέλλωσης (Araj, 2010).

Για καλύτερη ευαισθησία, τόσο η IgM- όσο και η IgG-ELISA πρέπει να πραγματοποιούνται σε κάθε δείγμα ορού. Ο συνδυασμός τους αυξάνει

την ευαισθησία έως και 100% σε σύγκριση με το 80% της IgM-ELISA. Η απόδοση της IgM-ELISA είναι χαμηλή στις υποξείες και χρόνιες περιπτώσεις σε σύγκριση με την IgG-ELISA (Osoba et al, 2001).

Η ELISA είναι η πιο βοηθητική δοκιμασία για τη διαφοροποίηση των σταδίων της βρουκέλλωσης. Ασθενείς με οξεία λοίμωξη έχουν πολύ υψηλά επίπεδα IgG και σημαντικά επίπεδα IgM και IgA αντισωμάτων. Ασθενείς με χρόνια νόσο έχουν IgG αντισώματα μετρίως αυξημένα. Υγιή άτομα ακόμα και μετά από αρκετό χρονικό διάστημα από την πλήρη ανάρρωση, μπορεί να έχουν ένα χαμηλό τίτλο IgG αντισωμάτων (Magee, 1980).

Ένας αξιόπιστος και ειδικός δείκτης ενεργού νόσου αποτελεί η ανίχνευση με ELISA αντισωμάτων έναντι των κυτταροπλασματικών και περιπλασματικών πρωτεϊνών. Τα αντισώματα αυτά αυξάνονται μόνο στο ενεργό στάδιο της βρουκέλλωσης και είναι καλύτερος προγνωστικός δείκτης σε σχέση με τα αντισώματα έναντι του LPS (Baldi et al, 1996).

Η ανταγωνιστική (competitive) ELISA χρησιμοποιεί μονοκλωνικό αντίσωμα ειδικό για ένα κοινό και επαναλαμβανόμενο επίτοπο της Ο-πολυσακχαριδικής αλυσίδας του S-LPS με αποτέλεσμα να είναι λιγότερο επιρρεπής σε διασταυρούμενες αντιδράσεις. Η sandwich ELISA μπορεί να ανιχνεύσει άμεσα αντιγόνα *Brucella* στο ανθρώπινο αίμα. Έχει ευαισθησία 100% και ειδικότητα 99.5% σε ασθενείς με θετική καλλιέργεια αίματος. Επομένως η απομάκρυνση του παθογόνου από την κυκλοφορία μετά από επιτυχή θεραπεία, μπορεί να αποδειχτεί με αυτή την άμεση μέθοδο ανίχνευσης (Dahook et al, 2003).

Στον πίνακα 8, αποτυπώνεται η καταλληλότητα των κοινών ορολογικών μεθόδων στα διάφορα στάδια της νόσου (από Dahook et al, 2003):

Serological screening test	incubation	acute brucellosis	subacute brucellosis	chronic brucellosis	relapse	negative results post infection
Tube and slide agglutination test	-	++	+	-	±	6 - 24 months
Buffered plate agglutination test	±	+++	++	-	±	6 - 24 months
Complement fixation test	+++	+	++	+++	++	> 24 months
Coombs anti-human globulin test	-	±	++	+++	+++	>> 24 months
IgM ELISA	±	+++	+	-	-	6 - 24 months
IgG ELISA	±	++	+++	+++	+++	>> 24 months
IgA ELISA	-	+	++	+++	+++	> 24 months

7.2.2.9. Έμμεσος ανοσοφθορισμός (Indirect fluorescent antibody test-IFA)

Σε σύγκριση με τις συμβατικές ορολογικές μεθόδους πλεονεκτεί στο ότι μπορεί να ανιχνεύει διαφορετικές τάξεις αντισωμάτων. Ο προς εξέταση ορός, σε υποδιπλάσιες αραιώσεις, αντιδρά με αντιγόνα βρουκέλλας μονιμοποιημένα σε αντικειμενοφόρο πλάκα. Αφού προστεθεί αντιανθρώπινη (αντί-IgM, αντί-IgG και αντί-IgA), σημασμένη με φθορισεΐνη, σφαιρίνη, προσδιορίζεται ο τίτλος που αντιστοιχεί στη μεγαλύτερη αραιώση που δίνει θετικό φθορισμό. Είναι ταχεία δοκιμασία (2-3h) αλλά ενέχει το υποκειμενικό στοιχείο κατά τη μικροσκόπηση καθώς και χαμηλή ευαισθησία και ειδικότητα στην ανίχνευση των IgA αντισωμάτων (Araj et al, 1990).

7.2.2.10. Ραδιοανοσολογική μέθοδος (Radioimmunoassay-RIA)

Έχει υψηλή ευαισθησία και μπορεί να ανιχνεύσει αντισώματα επιτυχώς, συχνά με αρνητικές τις συμβατικές ορολογικές μεθόδους. Χρησιμοποιεί αντιανθρώπινες σφαιρίνες σημασμένες με I^{125} και ανιχνεύει ξεχωριστά IgM, IgG και IgA αντισώματα ανεξάρτητα από τη βιολογική τους δραστηριότητα. Μπορεί να προσφέρει χρήσιμες πληροφορίες για τη διάγνωση πιθανής υποτροπής (Dahook et al, 2003).

Τέλος, υπάρχουν και οι ακόλουθες ταχείες και σχετικά απλές δοκιμασίες που μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν προκαταρκτικές εξετάσεις (field tests) σε απομακρυσμένες περιοχές και σαν point-of-care assays σε μονάδες υγείας (νοσοκομεία και κέντρα υγείας), που δεν έχουν ούτε το εξειδικευμένο προσωπικό αλλά ούτε και τον απαραίτητο εξοπλισμό που απαιτούν οι πιο κλασσικές ορολογικές μέθοδοι:

- Ανοσοχρωματογραφική lateral flow assay (LFA): Ανιχνεύει IgM και IgG αντισώματα χρησιμοποιώντας μια σταγόνα ολικού αίματος ή ορού. Δεν απαιτεί ειδική εκπαίδευση, ερμηνεύεται εύκολα και μπορεί να γίνει δίπλα από το κρεβάτι του ασθενούς εντός 10-15 λεπτών. Η ευαισθησία και η ειδικότητα είναι υψηλή (περισσότερο από 95%) και μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε όλα τα στάδια της νόσου (Mizanbayeva et al, 2009).
- Fluorescence polarization assay (FPA): Ένα δείγμα ορού (ή ολικού αίματος) επωάζεται με το O-πολυσακχαριδικό αντιγόνο της βρουκέλλας που είναι συνδεδεμένο με φθορίζοντα ιχνηθέτη. Η

ευαισθησία της μεθόδου είναι 96% και η ειδικότητα 98%. Είναι γρήγορη (απαιτεί λίγα λεπτά), αλλά χρειάζεται ειδικό εξοπλισμό και αντιδραστήρια γεγονός που αυξάνει το κόστος (Franco et al, 2007).

- Dipstick assay: Ταχεία και αξιόπιστη εναλλακτική δοκιμασία για τη διάγνωση οξείας βρουκέλλωσης (ανιχνεύει IgM αντισώματα). Χρησιμοποιεί ταινίες νιτροκυτταρίνης που περιέχουν το αντιγόνο και μονοκλωνικά αντι-IgM αντισώματα που είναι συνδεδεμένα σε κολλοειδή σωματίδια χρωστικής (Casao et al, 2003).
- Latex agglutination assay: Λευκές κάρτες συγκολλητινοαντιδράσεων περιέχουν έγχρωμα σωματίδια latex επικαλυμένα με λιποπολυσακχαρίδια βρουκέλλας. Αφού προστεθεί σταγόνα ορού παρατηρείται για μακροσκοπική συγκόλληση. Η ευαισθησία καθορίστηκε στο 89.1% και η ειδικότητα στο 98.2% (Abdoel and Smits, 2007).

7.2.3. Μοριακές τεχνικές

7.2.3.1. Άμεση ανίχνευση

Η απομόνωση της *Brucella* από το αίμα ή άλλο κλινικό δείγμα παραμένει η μέθοδος αναφοράς. Ωστόσο, η ευαισθησία της καλλιέργειας είναι χαμηλή σε ασθενείς με υποξεία ή χρόνια νόσο ή αν έχει προηγηθεί χορήγηση αντιβιοτικών πριν τη λήψη των δειγμάτων (Yagupsky, 1999). Οι ορολογικές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται εναλλακτικά, με κύρια τη συγκολλητινοαντίδραση Wright, έχουν ευαισθησία που κυμαίνεται από 65%-95%. Επίσης, η χαμηλή ειδικότητα λόγω διασταυρούμενων αντιδράσεων είναι ένας σημαντικός περιορισμός. Έτσι, μέθοδοι βασισμένοι στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase chain reaction – PCR) έχουν αναπτυχθεί τις τελευταίες δύο δεκαετίες για την ανίχνευση της *Brucella* σε ανθρώπινα δείγματα (Debeaumont et al, 2005).

Οι μοριακές τεχνικές είναι ταχείες, μπορούν να εφαρμοστούν σε ποικίλα κλινικά δείγματα, με δυνατότητα κατάψυξης στους -80°C μέχρι την επεξεργασία τους, έχουν σχετικά υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα καθώς και μειωμένο κίνδυνο μόλυνσης του προσωπικού του εργαστηρίου συγκριτικά με την καλλιέργεια. Οι κυριότεροι περιορισμοί τους αφορούν ψευδώς θετικά και ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα. Ψευδώς θετικά αποτελέσματα μπορεί να προκύψουν από επιμόλυνση από άλλο δείγμα ή από το DNA προηγούμενης αντίδρασης καθώς και λόγω ανίχνευσης

DNA άλλων βακτηρίων όπως το *Ochrobactrum* spp. Τα ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα μπορεί να οφείλονται στη παρουσία αναστολέων, στα δείγματα αίματος κυρίως, όπως είναι το ανθρώπινο DNA, τα αντιπηκτικά, η αιμοσφαιρίνη και ένζυμα π.χ. DNase, RNAase. Επίσης, ένας άλλος παράγοντας είναι η πολύ μικρότερη ποσότητα δείγματος που χρησιμοποιείται στις μοριακές τεχνικές σε σχέση με τα 8-10 ml αίματος των αιμοκαλιεργειών (Zerva et al, 2001; Morata et al, 2003; Navarro et al, 2004; Yu and Nielsen, 2010). Η έλλειψη προτύπωσης των μεθόδων αυτών καθώς και η σχετική πολυπλοκότητα τους, μπορούν να θεωρηθούν παράγοντες που περιορίζουν την αποτελεσματικότητα και την εφαρμογή τους (Queiro-Ortuno et al, 2008).

Η PCR μπορεί να δώσει θετικό αποτέλεσμα 10 ημέρες μετά τον νοσηφθαλμισμό του βακτηρίου (Pappas et al, 2005a) και μπορεί, όπως προαναφέρθηκε, να εφαρμοστεί σε ποικίλα κλινικά δείγματα: αίμα (ολικό αίμα, στιβάδα λευκών, ορός), υγρά παρακεντήσεων (π.χ. εγκεφαλονωτιαίο υγρό, ασκίτικό, πλευριτικό), ιστικά δείγματα, ούρα, σπέρμα κ.α. Το ολικό αίμα και ο ορός είναι τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα (Navarro et al, 2004). Η απομόνωση του DNA είναι το πρώτο βήμα. Μπορεί να γίνει είτε με την εφαρμογή συγκεκριμένων πρωτοκόλλων είτε χρησιμοποιώντας έτοιμα, εμπορικά συστήματα. Τα τελευταία απλοποιούν τη διαδικασία και μειώνουν τον απαιτούμενο χρόνο. Επιτρέπουν επίσης την προτύπωση (standardization) μεταξύ διαφορετικών εργαστηρίων.

Έχουν αναπτυχθεί ποικίλες τεχνικές συμβατικής PCR που χρησιμοποιούν γονιδιακούς στόχους ειδικούς για το γένος *Brucella*. Μιας και η ταυτοποίηση του είδους δεν είναι απαραίτητη για την έναρξη της θεραπείας, μια PCR μεθοδολογία ειδική για το γένος είναι επαρκής. Η πρώτη δημοσιευμένη μελέτη έγινε το 1990 από τους Fekete και συν. Σαν στόχο χρησιμοποίησαν ένα τμήμα 635 bp του γονιδίου που κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη της εξωτερικής μεμβράνης 43 kDa του στελέχους 19 της *B. abortus* (Fekete et al, 1990). Οι εκκινητές (primers) και η αλληλουχία των ζευγών βάσεων του γονιδιακού στόχου δεν δημοσιεύτηκαν ποτέ.

Ο επόμενος γονιδιακός στόχος ήταν το γονίδιο 16S rRNA (Herman and De Ridder, 1992; Romero et al, 1995). Τα ολογονουκλεοτίδια που χρησιμοποιήθηκαν ως εκκινητές από το γονίδιο αυτό της *B. abortus* μπορούν να ταυτοποιούν όλα τα υπόλοιπα είδη καθώς η ομολογία του RNA του γένους πλησιάζει το 100%. Η ειδικότητα της δοκιμασίας εκτιμήθηκε χρησιμοποιώντας DNA από στελέχη με στενή φυλογενετική σχέση με τη *Brucella* και βακτήρια που δίνουν διασταυρούμενες ορολογικές αντιδράσεις. Μόνο το *Ochrobactrum anthropi* έδωσε ψευδώς θετικό αποτέλεσμα. Η χρησιμότητα του στόχου αυτού περιορίζεται στην ταυτοποίηση σε επίπεδο γένους λόγω της υψηλής διατηρησιμότητας της

γονιδιακής αλληλουχίας μεταξύ των ειδών (Gee et al, 2004). Όταν επιλέχθηκαν ζεύγη εκκινητών από την 16S-23S rRNA interspace περιοχή η ειδικότητα ήταν 100%. Οι spacer περιοχές δεν υπόκεινται σε υψηλή πίεση επιλογής, σε αντίθεση με τα δομικά γονίδια, και γι' αυτό παρουσιάζουν ποικιλομορφία στην αλληλουχία των βάσεων που μπορεί να επιτρέψει διαφοροποίηση από μικροοργανισμούς με στενή φυλογενετική σχέση όπως το *O. anthropi* (Dahook et al, 2003).

Το 1992 οι Baily και συν. ανέπτυξαν μια νέα PCR μεθοδολογία που χρησιμοποιεί ως αλληλουχία-στόχο ένα τμήμα 223-bp του γονιδίου που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη BCSP 31 της *B. abortus*. Πρόκειται για μια ανοσογόνο πρωτεΐνη της εξωτερικής μεμβράνης μεγέθους 36 kDa (Baily et al, 1992). Έχει ευρέως χρησιμοποιηθεί στην κλινική πράξη αν και οι εκκινητές B4 και B5 που χρησιμοποιεί έχουν πολλαπλασιάσει και DNA του *O. anthropi*. Ωστόσο, το γεγονός αυτό έχει κλινικά μικρή σημασία καθώς οι λοιμώξεις από *Ochrobactrum* είναι πολύ σπάνιες και αποκτώνται κυρίως ενδονοσοκομειακά από ανοσοκαταστάλμένους ασθενείς (Casanas et al, 2001). Τη μεθοδολογία αυτή χρησιμοποίησε και η πρώτη μελέτη με κλινικά δείγματα από ασθενείς με βρουκέλλωση (Queiro-Ortuno et al, 1997).

Στην πρώτη μελέτη με δείγματα ορού από τους Zerva και συν. το 2001, που επίσης βασίστηκε στην παραπάνω μεθοδολογία, η ευαισθησία με τα δείγματα ορού ήταν πολύ μεγαλύτερη απ' ό,τι με το ολικό αίμα (94% και 61% αντίστοιχα) (Zerva et al, 2001). Αφού η *Brucella* είναι ενδοκυττάριο βακτήριο και το φορτίο στα δείγματα είναι συνήθως μικρό, οι περισσότερες μελέτες για τη διαγνωστική απόδοση της PCR μεθοδολογίας χρησιμοποιούν δείγματα ολικού αίματος με σκοπό τη μείωση των ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων. Ωστόσο, η παρουσία πιθανών αναστολέων στα δείγματα αυτά, όπως αντιπηκτικά (π.χ. EDTA, ηπαρίνη), συστατικά αίμας από τα αιμολυμένα ερυθροκύτταρα και ανθρώπινο DNA, μπορεί να εξηγήσει την μεγαλύτερη ευαισθησία των δειγμάτων ορού στη μελέτη αυτή. Όσον αφορά την προέλευση των παθογόνων νουκλεϊκών οξέων στα δείγματα ορού, πιθανά πρόκειται για προϊόντα αποδόμησης κατά τη διάρκεια της βακτηριαιμίας.

Στον παρακάτω πίνακα, συγκρίνεται η παραπάνω μεθοδολογία με την καλλιέργεια (από McLean et al, 1992; Queiro-Ortuno et al, 1997; Zerva et al, 2001; Morata et al, 2001; Vrioni et al 2004):

	Αίμα		Άλλα δείγματα	
	PCR	Καλλιέργεια	PCR	Καλλιέργεια
Ευαισθησία (%)	97-100	~70	97,1	23,8-29,4
Ειδικότητα (%)	98,3-100	100	94,1	100

Διαφορετικά αποτελέσματα έχουν άλλες μελέτες όπως αυτή των Mitka και συν. του 2007. Εφαρμόστηκαν τέσσερις διαφορετικές PCR μεθοδολογίες με 4.926 δείγματα ολικού αίματος, ορού και στιβάδας λευκών. Τα δείγματα με επιστοίβαση λευκών είχαν ευαισθησία 100%. Η ευαισθησία των δειγμάτων ολικού αίματος κυμαίνονταν από 98-100% ενώ η αντιστοιχη ευαισθησία για τα δείγματα ορού ήταν 95,5-97%, παρόμοια με αυτή των Zerva και συν.

Το γονίδιο μιας άλλης πρωτεΐνης της εξωτερικής μεμβράνης, της Omp-2 της *B. abortus*, πρωτοχρησιμοποιήθηκε ως στόχος το 1995 (Leal-Klevezas et al, 1995). Τα ολιγονουκλεοτίδια που χρησιμοποιήθηκαν ως εκκινητές (JPF/JPR) δεν ανιχνεύουν τους βιότυπους 2, 3 και 4 της *B. suis*, τη *B. canis* και τη *B. onis*. Είναι αξιοσημείωτο ότι αυτή η μέθοδος δεν πολλαπλασιάζει το *O. anthropi* (Zerva et al, 2001) δίνοντας ψευδώς θετικά αποτελέσματα.

Η ανίχνευση του προϊόντος πολλαπλασιασμού των συμβατικών PCR απαιτεί ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης, που είναι μάλλον υποκειμενική και μπορεί να χρειαστεί επιβεβαίωση με ανάλυση dot ή Southern blot, ακόμη και sequencing. Επιπλέον το βρωμιούχο αιθίδιο που χρησιμοποιείται συνήθως στη ηλεκτροφόρηση είναι τοξικό προϊόν (Romero et al, 1995; Queiro-Ortuno et al, 1997; Zerva et al, 2001). Για να ξεπεραστούν οι περιορισμοί αυτοί οι Morata και συν. ανέπτυξαν μια PCR-ενζυμοσυνδετική-ανοσολογική μεθοδολογία (PCR-enzyme-linked immunosorbent assay/PCR-ELISA), στην οποία το προϊόν πολλαπλασιασμού ανιχνεύεται με τη βοήθεια ιχνηθέτη (probe) σημασμένου με βιοτίνη σε μικροπλάκα ELISA (Morata et al, 2003). Χρησιμοποιήθηκαν δείγματα περιφερικού αίματος με ευαισθησία 94,9% και ειδικότητα 96,5%.

Αρκετά ζεύγη εκκινητών έχουν χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση του γένους της *Brucella* (Πίνακας 10). Ωστόσο, μόνο λίγα από τα ζεύγη αυτά σε ανθρώπινα δείγματα. Στη συγκριτική μελέτη σε δείγματα περιφερικού

αίματος των Navarro και συν., η αναλυτική ευαισθησία των εκκινητών των πρωτεϊνών BCSP-31 και Omp-2 της εξωτερικής μεμβράνης B4/B5 και JPF/JPR αντίστοιχα, ήταν μικρότερη από αυτή των εκκινητών του 16S rRNA, F4/R2 (Navarro et al, 2002). Ωστόσο σε μια άλλη συγκριτική μελέτη με τα ίδια ζεύγη εκκινητών που πολλαπλασιάζουν τους ίδιους γονιδιακούς στόχους χρησιμοποιώντας τρία διαφορετικά πρωτόκολλα PCR, το ζεύγος B4/B5 είχε την υψηλότερη ευαισθησία (98%) και το ζεύγος F4/R2 τη χαμηλότερη (53,1%) (Baddour and Alkhalifa, 2008).

Primers	Sequence	Gene target	Amplicon size (bp)	Threshold	Cross-reaction with <i>Ochrobactum anthropi</i>	Ref.
NP	NP	43-kDa outer membrane protein of <i>B.abortus</i>	635	0.1 pg	N1	[8]
B4/B5	TGGCTCGGTTGCC AATATCAA/CGCG CTGCCTTTCAGGTCTG	31-kDa <i>B.abortus</i> protein	223	10 – 100 fg	+\$	[9]
JPF/JPR	GCGCTCAGGCTGC CGACGCAA/ACCA GCCATTGCGGTCGGTA	Membrane extern <i>B.abortus</i> protein (omp-2)	193	0.025 fg	-	[12]
Ba148-167F/ Ba928-948R	TGCTAATACCGTA TGTGCTT/TAACCGCGA CCGGGATGATGTCAA	<i>B.abortus</i> 16S rRNA	800	NT	+	[10]
F4/R2	TCGAGCGCCCGCA AGGGG/AACCATA GTGTCTCCACTAA	<i>B.abortus</i> 16S rRNA	905	80 fg	+	[11]

§Primers not tested by Baily and conworkers [9], although were tested by Da Costa and conworkers [32] and Casanas and conworkers [25]. NP: never published; NT: never tested.

Αντίθετα με τις κλασσικές PCR, η real-time PCR (πραγματικού χρόνου PCR) δεν απαιτεί διαδικασία ανίχνευσης μετά τον πολλαπλασιασμό του στόχου αφού και τα δύο αυτά στάδια γίνονται ταυτόχρονα στο ίδιο σωληνάριο κατά τη διάρκεια της αντίδρασης. Κατά συνέπεια τα αποτελέσματα παίρνονται πολύ γρηγορότερα (σε λιγότερο από δύο ώρες) και μειώνεται ο κίνδυνος επιμόλυνσης (Surucuoglu et al, 2009). Δίνει επίσης τη δυνατότητα ποσοτικοποίησης του βακτηριακού φορτίου που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παρακολούθηση των ασθενών μετά το τέλος της θεραπείας.

Απόδειξη του πολλαπλασιασμού εμφανίζεται κατά τη διάρκεια της αντίδρασης σε πραγματικό χρόνο, με τη χρησιμοποίηση ομογενούς μίγματος αντίδρασης. Στο μίγμα αυτό η φθορίζουσα χρωστική, που

χρησιμοποιείται για την ανίχνευση του προϊόντος πολλαπλασιασμού, περιέχεται στο ίδιο σωληνάριο με τα υπόλοιπα συστατικά της αντίδρασης και συνδέεται με το αμπλικόνιο καθώς αυτό παράγεται. Υπάρχουν διάφορα φθορίζοντα μόρια που μπορούν να χρησιμοποιηθούν στις μεθόδους ανίχνευσης του προϊόντος: α) τα μη ειδικά, που συνδέονται με οποιοδήποτε πολλαπλασιαζόμενο νουκλεϊκό οξύ π.χ. η χρωστική SYBR Green I και β) τα ειδικά, που είναι συνδεδεμένα με ολιγονουκλεοτίδια (probes). Οι probes αυτοί, υβριδοποιούνται σε συγκεκριμένη αλληλουχία βάσεων παρούσα στο αμπλικόνιο. Στη δεύτερη αυτή κατηγορία, ανήκουν: i) οι hydrolysis ή TaqMan probes που η χημεία τους βασίζεται στην 5' → 3' δράση νουκλεάσης της *Thermus aquaticus* (Taq) DNA πολυμεράσης. Χρησιμοποιείται ένας TaqMan probe και φθορισμός εκπέμπεται όταν αποσπαστεί από το προϊόν της αντίδρασης. ii) οι fluorescence resonance energy transfer (FRET) probes, που λειτουργούν μέσω μεταφοράς ενέργειας με αποτέλεσμα την εκπομπή φθορισμού, όταν συνδεθούν στο αμπλικόνιο πολύ κοντά ο ένας με τον άλλο (Dahook et al, 2004). Ο φθορισμός ανχνεύεται από το οπτικό σύστημα ειδικού κυκλοποιητή (π.χ. LightCycler).

Η real-time PCR δίνει ακόμη τη δυνατότητα και ποιοτικής ανάλυσης του σχηματιζόμενου προϊόντος με τη μελέτη της καμπύλης τήξης (melting curve analysis). Η μελέτη της καμπύλης αυτής αυξάνει την ειδικότητα επιβεβαιώνοντας ότι το σήμα φθορισμού κατά τη διάρκεια της αντίδρασης, προέρχεται από το ειδικό προϊόν πολλαπλασιασμού με χαρακτηριστική θερμοκρασία τήξης (melting temperature- T_m) (Queiro-Ortuno et al, 2005).

Η πρώτη μελέτη για την ανίχνευση *Brucella* με real-time PCR έγινε από τους Redkar και συν. το 2001. Χρησιμοποιήθηκε ως γονιδιακός στόχος η αλληλουχία IS711 για την ανίχνευση *B. abortus*, *B. melitensis* και του βιότυπο 1 της *B. suis*. Ακολούθησαν διάφορες μελέτες με ποσοστά ευαισθησίας και ειδικότητας που κυμαίνονταν από 64,7 έως 93,3% και από 94,6-100% αντίστοιχα (Colmenero et al, 2003; Queiro-Ortuno et al, 2005a; Queiro-Ortuno et al, 2005b; Debeaumont et al, 2005; Kattar et al, 2007; Surucuoglu et al, 2009). Στη μελέτη των Surucuoglu και συν., είναι αξιοσημείωτη η διαφορά στο ποσοστό ευαισθησίας της μεθόδου μεταξύ οξείας και χρόνιας νόσου (91,2% και 66% αντίστοιχα) που μπορεί ίσως να εξηγηθεί από το χαμηλό βκτηριακό φορτίο στους ασθενείς της δεύτερης κατηγορίας. Σημαντική επίσης είναι η διαφορά μεταξύ της ευαισθησίας της real-time PCR και της καλλιέργειας αίματος στο σύνολο των ασθενών ανεξάρτητα από τις κλινικές εκδηλώσεις (88% και 36% αντίστοιχα).

Μια ποσοτική real-time PCR με εκκινήτες και TaqMan probe του bcsp 31 γονιδίου αναπτύχθηκε για τη διαφοροποίηση μεταξύ ανενεργούς, οροθετικής και ενεργούς ανθρώπινης βρουκέλλωσης. Η τιμή του cut-off

που μεγιστοποιούσε το ποσοστό ευαισθησίας και ειδικότητας ανάμεσα στην ενεργό και στην παλιά νόσο ήταν 5×10^3 copies/ml (Queiro-Ortuno et al, 2008).

Μια άλλη σημαντική εφαρμογή των μοριακών τεχνικών είναι στην πρόωμη διάγνωση των επιπλοκών, των υποτροπών καθώς και στην εκτίμηση της πορείας της θεραπείας. Στη μελέτη των Morata και συν. του 2001, από τα 34 δείγματα (όχι αίμα) των 32 ασθενών με εστιακές επιπλοκές, τα 33 (97%) ήταν θετικά ενώ η καλλιέργεια είχε ποσοστό ευαισθησίας 29,4% μόνο. Αυτό το χαμηλό ποσοστό σχετίζεται με την ευρεία χρήση αντιβιοτικής θεραπείας λόγω μη υποψίας της νόσου σε ασθενείς χωρίς αιτιολογική διάγνωση. Η real-time PCR έχει εφαρμοστεί σε ENY για τη διάγνωση της νευροβρουκέλλωσης, με ευαισθησία 100%, έναντι 33,3% της καλλιέργειας και 66,6% της συγκολλητινοαντίδρασης Wright (Colmenero et al, 2005). Είναι αξιοσημείωτη η γρήγορη (εντός 24 ωρών) διάγνωση της σπονδυλίτιδας από *Brucella* ακόμη και με αρνητικές τις καλλιέργειες αίματος και τις ορολογικές δοκιμασίες (Navarro-Martinez et al, 2008). Στη μελέτη των Surucuoglu και συν., από τους ασθενείς με εστιακή νόσο η real-time PCR ήταν θετική σε ποσοστό 90%, ενώ η συγκολλητινοαντίδραση Wright και η καλλιέργεια αίματος σε ποσοστό 100% και 40% αντίστοιχα (Surucuoglu et al, 2009).

Η real-time PCR έχει δείξει την παρουσία βακτηριακού DNA σε χαμηλά επίπεδα στον ορό ασθενών που πήραν θεραπεία, με ποσοστό 38,8% εξ' αυτών (7 ασθενείς) να παραμένουν θετικοί ακόμη και 1-2 χρόνια μετά το τέλος της θεραπείας. Απ' αυτούς 4 υποτροπίασαν και 3 όχι (Navarro et al, 2006). Η μεθοδολογία αυτή μπορεί να είναι χρήσιμη στη διάγνωση ασθενών με χρόνια βρουκέλλωση αφού αποκαλύπτει τη μακροχρόνια παραμονή γενετικού υλικού σε ασθενείς με μη εστιακή νόσο που παραπονιούνται για μη ειδικά συμπτώματα και παραμένουν αδιάγνωστοι με τις κλασικές μεθόδους (Castano and Solera, 2009). Στη μελέτη των Mitka και συν., από τους 200 ασθενείς που παρακολουθήθηκαν για ένα χρόνο μετά το τέλος της θεραπείας, οι 17 (8,5%) που υποτροπίασαν, παρέμειναν θετικοί σε όλα τα δείγματα και στις τέσσερις διαφορετικές PCR μεθοδολογίες. Τα αποτελέσματα αυτά καταδεικνύουν ότι το βακτήριο μπορεί να παραμένει στο αίμα ασθενών που έλαβαν θεραπεία για μεγάλο χρονικό διάστημα, πιθανά εντός των μακροφάγων, γεγονός που μπορεί ίσως να εξηγήσει τα υψηλά ποσοστά υποτροπών (Mitka et al, 2007).

7.2.3.2 Ταυτοποίηση-Τυποποίηση

7.3.2.1. PCR ενίσχυσης πολλαπλών στόχων (multiplex PCRs)

Παρά τη μεγάλη γενετική ομολογία μεταξύ των ειδών *Brucella* (>90%) (Verger et al, 1985), αρκετές multiplex PCRs έχουν περιγραφεί για την ταυτοποίηση σε επίπεδο είδους και εν μέρει σε επίπεδο βιότυπου, χρησιμοποιώντας διαφορετικούς συνδυασμούς εκκινητών. Η πρώτη ονομάζεται AMOS PCR (από τα αρχικά των ειδών που ταυτοποιεί, δηλαδή Abortus, Melitensis, Ovis και Suis). Βασίστηκε στον πολυμορφισμό που προκύπτει από την ειδική για τα διαφορετικά είδη, εντόπιση της αλληλουχίας IS711 εντός του χρωμοσώματος και χρησιμοποίησε 5 primers. Ανιχνεύει τους βιότυπους 1, 2 και 4 της *B. abortus*, όλους τους βιότυπους της *B. melitensis*, τον βιότυπο 1 της *B. suis* και τον βιότυπο 1 της *B. ovis* (Bricker et al, 1994). Δεν μπορεί να διαφοροποιήσει επιμέρους βιότυπους εντός του ίδιου είδους.

Μια άλλη PCR μεθοδολογία (Bruce-ladder) μπορεί επιπλέον να ταυτοποιήσει τα είδη *B. canis*, *B. ovis*, *B. neotomae*, *B. ceti*, *B. pinnipedialis*, τους βιότυπους 3,5,6,7 και 9 της *B. abortus*, τους βιότυπους 2, 3, 4 και 5 της *B. suis* καθώς και τα στελέχη των εμβολίων *B. abortus* S19, *B. abortus* RB51 και *B. melitensis* Rev. 1. Ωστόσο δεν μπορεί επίσης να διαφοροποιήσει βιοτύπους του ίδιου είδους (Lpez-Goni et al, 2008). Βασιζόμενη στη Bruce-ladder, μια βελτιωμένη PCR αναπτύχθηκε για τη διαφοροποίηση και των εννέα αναγνωρισμένων ειδών, συμπεριλαμβανομένων και των πρόσφατα περιγεγραμμένων ειδών *B. microti*, *B. inopinata*, *B. ceti* και *B. pinnipedialis*, καθώς και των βιοτύπων τους (Mayer-Scholl et al, 2010).

7.3.2.2. Amplified fragment length polymorphism (AFLP)

Η μέθοδος αυτή δημιουργεί το αποτύπωμα ολόκληρου του γενώματος και βασίζεται στον επιλεκτικό πολλαπλασιασμό με PCR τμημάτων του γενετικού υλικού που προκύπτουν από τη χρήση συγκεκριμένων περιοριστικών ενζύμων. Η διαφοροποίηση φθάνει σε επίπεδο είδους και, σε κάποιες περιπτώσεις, σε επίπεδο ορσμένων βιοτύπων κάνοντας την εφαρμογή της σε επιδημιολογικές μελέτες απίθανη (Whatmore et al, 2005).

7.3.2.3. PCR τυχαία πολλαπλασιασμένου πολυμορφικού DNA (random amplified polymorphic DNA PCR/RAPD-PCR)

Οι εκκινητές, που έχουν μικρό μέγεθος, επιλέγονται αυθαίρετα και στοχεύουν σε μη ειδικές αλληλουχίες με αποτέλεσμα τη δημιουργία του

γενετικού αποτυπώματος του υπο-εξέταση μικροοργανισμού. Σε μια πρόσφατη μελέτη, βασισμένη στη μεθοδολογία αυτή, επιλέχθηκαν 19 primers για την ανάπτυξη μιας multiplex PCR χρήσιμη για την ταχεία ταυτοποίηση της *Brucella* σε επίπεδο είδους και βιοτύπου (Huber et al, 2009).

7.3.2.4. Πολλαπλασιασμός και ανάλυση με περιοριστικά ένζυμα (PCR-restriction fragment length polymorphism/PCR-RFLP)

Το γονίδιο-στόχος, με μεγάλο βαθμό ποικιλομορφίας μεταξύ των ειδών *Brucella*, πολλαπλασιάζεται με PCR και ακολουθεί πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες ώστε να παραχθούν αποτυπώματα περιοριστικών ειδικών πολυμορφικών θέσεων βακτηριακού DNA. Χρησιμοποιήθηκαν διάφορα γονίδια πρωτεϊνών της εξωτερικής μεμβράνης. Το μεγαλύτερο πολυμορφισμό έδειξε το omp2 γονίδιο. Μικρότερης αξίας είναι τα γονίδια omp25 και omp31. Η μέθοδος αυτή μπορεί να διαφοροποιήσει στελέχη σε επίπεδο είδους και, σε κάποιες περιπτώσεις σε επίπεδο βιοτύπου. Έχει περιορισμένη αναλυτική ικανότητα και επιπλέον με την omp25 PCR πολλαπλασιάστηκε και DNA του *Ochrobactrum* (Cutler et al, 2005).

7.3.2.5. Multiple locus variable number of tandem repeats analysis (MLVA)

Βραχείες επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες παρούσες σε διαφορετικές θέσεις (loci) εντός του γενώματος της *Brucella*, δείχνουν μεγάλη ποικιλία στον αριθμό των επαναλήψεων μεταξύ των ειδών και των στελεχών. Ο πολλαπλασιασμός με PCR μιας ομάδας loci, που περιέχουν αυτές τις επαναλήψεις, έχει επιτρέψει το χαρακτηρισμό μεμονωμένων και μοναδικών στελεχών ακόμη και από την ίδια περιοχή. Η μέθοδος αυτή έχει εφαρμογή σε επιδημιολογικές μελέτες για την εντόπιση της πηγής της μόλυνσης. Επιπλέον, μπορεί να αποβεί χρήσιμη για τη διάκριση μεταξύ επαναλοίμωξης και υποτροπής (Al Dahook et al, 2007). Τη μεθοδολογία αυτή χρησιμοποιεί και η τεχνική “Hoof-Prints” (Hypervariable Octameric Oligonucleotide Finger-Prints). Πρόκειται για τεχνική PCR, η οποία βασίζεται στην επανάληψη σε οκτώ περιοχές εντός του γονιδιώματος της *Brucella* της αλληλουχίας “AGGGCAGT”. Έχει μεγάλη διακριτική ικανότητα ακόμη και μεταξύ μη σχετιζομένων στελεχών (Bricker et al, 2003).

Μια multiplex PCR χρησιμοποιώντας οκτώ multi-locus variable number tandem repeat analysis (MLVA) primers μπόρεσε να διακρίνει τη *B. melitensis* από άλλα είδη *Brucella* και επέτρεψε τυποποίηση στελεχών. Χρησιμοποιήθηκε για την ταυτοποίηση επτά επιδημιολογικά

συνδεδεμένων ομάδων στελεχών (clusters) *B. melitensis* και για την εντόπιση της προέλευσης μιας λοίμωξης που αποκτήθηκε εργαστηριακά (Rees et al, 2009).

Αναφέρονται και οι ακόλουθες μέθοδοι μοριακής τυποποίησης (Bricker et al, 2003):

- Arbitrary primed-PCR (AP-PCR)
- Enterobacterial repetitive intergenic consensus sequence-PCR (EPIC-PCR)
- Repetitive intergenic pallindromic sequence-PCR (REP-PCR)

Όλες αυτές οι μέθοδοι είναι περισσότερο απαιτητικές από τις άλλες τεχνικές PCR και απαιτούν ειδικό εξοπλισμό με αποτέλεσμα η χρήση τους να είναι περιορισμένη στο διαγνωστικό εργαστήριο (Yu and Nielsen, 2010).

8. ΘΕΡΑΠΕΙΑ - ΠΡΟΦΥΛΑΞΗ

8.1. Θεραπεία

Για να είναι αποτελεσματική η θεραπεία παίζουν ρόλο αρκετοί παράγοντες όπως: η έγκαιρη έναρξη, ο συνδυασμός φαρμάκων που μπορούν να διεισδύουν εντός των μακροφάγων (η *Brucella* έχει ενδοκυττάρια εντόπιση) και να δρουν στο όξινο ενδοκυττάριο περιβάλλον, καθώς και η παρατεταμένη χορήγησή τους. Η αγωγή με συνδυασμό φαρμάκων είναι απαραίτητη, αφού οι μονοθεραπείες έχουν μη αποδεκτά υψηλά ποσοστά υποτροπής. Παράμετροι όπως η βέλτιστη διάρκεια θεραπείας, το κόστος, η ευκολία στη χορήγηση των φαρμάκων, φαρμακοκινητικοί, φαρμακοδυναμικοί καθώς και τοπικοί λοιμογόνοι παράγοντες πρέπει να συνεκτιμώνται για την επιλογή του θεραπευτικού σχήματος (Pappas et al, 2005; Mantur et al, 2007).

Για την οξεία βρουκέλλωση των ενηλίκων έχουν προταθεί το 1986 από την Παγκόσμια Οργάνωση Υγείας (World Health Organization – WHO) δύο σχήματα. Το από του στόματος σχήμα αποτελείται από 200 mg δοξυκυκλίνης (ένα παράγωγο της τετρακυκλίνης με μεγαλύτερη λιποδιαλυτότητα και μεγαλύτερο χρόνο ημίσειας ζωής στον ορό) σε συνδυασμό με 600-900 mg ριφαμπικίνης ημερησίως για περίοδο έξι εβδομάδων. Η ριφαμπικίνη έχει καλή in vitro δραστηριότητα και καλή ενδοκυττάρια διείσδυση. Μια in vitro μελέτη έχει δείξει ότι η δοξυκυκλίνη και η ριφαμπικίνη διατηρούν επαρκή δραστηριότητα σε pH 5

(το pH των φαγολυσοσωμάτων που περιέχουν το παθογόνο) και ότι η δραστηριότητα της ριφαμπικίνης αυξάνεται σε χαμηλό pH (Akova et al, 1999).

Το εναλλακτικό από του στόματος/παρεντερικό σχήμα αντικαθιστά τη ριφαμπικίνη με 15mg/Kg στρεπτομυκίνη ημερησίως για τις πρώτες 2-3 εβδομάδες της θεραπείας μόνο. Χορήγηση της στρεπτομυκίνης για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα δεν έχει αποδειχθεί ότι είναι πιο αποτελεσματική. Και οι δύο συνδυασμοί αποτελούν τα πιο δημοφιλή σχήματα παγκοσμίως. Ωστόσο το δεύτερο σχήμα με τη στρεπτομυκίνη είναι πιο αποτελεσματικό στην πρόληψη της υποτροπής (Solera et al, 1994). Αυτό μπορεί να οφείλεται σε πιθανή αλληλεπίδραση μεταξύ δοξυκυκλίνης και ριφαμπικίνης. Ο χρόνος ημίσειας ζωής της δοξυκυκλίνης είναι σημαντικά μικρότερος παρουσία ριφαμπικίνης καθώς και η περιοχή κάτω από την καμπύλη (area under the curve – AUC) σε σύγκριση με το συνδυασμό δοξυκυκλίνης-στρεπτομυκίνης (Colmenero et al, 1994).

Η γενταμυκίνη φαίνεται ότι μπορεί να υποκαταστήσει τη στρεπτομυκίνη. Ωστόσο καμιά προοπτική μελέτη δεν έχει συγκρίνει τις αμινογλυκοσίδες και η βέλτιστη δόση καθώς και η διάρκεια της αντίστοιχης θεραπείας πρέπει να καθοριστούν (Solera et al, 1997a). Τα αποτελέσματα μιας τυχαιοποιημένης κλινικής μελέτης που δημοσιεύτηκε πρόσφατα, δείχνουν ότι η χορήγηση γενταμυκίνης για πέντε ημέρες σε συνδυασμό με δοξυκυκλίνη για οκτώ εβδομάδες δεν έχει καλύτερη αποτελεσματικότητα σε σχέση με το κλασσικό σχήμα της χορήγησης στρεπτομυκίνης για δύο εβδομάδες σε συνδυασμό με δοξυκυκλίνη για σαράντα πέντε ημέρες (Roushan et al, 2010). Η παρεντερική χορήγηση της στρεπτομυκίνης απαιτεί είτε εισαγωγή σε νοσοκομείο ή την ύπαρξη επαρκούς δικτύου υγείας που συνήθως απουσιάζουν από τις ενδημικές περιοχές. Από την άλλη πλευρά, η χρήση της ριφαμπικίνης σε περιοχές όπου η βρουκέλλωση ενδημεί, όπου ενδημεί επίσης και η φυματίωση, ενέχει τον κίνδυνο ανάπτυξης αντοχής στη ριφαμπικίνη στην κοινότητα (Pappas et al, 2005a).

Παρά τον αρχικό ενθουσιασμό για τη χρήση της κοτριμοξαζόλης (τριμεθοπρίμη-σουλφομεθοξαζόλη), επακόλουθες συγκριτικές μελέτες απεκάλυψαν υψηλό ποσοστό υποτροπής (Young, 2005). Οι κινολόνες πετυχαίνουν καλές συγκεντρώσεις εντός των φαγοκυττάρων. Διάφοροι συνδυασμοί που περιλαμβάνουν σιπροφλοξασίνη και οφλοξασίνη έχουν δοκιμαστεί κλινικά πετυχαίνοντας παρόμοια αποτελεσματικότητα με τα κλασσικά σχήματα (Karabay et al, 2004). Για τη μοξιφλοξασίνη και τη λεβοφλοξασίνη υπάρχουν μόνο in vitro παρατηρήσεις (Lopez-Merino et al, 2004). Ωστόσο, η μονοθεραπεία με κινολόνη είχε απογοητευτικά αποτελέσματα και πρέπει να χρησιμοποιούνται σε συνδυασμό με άλλα φάρμακα (Akova et al, 1993). Οι μακρολίδες έχουν εξασθενημένη δράση

στο όξινο περιβάλλον των φαγολυσοσωμάτων με αποτέλεσμα να μην είναι χρήσιμες στη θεραπεία της βρουκέλλωσης (Solera et al, 2001). Οι νεότερες κεφαλοσπορίνες, όπως η κεφτριαζόνη, έχουν συνδυασθεί με θεραπευτική αποτυχία και δεν συστήνονται (Lang et al, 1992).

Τριπλά φαρμακευτικά σχήματα έχουν δοκιμασθεί στην προσπάθεια να αποφευχθεί πιθανή υποτροπή καθώς και ανάπτυξη αντοχής στη ριφαμπικίνη σε περιοχές όπου ενδημεί η φυματίωση. Η προσθήκη γενταμυκίνης για τις πρώτες 7-10 ημέρες στο κλασικό από του στόματος σχήμα έχει προταθεί (Solera et al, 1997). Οι Mantur και συν. δεν παρατήρησαν υποτροπή μεταξύ των 93 ασθενών που έλαβαν τριπλή αγωγή με γενταμυκίνη, δοξυκυκλίνη και ριφαμπικίνη (Mantur et al, 2004). Για τους ίδιους λόγους, βελτιωμένοι μέθοδοι μεταφοράς των αντιβιοτικών όπως μικροσφαιρίδια επικαλυμμένα με αντιβιοτικά, έχουν χρησιμοποιηθεί για τη μείωση της διάρκειας, των ανεπιθύμητων ενεργειών και την μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα της θεραπείας (Lecaroz et al, 2006).

Οι τετρακυκλίνες γενικά αντενδείκνυνται στην εγκυμοσύνη και σε παιδιά κάτω των οκτώ ετών. Τόσο η ριφαμπικίνη όσο και η κοτριμοξαζόλη φαίνεται να είναι ασφαλείς για τη θεραπεία της βρουκέλλωσης κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης (Kahn et al, 2001). Σε παιδιά μικρότερα των οκτώ ετών μπορεί να χρησιμοποιηθεί ριφαμπικίνη σε συνδυασμό με κοτριμοξαζόλη ή αμινογλυκοσίδη (Young, 2005).

Για τη θεραπεία των επιπλοκών, πρέπει να δίνεται ιδιαίτερη προσοχή στην ικανότητα διείσδυσης και στη δραστηριότητα των σκευασμάτων στο συγκεκριμένο ιστό που εμπλέκεται. Η επιλογή και η διάρκεια του θεραπευτικού σχήματος πρέπει να εξατομικεύεται και παρατεταμένη θεραπεία χρειάζεται σε επιπλοκές όπως ενδοκαρδίτιδα ή νευροβρουκέλλωση (Franco et al, 2007). Στη νευροβρουκέλλωση, η στρεπτομυκίνη αντενδύκνεται γιατί δεν μπορεί να πετύχει θεραπευτικά επίπεδα στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό. Η παρατεταμένη χορήγηση τριπλού σχήματος (π.χ. δοξυκυκλίνη, ριφαμπικίνη και κοτριμοξαζόλη) χρησιμοποιείται. Η προσθήκη κορτικοστεροειδών δεν έχει αποδεχθεί ότι έχει πάντα ευεργετικό αποτέλεσμα. Για τη θεραπεία της ενδοκαρδίτιδας απαιτούνται βακτηριοκτόνα επίπεδα φαρμάκων. Ο συνδυασμός δοξυκυκλίνης, ριφαμπικίνης και κοτριμοξαζόλης έχει επίσης χρησιμοποιηθεί με επιτυχία (Young, 2005). Αν και περιπτώσεις ενδοκαρδίτιδας έχουν θεραπευτεί μόνο με αντιμικροβιακή αγωγή, χειρουργική παρέμβαση (π.χ. αντικατάσταση βαλβίδας) συνδυαζόμενη με αντιβιοτική θεραπεία είναι η καλύτερη προσέγγιση (Hadjinikolaou et al, 2001). Αποστήματα όπως επισκληρίδιο, εγκεφαλικό ή σπληνικό απαιτούν επίσης χειρουργική αντιμετώπιση αφού συνήθως είναι ανθεκτικά στα αντιβιοτικά. Η σπονδυλίτιδα πρέπει να θεραπεύεται για

τουλάχιστον τρεις μήνες χωρίς η ανωτερότητα κάποιου συγκεκριμένου σχήματος να έχει αποδειχθεί (Pappas et al, 2004).

Η υποτροπή της νόσου μπορεί να αντιμετωπισθεί με επανάληψη ενός από τα συνήθη σχήματα (Pappas et al, 2005a). Έχουν γίνει κάποιες προσπάθειες για την πρόβλεψη της υποτροπής. Οι Ariza και συν., έχουν καθορίσει ως ανεξάρτητους παράγοντες κινδύνου τη «λιγότερο αποτελεσματική» αντιβιοτική θεραπεία, τη θετική αιμοκαλλιέργεια κατά την αρχική νόσο, διάρκεια νόσου 10 ημερών ή λιγότερο πριν την έναρξη της θεραπείας, το ανδρικό φύλλο και αριθμό αιμοπεταλίων $\leq 150.000/\mu\text{l}$ (Ariza et al, 1995). Οι Solera και συν., έχουν προτείνει ένα πολυποίκιλο μοντέλο για την κατάταξη του παράγοντα κινδύνου για υποτροπή εντός 12 μηνών σε ομάδες μικρής (4-5)%, μέσης (32%) και υψηλής (67%) πιθανότητας. Οι ανεξάρτητοι προγνωστικοί παράγοντες ήταν θερμοκρασία 38,3 °C ή υψηλότερη, θετική αιμοκαλλιέργεια και διάρκεια των συμπτωμάτων πριν τη θεραπεία μικρότερη των 10 ημερών (Solera et al, 1998).

Τα ποσοστά αποτυχίας της θεραπείας κυμαίνονται από 4,6%-24% για το από του στόματος σχήμα και από 5%-8% για το από του στόματος/παρεντερικό σχήμα. Η αιτία αποτυχίας παραμένει ασαφής. Μιας και η αντίσταση στα αντιβιοτικά δεν μπορεί να θεωρηθεί σημαντικός παράγοντας, η μη συμμόρφωση του ασθενούς με τη θεραπευτική αγωγή μπορεί να ευθύνεται σε σημαντικό βαθμό. Η σημασία επίσης της ανεύρεσης επίμονα θετικής PCR παρά την «επιτυχή» ή βέλτιστη θεραπεία, πρέπει να αξιολογηθεί (Franco et al, 2007; Mitka et al, 2007).

Η ανάπτυξη αντοχής της *Brucella* δεν έχει ακόμη παρατηρηθεί. Αυτό οφείλεται εν μέρει στην έλλειψη πλασμιδίων. Επιπρόσθετοι λόγοι για τη μη διενέργεια σε ρουτίνα τεστ ευαισθησίας in vitro, είναι η πτωχή συσχέτιση μεταξύ υψηλής in vitro δραστηριότητας και κλινικής αποτελεσματικότητας για πολλά αντιβιοτικά, συμπεριλαμβανομένων των β-λακταμικών και των κινολονών, η έλλειψη καλά καθορισμένων ερμηνευτικών κριτηρίων καθώς και λόγοι ασφάλειας του προσωπικού των εργαστηρίων ((Lindquist et al, 2007). Ωστόσο, η ανάπτυξη αντοχής είναι πιθανή και ειδικά σε περίπτωση εκδήλωσης βιοτρομοκρατίας υπάρχει η πιθανότητα «κατασκευασμένης» αντοχής. Για την ανίχνευση πιθανής αντοχής, στανταρισμένες μέθοδοι μικροαραιώσεων σε ζωμο για την πραγματοποίηση τεστ ευαισθησίας καθώς και αντίστοιχα ερμηνευτικά κριτήρια έχουν καθοριστεί και δημοσιευτεί από το CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute-CLSI).

Medium:	Brucella broth, pH adjusted to 7.1 ± 0.1
Inoculum:	Direct colony suspension in CAMHB ¹ , equivalent to a 0.5 McFarland standard
Incubation:	$35 \pm 2^\circ\text{C}$; ambient air; 48h. Incubation in CO ₂ may be required for growth of some strains of <i>Brucella</i> spp., especially <i>B. abortus</i>
Recommended QC strains:	<i>E. coli</i> ATCC 25922, <i>S. pneumoniae</i> ATCC 49619

(1: cation-adjusted Mueller-Hinton broth)

Πίνακας 9 : Broth microdilution MIC testing conditions and recommended QC strains (από CLSI, 2010).

Ακολούθως παρατίθενται τα αντιβιοτικά που προτείνονται για έλεγχο με τα αντίστοιχα ερμηνευτικά κριτήρια (από CLSI, 2010):

Antimicrobial Agent	MIC Interpretive Standard μg/mL			Comments
	S	I	R	
AMINOGLYCOSIDES				
Gentamicin	≤4	–	–	1
Streptomycin	≤8	–	–	1,2,3
TETRACYCLINES				
Tetracycline	≤1	–	–	1,2
Doxycycline	≤1	–	–	1,2
FOLATE PATHWAY INHIBITORS				
Trimethoprim-sulfamethoxazole	≤2/38	–	–	1,2

- (1): For some organisms/antimicrobial agent combinations, the absence or rare occurrence of resistant strains precludes defining any results categories other than “susceptible”. For strains yielding results suggestive of a “nonsusceptible” category, organism identification and antimicrobial susceptibility test results should be confirmed.
- (2): Incubation of broth in CO₂ may increase the MIC of aminoglycosides and decrease the MIC of tetracyclines, usually by one doubling dilution

- (3): The streptomycin-susceptible breakpoint is $\leq 16 \mu\text{g/mL}$ when the test is incubated in CO_2 and $\leq 8 \mu\text{g/mL}$ when it is incubated in air.
- (4): Organisms that are susceptible to tetracycline are also considered susceptible to doxycycline.

Όλες οι διαδικασίες για την πραγματοποίηση του τεστ ευαισθησίας πρέπει να γίνονται σε συνθήκες βιολογικής ασφάλειας επιπέδου 3 (Biosafety Level -BSL 3), δεδομένου ότι κατά την παρασκευή του εναιωρήματος είναι πιθανή η παραγωγή αεροσταγονιδίων. Εργαστήρια που δεν διαθέτουν τέτοια υποδομή πρέπει να στέλνουν τα στελέχη σε ένα κατάλληλα εξοπλισμένο εργαστήριο αναφοράς (Hindler and Patel, 2007).

Όπως έχει ήδη αναφερθεί η *Brucella* θεωρείται ευαίσθητη στους αντιμικροβιακούς παράγοντες που προτείνονται από τη WHO, με αποτέλεσμα να μην πραγματοποιείται τεστ ευαισθησίας σε ρουτίνα. Οι υποτροπές συνήθως οφείλονται σε ανεπαρκή θεραπεία και σπάνια στελέχη ανθεκτικά σε αντιβιοτικά αποτελούν την αιτία της θεραπευτικής αποτυχίας (Turkmani et al, 2006). Ωστόσο, στελέχη με μειωμένη ευαισθησία στη ριφαμπικίνη και την κοτριμοξαζόλη έχουν αναφερθεί (Baycam et al, 2004; Lopez-Merino et al, 2004; Turkmani et al, 2006). Οι μέθοδοι όμως που χρησιμοποιήθηκαν είχαν το μειονέκτημα της έλλειψης επαρκούς προτύπωσης. Επίσης, τα στελέχη αυτά δεν χαρακτηρίστηκαν από καθοριστές αντοχής ή τυχόν μεταλλάξεις. Γι' αυτό ο ορισμός της αντοχής στη ριφαμπικίνη ή την κοτριμοξαζόλη παραμένει ασαφής (Hindler and Patel, 2007).

Όπως είναι γνωστό, η βακτηριοκτόνος δράση της ριφαμπικίνης οφείλεται στην ικανότητα της να συνδέεται με τη β υπομονάδα της DNA εξαρτώμενης RNA πολυμεράσης, που κωδικοποιείται από το γονίδιο *groB*. Μεταλλάξεις στο γονίδιο αυτό έχουν ανιχνευθεί σε ανθεκτικά στη ριφαμπικίνη στελέχη *Escherichia coli* και *Mycobacterium tuberculosis*. Υπάρχουν επίσης δεδομένα που αποδεικνύουν ότι η προσθήκη ριφαμπικίνης στα υλικά τείνει να μετατρέψει καλλιεργήματα *B. abortus* σε rough και ότι τα στελέχη με αντοχή στη ριφαμπικίνη είναι λιγότερο λοιμογόνα. Γι' αυτό και η ριφαμπικίνη έχει χρησιμοποιηθεί για την δημιουργία του σταθερού, εξασθενημένου στελέχους της *B. abortus* RB51, που χρησιμοποιείται για τον εμβολιασμό των βοοειδών. Οι μεταλλάξεις που έχουν βρεθεί σε δύο περιοχές του *groB* γονιδίου τόσο στο στέλεχος RB51 όσο και σε εργαστηριακά προερχόμενα μεταλλαγμένα στελέχη *Brucella* ανθεκτικά στη ριφαμπικίνη, δεν βρέθηκαν σε στελέχη ευαίσθητα στον παράγοντα αυτό (Marianelli et al, 2004).

Σε μια πρόσφατη μελέτη χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος MLVA (multiple locus variable analysis – MLVA) για τη μοριακή ανίχνευση των *groB* και

gyrA/gyrB/parC/parE μεταλλάξεων, που είχαν περιγραφεί προηγουμένως σε *in vitro* *Brucella* spp. μεταλλάκτες και είχαν σχετισθεί με αντοχή στη ριφαμπικίνη και τις φθοριοροκινολόνες αντίστοιχα. Η απουσία groB μεταλλάξεων σαφώς σχετιζόμενες με αντοχή στη ριφαμπικίνη σε κλινικά στελέχη *B. melitensis*, ενισχύει τη χρησιμοποίηση της ως πρώτη επιλογή για τη θεραπεία πρώτου επεισοδίου βρουκέλλωσης. Ωστόσο, η απουσία topoisomerase II-IV μεταλλάξεων δεν μπορεί να αποκλείσει αντοχή στις φθοριοροκινολόνες λόγω ενδεχόμενης συνεμπλοκής διαφορετικών μηχανισμών (Valdezate et al, 2010).

Στον Πίνακα 12, συνοψίζονται τα δεδομένα για τα αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία της βρουκέλλωσης (από Pappas et al, 2005a).

Antibiotic	Dose	Combinations
Doxycycline	100 mg twice for 6 wk	Doxycycline combined with streptomycin with rifampin, with gentamicin, ori with ciprofloxacin; doxycycline and streptomycin combined with rifampin or trimethoprim-sulfamethoxazole; doxycycline combined with rifampin and trimethoprim-sulfamethoxazole
Streptomycin	15 mg/kg or body weight intramuscularly for 2-3 wk	Streptomycin and doxycyclin; streptomycin and doxycyclin combined with rifampin or trimethoprim- sulfamethoxazole
Rifampin	600-1200 mg/day for 6 wk	Rifampin and doxycycline; rifampin and doxycycline combined with streptomycin or trimethoprim-sulfamethoxazole; rifampin and ofloxacin; rifampin and ciprofloxacin
Gentamicin	5 mg/kg/day in 3 divided intravenous doses for 5-7 days	Gentamicin and doxycycline
Trimethoprim-sulfa-methoxazole	960 mg twice daily for 6 wk	Trimethoprim-sulfamethoxazole combined with doxycycline, with rifampin, or with streptomycin; trimethoprim-sulfamethoxazole and doxycycline combined with streptomycin or with rifampin
Ofloxacin	400 mg twice daily for 6 wk	Ofloxacin and rifampin
Ciprofloxacin	500 mg twice daily for 6 wk	Ciprofloxacin with doxycycline or rifampin

8.2. Πρόληψη – Προφύλαξη

Η πρόληψη της ανθρώπινης βρουκέλλωσης εξαρτάται από τον έλεγχο και την εξάλειψη της νόσου στα οικόσιτα ζώα. Σε περιοχές με χαμηλή επίπτωση ισχύει το καθεστώς της σφαγής κατόπιν θετικού ελέγχου. Ο εμβολιασμός δεν επιτρέπεται γιατί καθιστά αδύνατη τη διάκριση μεταξύ εμβολιασμένου και μολυσμένου ζώου. Η εφαρμογή της τακτικής αυτής δεν είναι εφικτή σε περιοχές με υψηλή επίπτωση. Το κόστος αποζημίωσης των κτηνοτρόφων για τις απώλειες τους θα ήταν πολύ υψηλό. Επίσης, το διαθέσιμο ελεύθερο από βρουκέλλωση ζωικό κεφάλαιο θα ήταν ανεπαρκές. Στην δεύτερη αυτή περίπτωση, η ευρεία χρήση ενός εγκεκριμένου εμβολίου είναι πολύ αποτελεσματική στη μείωση της επίπτωσης σε επίπεδο όπου η σφαγή μετά από θετικό έλεγχο να είναι εφικτή (O'Callaghan and MacMillan, 2002).

Τρία εξασθενημένα ζωντανά εμβόλια χρησιμοποιούνται για τον εμβολιασμό των ζώων. Το στέλεχος Rev-1 της *B. melitensis* χρησιμοποιείται στα αιγοπορόβατα, είναι λοιμογόνο για τον άνθρωπο και αποτελεί συχνή αιτία νόσησης για τους κτηνιάτρους και τους κτηνοτρόφους. Το στέλεχος 19 της *B. abortus* έχει χρησιμοποιηθεί στα βοοειδή με μεγάλη αποτελεσματικότητα. Ένα άγριο μεταλλαγμένο στέλεχος του βιότυπου 1 της *B. abortus*, το RB51, έχει ευρέως αντικαταστήσει το στέλεχος 19 στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής, και φαίνεται να είναι λιγότερο παθογόνο για τον άνθρωπο. Έχει επίσης το πλεονέκτημα ότι δεν αυξάνει τα αντισώματα που ανιχνεύονται με τις συμβατικές ορολογικές μεθόδους (Young, 2005). Όλα τα διαθέσιμα εμβόλια είναι αποτελεσματικά σε συγκεκριμένους ξενιστές και διασταυρούμενη προφύλαξη δεν επιτυγχάνεται εύκολα. Δεν υπάρχει εμβόλιο διαθέσιμο για την προφύλαξη των χοίρων από τη βρουκέλλωση. Το εμβόλιο RB51 έχει δοκιμαστεί με μικτά αποτελέσματα (Cutler et al, 2005). Οι κτηνοτρόφοι πρέπει να ενημερώνονται για τη σημασία του εμβολιασμού και να ενθαρρύνονται προς αυτή την κατεύθυνση με στόχο την προστασία τόσο του ζωικού τους κεφαλαίου όσο και της δημόσιας υγείας.

Από την άλλη πλευρά, δεν θα πρέπει να παραλείπεται η χρησιμοποίηση προστατευτικού ρουχισμού από το ιατρικό και παραϊατρικό προσωπικό κατά τον χειρισμό είτε νεκρών ζώων ή προϊόντων απόβολής καθώς και ύποτων δειγμάτων και καλλιεργημάτων. Οι χειρισμοί που αφορούν τα τελευταία πρέπει να γίνονται σε θάλαμο βιολογικής ασφάλειας με πρακτικές βιολογικής ασφάλειας επιπέδου 3. Η αποφυγή κατανάλωσης μη παστεριωμένων γαλακτοκομικών προϊόντων πρέπει να θεωρείται αυτονόητη για το γενικό πληθυσμό (Mantur et al, 2007).

Το ερώτημα της λήψης ή όχι προφυλακτικής αγωγής προκύπτει συχνά μετά από πιθανή εργαστηριακή έκθεση στη *Brucella*. Δεν υπάρχουν γενικά αποδεκτές πρακτικές σ' αυτές τις περιπτώσεις. Κάποιοι προτείνουν πλήρη θεραπεία έξι εβδομάδων αν η έκθεση ήταν σημαντική (Solera et al, 1997b). Έχουν επίσης αναφερθεί λήψη μόνο δοξυκυκλίνης για μία εβδομάδα αμέσως μετά την έκθεση (Zervos and Bostic, 1997) καθώς και αγωγή τριών εβδομάδων με τον κλασσικό συνδυασμό δοξυκυκλίνης και ριφαμπικίνης (Robishaud et al, 2004).

Προς το παρόν δεν υπάρχει διαθέσιμο, εγκεκριμένο εμβόλιο για τον άνθρωπο. Η γνώση για την παθογένεια της νόσου σε μοριακό επίπεδο είναι ακόμα ατελής και τα εμβόλια που χρησιμοποιούνται στα ζώα παραμένουν λοιμογόνα για τον άνθρωπο (Pappas et al, 2005). Πολυάριθμα εμβόλια έχουν δοκιμαστεί στο παρελθόν, αλλά χωρίς να τύχουν ευρείας αποδοχής. Τέτοια είναι τα προεχόμενα από το στέλεχος 19 της *B. abortus* που χρησιμοποιήθηκαν στην πρώην Σοβιετική Ένωση. Μια ποικιλία από ζωντανά εξασθενημένα στελέχη, όπως το στέλεχος 19BA της *B. abortus* ή 104M της *B. melitensis*, έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί στην πρώην Σοβιετική Ένωση ή στην Κίνα, αντίστοιχα, αλλά με περιορισμένη αποτελεσματικότητα και έντονες αντιδράσεις.

Επιπρόσθετα, ποικίλλα κλάσματα *Brucella* έχουν μελετηθεί, αλλά με ασαφή αποτελεσματικότητα. Μεταξύ αυτών και ένα αδιάλυτο στη φαινόλη κλάσμα *B. abortus* ή *B. melitensis*, το κλάσμα PI, που αποτελείται κυρίως από πεπτιδογλυκάνη, πρωτεΐνες και smooth λιποπολυσακχαρίδια. Αυτό το παρασκεύασμα εμβολίου φαινόταν αποτελεσματικό. Ήταν ανοσογόνο για τον άνθρωπο αλλά προκαλούσε έντονο πόνο τοπικά στο σημείο της ένεσης καθώς και πυρετό μετά τον εμβολιασμό (Hadjichristodoulou et al, 1994). Πλέον δεν παράγεται.

Ένα ιδανικό εμβόλιο για χρήση στον άνθρωπο θα πρέπει να είναι ασφαλές, αποτελεσματικό (ανοσογόνο) και να παρέχει μακροχρόνια προστασία. Η εφαρμογή ενός τέτοιου εμβολίου θα ήταν ευεργετική σε άτομα επαγγελματικά εκτεθειμένα, στον γενικό πληθυσμό που ζει σε ενδημικές περιοχές ή σε περίπτωση βιοτρομοκρατικού σεναρίου καθώς και στο στρατιωτικό προσωπικό σε ενδεχόμενη χρήσης της *Brucella* ως βιολογικού όπλου. Η οδός χορήγησης πρέπει να είναι ικανή να προκαλεί την κατάλληλη ανοσολογική απάντηση αλλά και να λαμβάνει υπόψη πρακτικές παραμέτρους. Ζωντανά εξασθενημένα εμβόλια, εμβόλια που φέρουν υπομονάδες ή βασίζονται σε ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες, εμβόλια που χρησιμοποιούν ως «φορείς» αντιγόνων άλλους μικροοργανισμούς (π.χ. *Lactococcus lactis*) ή περιέχουν DNA είναι υπό μελέτη για την παρασκευή του κατάλληλου ανθρώπινου εμβολίου (Perkins et al, 2010).

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν

α) η αξιολόγηση της εφαρμογής στη διάγνωση της βρουκέλλωσης σε κλινικά δείγματα από ασθενείς με οξεία νόσο (ολικό αίμα και ορός) δύο μοριακών τεχνικών:

α₁. της PCR-ενζυμοσυνδετικής-ανοσολογικής μεθοδολογίας (PCR-enzyme-linked immunosorbent assay/PCR-ELISA) και

α₂. της ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου (Real Time PCR/RT-PCR) μεθοδολογίας

β) η παρακολούθηση με τη μέθοδο της RT-PCR του βακτηριακού DNA πριν, κατά τη διάρκεια και μετά το τέλος της θεραπείας καθώς και η πιθανή συσχέτιση του με την έκβαση και πορεία της νόσου.

2. ΥΛΙΚΟ-ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Πληθυσμός ασθενών

α) Για την εφαρμογή της PCR-ενζυμοσυνδετικής-ανοσολογικής μεθοδολογίας (PCR-enzyme-linked immunosorbent assay/PCR-ELISA) μελετήθηκαν

α₁) 243 ασθενείς με διάγνωση οξείας βρουκέλλωσης, από τους οποίους συλλέχθηκαν δείγματα περιφερικού αίματος, ολικό αίμα και ορός, πριν την έναρξη της θεραπείας με αντιβιοτικά και

α₂) 50 υγιείς δότες αίματος (ομάδα ελέγχου). Τα άτομα της ομάδας ελέγχου ήταν από την ίδια περιοχή, ηλικίας 18-62 ετών και δεν είχαν αντισώματα για *Brucella*. Από τα άτομα αυτά επίσης συλλέχθηκαν δείγματα περιφερικού αίματος (ολικό αίμα και ορός).

Σε όλους τους ασθενείς η **διάγνωση** της οξείας βρουκέλλωσης έγινε από τον Ιανουάριο του 2003 έως τον Δεκέμβριο του 2006 στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ιωαννίνων, που είναι το κύριο Κέντρο Αναφοράς Βρουκελλώσεων για τη βορειοδυτική Ελλάδα, εξυπηρετώντας την αγροτική περιοχή της Ηπείρου με πληθυσμό 600.000. Τα ιστορικά των ασθενών φάνεραν επαγγελματική έκθεση στη *Brucella* – η πλειοψηφία ήταν κτηνίατροι και αγρότες.

Επιδημιολογικά, κλινικά και μικροβιολογικά χαρακτηριστικά του πληθυσμού των ασθενών παρουσιάζονται στον Πίνακα 13.

Η διάγνωση της οξείας βρουκέλλωσης βασίστηκε σε ένα απ' τα ακόλουθα κριτήρια:

- απομόνωση *Brucella* σε καλλιέργεια αίματος ή άλλα κλινικά δείγματα, ή
- παρουσία συμβατής κλινικής εικόνας σε συνδυασμό με υψηλούς τίτλους ειδικών αντισωμάτων, ορομετατροπή ή αύξηση των αντισωμάτων στο δεύτερο ή/και στο τρίτο δείγμα που λήφθηκε 15-20 ημέρες μετά το πρώτο.

Πίνακας 13: Επιδημιολογικά, κλινικά και μικροβιολογικά χαρακτηριστικά του πληθυσμού των 243 ασθενών.

Χαρακτηριστικά	Αριθμός
Αριθμός ασθενών/αρ. δειγμάτων	243/486
Δημογραφικά στοιχεία	
Άνδρες (%)	163 (67)
Γυναίκες (%)	80 (33)
Μέση ηλικία σε έτη (όρια)	46,1 (18 – 91)
Κλινικά χαρακτηριστικά	
Μέση διάρκεια συμπτωμάτων σε ημέρες (όρια)	32,6 (7-60)
Ασθενείς με πυρετό (%)	243 (100)
Ασθενείς με μη εστιακό εμπύρετο σύνδρομο (%)	138 (100)
Ασθενείς με οστεοαρθρικές επιπλοκές (%)	27 (100)
Ασθενείς με λεμφαδενίτιδα (%)	5 (13,5)
Ασθενείς με ορχεοεπιδιδυμίτιδα (%)	7 (13,5)
Διαγνωστικές δοκιμασίες	
Ασθενείς με τίτλο $\geq 1/160$ στη συγκολλητινοαντίδραση Wright (%)	178 (73,2)
Ασθενείς με θετική ELISA (%)	240 (98,7)
Ασθενείς με θετική Rose-Bengal (από 2+ έως >4+) (%)	232 (95,4)
Ασθενείς με θετική αιμοκαλλιέργεια (%)	179 (73,7)

β) Για την εφαρμογή της RT PCR μεθοδολογίας μελετήθηκαν

β₁) 126 ασθενείς με διάγνωση οξείας βρουκέλλωσης, από τους οποίους συλλέχθηκαν δείγματα περιφερικού αίματος, ολικό αίμα και ορός.

Επιδημιολογικά, κλινικά και μικροβιολογικά χαρακτηριστικά του πληθυσμού των 126 ασθενών παρουσιάζονται στον Πίνακα 14.

Από αυτούς για την **παρακολούθηση** του βακτηριακού DNA εξετάστηκαν από έναν υποπληθυσμό 78 ασθενών τουλάχιστον 3 δείγματα *ολικού αίματος*: εκτός από το πρώτο κατά τη διάγνωση, ένα στο τέλος της θεραπείας και τουλάχιστον ένα στην περίοδο παρακολούθησης.

Επιδημιολογικά, κλινικά και μικροβιολογικά χαρακτηριστικά του πληθυσμού των 78 ασθενών παρουσιάζονται στον Πίνακα 15.

β₂) 50 υγιείς αιμοδότες (ομάδα ελέγχου). Οι μάρτυρες ταίριαζαν με βάση την ηλικία και το φύλο και, επίσης, δεν είχαν αντισώματα για *Brucella*.

Σε όλους τους ασθενείς η διάγνωση και παρακολούθηση της οξείας βρουκέλλωσης έγινε την περίοδο 2005-2009 στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ιωαννίνων.

Πίνακας 14. Επιδημιολογικά, κλινικά και μικροβιολογικά χαρακτηριστικά των 126 ασθενών με οξεία βρουκέλλωση

Χαρακτηριστικά	Αριθμός
Αριθμός ασθενών / Αριθμός δειγμάτων	126 / 252
Δημογραφικά στοιχεία	
Άνδρες (%)	84 (67)
Γυναίκες (%)	42 (33)
Μέση ηλικία σε έτη (όρια)	46.1 (18-91)
Κλινικά χαρακτηριστικά	
Μέση διάρκεια συμπτωμάτων σε ημέρες (όρια)	32.6 (7-60)
Ασθενείς με πυρετό (%)	126 (100)
Ασθενείς με πυρετό χωρίς εντοπισμένη νόσο (%)	100 (79)
Ασθενείς με προσβολή οστών – αρθρώσεων (%)	14 (11)
Ασθενείς με λεμφαδενίτιδα (%)	17 (13.5)
Ασθενείς με ορχεο-επιδιδυμίτιδα (%)	6 (7)
Διαγνωστικές δοκιμασίες	
Ασθενείς με τίτλο δοκιμασίας Wright $\geq 1/160$ (%)	92 (73)
Ασθενείς με θετική Rose-Bengal (από 2+ έως > 4+) (%)	120 (95.2)
Ασθενείς με θετική ELISA (%)	124 (98.4)
Ασθενείς με θετική αιμοκαλλιέργεια (%) / ασθενείς με δείγμα αιμοκαλλιέργειας	60 (69.8) / 86

Πίνακας 15: Δημογραφικά χαρακτηριστικά, κλινικά και μικροβιολογικά ευρήματα του υποπληθυσμού των 78 ασθενών.

Χαρακτηριστικά/κλινικά-μικροβιολογικά ευρήματα	Ασθενείς
Αρ. ασθενών/αρ. δειγμάτων που μελετήθηκαν	78/328
Δημογραφικά χαρακτηριστικά	
Ανδρες (%)	60 (77)
Γυναίκες (%)	18 (23)
Μέση ηλικία σε έτη (όρια)	41 (16-78)
Κλινικά χαρακτηριστικά	
Μέση διάρκεια συμπτωμάτων σε ημέρες (όρια)	32 (7-270)
Πυρετός (%)	72 (92,3)
Μη ειδικά συμπτώματα (%)	46 (59)
Οστεοαρθρικές επιπλοκές (%)	32 (41)
Ηπατο/σπληνομεγαλία (%)	14 (18)
Ορχεοεπιδιδυμίτιδα (%)	6 (10)
Επιπλοκές από το ΚΝΣ (%)	4 (5)
Διαγνωστικές δοκιμασίες	
Ασθενείς με τίτλο $\geq 1:160$ στη Wright (%)	72 (92)
Ασθενείς με (+) RBP test (από 2+ -4+) (%)	74 (95)
Ασθενείς με θετική ELISA (%)	78 (100)
Ασθενείς με θετική αιμοκαλιέργεια (%) /ασθενείς με δείγμα αιμοκαλιέργειας	26 (54) /48

(Υποσημείωση: Τα στοιχεία είναι αριθμός και ποσοστό (%) ασθενών.

RBP: Rose Bengal plate)

Η διάγνωση της οξείας βρουκέλλωσης βασίστηκε στα κριτήρια που αναφέρθηκαν παραπάνω.

Η φάση παρακολούθησης μετά τη θεραπεία κυμαινόταν από 2 μέχρι 26 μήνες.

Έξι ασθενείς υποτροπίασαν κατά τη διάρκεια της περιόδου παρακολούθησης.

Από τους 78 ασθενείς:

- 60 αντιμετώπισθηκαν με το σταθερό σχήμα doxycycline και rifampin
- 14 με doxycycline και ciprofloxacin
- 2 με moxalactam και
- 2 με doxycycline και streptomycin.

Η διάρκεια της θεραπείας ήταν:

- 6 εβδομάδες για όλους εκτός από 8 ασθενείς
 - 4 ασθενείς πήραν θεραπεία για 12 εβδομάδες
 - δύο με doxycycline και rifampin και
 - δύο με doxycycline και ciprofloxacin, και
 - 4 ασθενείς πήραν θεραπεία για 6 μήνες
 - δύο με doxycycline και ciprofloxacin και
 - δύο με doxycycline και rifampin.

Ανάλυση της εξέλιξης του βακτηριακού φορτίου DNA έγινε:

- κατά την αρχική διάγνωση
- στο τέλος της θεραπείας και
- κατά τη διάρκεια της περιόδου παρακολούθησης (2, 6, 12-24 και 24-36 μήνες μετά το τέλος της θεραπείας).

2.2. Μέθοδοι

2.2.1. Κλασσικές Μικροβιολογικές Τεχνικές

2.2.1.1. Ορολογικές Τεχνικές

Οι ορολογικές εξετάσεις περιελάμβαναν:

- συγκολλητινοαντίδραση Rose-Bengal σε πλάκα (RBP)
- συγκολλητινοαντίδραση Wright
- ανοσοενζυμική μέθοδο ELISA που ανιχνεύει IgM, IgG και IgA αντισώματα

Οι εξετάσεις αυτές έγιναν σε όλα τα δείγματα ασθενών και μαρτύρων. Η συγκολλητινοαντίδραση Rose-Bengal σε πλάκα (RBP) και η συγκολλητινοαντίδραση Wright έγιναν σύμφωνα με τεχνικές που περιγράφηκαν προηγουμένως (Alton et al, 1975). Η ανοσοενζυμική μέθοδος (ELISA) έγινε σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (SERION ELISA classic Brucella IgG/IgM/IgA, Institut Virion\Serion, Germany).

2.2.1.2. Καλλιεργητικές τεχνικές

Καλλιέργειες αίματος έγιναν μόνο σε δείγματα ασθενών και συγκεκριμένα:

- στους 243 ασθενείς που μελετήθηκαν με την PCR-ELISA μεθοδολογία
- σε 86 ασθενείς που μελετήθηκαν με την RT-PCR μεθοδολογία, εκ των οποίων οι 48 ανήκαν στον υποπληθυσμό των 78 ασθενών.

Για τις αιμοκαλλιέργειες χρησιμοποιήθηκε το σύστημα συνεχούς παρακολούθησης BacT/Alert (bioMerieux, USA) σύμφωνα με τις προκαθορισμένες τεχνικές (Yagupsky, 1999; Solomon and Jackson, 1992). Οι φιάλες των αιμοκαλλιεργειών παρακολουθούνταν από το σύστημα BacT/Alert για 10 συνεχείς ημέρες.

Σε περίπτωση που το σύστημα δεν ανίχνευε κάποια ανάπτυξη, οι φιάλες μεταφέρονταν σε συμβατικό κλίβανο για 10 επιπλέον ημέρες. Τη δεκάτη και εικοστή ημέρα γίνονταν τυφλές ανακαλλιέργειες σε βρουκέλλα άγαρ (BBL, Becton Dickinson, USA), που επωάζονταν στους 37°C σε ατμόσφαιρα CO₂ 5-10% για 3 ημέρες (Yagupsky, 1999; Solomon and Jackson, 1992). Σε περίπτωση ανάπτυξης, οι ύποπτες αποικίες ταυτοποιούνταν από τη μορφολογία τους, τη χρώση Gram, τις

δοκιμές οξειδάσης, καταλάσης και ουρεάσης, και τη θετική συγκολλητινοαντίδραση με ειδικούς αντιορούς. Η ταυτοποίηση του είδους της *Brucella* πραγματοποιούνταν ακολουθώντας τις καθιερωμένες μικροβιολογικές διαδικασίες (Lindquist et al, 2007).

2.2.2. Μοριακές τεχνικές

2.2.2.1. Απομόνωση του βακτηριακού DNA από κλινικά δείγματα αίματος

Δείγματα περιφερικού αίματος συλλέγονταν σε σωληνάρια με αντιπηκτικό EDTA και χωρίς αντιπηκτικό. Η απομόνωση του DNA έγινε και από τους δύο τύπους δειγμάτων, ολικό αίμα (200 μl) και ορός (200 μl), με το QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA). Το kit συνδυάζει τις επιλεκτικές ιδιότητες συγκράτησης των γελών πυριτίου με στάδιο μικροφυγοκέντρωσης.

Σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή ακολουθούνταν τα παρακάτω στάδια:

1. Λύση των κυτταρικών μεμβρανών σε θερμοκρασία δωματίου, με την προσθήκη σε ένα πωματιζόμενο πλαστικό σωληνάριο μικροφυγοκέντρωσης 1,5 ml (eppendorf tube), 20 μl πρωτεΐνάσης K και 200 μl δείγματος
2. Προσθήκη 200 μl ρυθμιστικού διαλύματος (buffer AL) και ισχυρή ανάδευση για 15 δευτερόλεπτα (vortex)
3. Επώαση για 10 λεπτά στους 56°C
4. Σύντομη φυγοκέντρωση για την απομάκρυνση μικροσταγονιδίων από την εσωτερική πλευρά του πώματος του σωληναρίου
5. Προσθήκη 200 μl αιθυλικής αλκοόλης καθαρότητας 96-100% και ισχυρή ανάδευση για 15 sec
6. Σύντομη φυγοκέντρωση για την απομάκρυνση μικροσταγονιδίων από την εσωτερική πλευρά του πώματος του σωληναρίου
7. Προσεκτική μεταφορά του μείγματος από το προηγούμενο στάδιο στην ειδική στήλη πυριτίου (silica column) (που περιέχεται σε σωληνάριο συλλογής 2 ml) και φυγοκέντρωση στις 8000 rpm για 1 λεπτό

8. Τοποθέτηση της στήλης σε νέο σωληνάριο συλλογής, όγκου 2 ml
9. Προσεκτικό άνοιγμα της στήλης, προσθήκη 500 μl ρυθμιστικού διαλύματος (buffer AW1) και φυγοκέντρηση στις 8000 rpm για 1 λεπτό
10. Τοποθέτηση της στήλης σε νέο σωληνάριο συλλογής, όγκου 2 ml
11. Προσεκτικό άνοιγμα της στήλης, προσθήκη 500 μl ρυθμιστικού διαλύματος (buffer AW2) και φυγοκέντρηση στη μέγιστη ταχύτητα (14.000 rpm) για 3 λεπτά. Ακολουθούσε απευθείας το στάδιο 12 ή για την ελαχιστοποίηση κάθε πιθανότητας πιθανής μεταφοράς του buffer AW2 πραγματοποιούνταν πρώτα το στάδιο 11α: Τοποθέτηση της στήλης σε νέο σωληνάριο συλλογής και φυγοκέντρηση στις 14.000 rpm για 1 λεπτό
12. Τοποθέτηση της στήλης σε ένα νέο σωληνάριο μικροφυγοκέντρησης 1,5 ml
13. Προσεκτικό άνοιγμα της στήλης και προσθήκη 200 μl ρυθμιστικού διαλύματος (buffer AE) ή απεσταγμένου νερού. Μετά από επώαση σε θερμοκρασία δωματίου (15-25°C) για 1 λεπτό, ακολουθούσε φυγοκέντρηση στις 8000 rpm επίσης για 1 λεπτό
14. Απόρριψη της στήλης και φύλαξη του DNA στους -80°C έως το στάδιο του πολλαπλασιασμού.

Αν η ποσότητα του δείγματος ήταν μικρότερη από την απαιτούμενη γινόταν προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος (phosphate buffer solution - PBS), μέχρι τελικού όγκου 200 μl.

Η στήλη πυριτίου (silica column), επέτρεπε μετά την φυγοκέντρηση για την συγκράτηση του DNA στον πυθμένα της, επαρκείς πλύσεις με ρυθμιστικά διαλύματα για την απομάκρυνση τυχόν επιμολύνσεων.

Για την ανίχνευση πιθανής επιμόλυνσης κατά το στάδιο απομόνωσης του DNA, όλες οι δοκιμές PCR περιελάμβαναν και δείγματα μάρτυρες από υγιές άτομο.

2.2.2.2.1. Πολλαπλασιασμός του βακτηριακού DNA με την PCR-ELISA μεθοδολογία

2.2.2.2.1.1. Εκκινητές

Στο πρώτο σκέλος της μελέτης χρησιμοποιήθηκε μια PCR μεθοδολογία για την ανίχνευση του DNA της *Brucella* σε ολικό αίμα και ορό με τους εκκινητές (primers) B4 και B5 (MWG-Biotech AG) (Baily et al, 1992).

Πίνακας 16: Εκκινητές B4 και B5.

Εκκινητής	Αλληλουχία	Αριθμός νουκλεοτιδίων
B4	5' TGG GCT TGC CAA TAT CAA 3'	18
B5	5' CGC GCT CTT TCA GGT CTG 3'	18

Αυτοί οι εκκινητές ενισχύουν ειδικά ένα τμήμα με 223 ζεύγη βάσεων από την διατηρημένη περιοχή του γονιδιώματος, που κωδικοποιεί μια ανοσογόνο μεμβρανική πρωτεΐνη μεγέθους 31 kDa της *B. abortus* (BCSP31), ειδική για το γένος της *Brucella* και παρούσα σε όλους τους βιοτύπους (Mayfield et al, 1988).

2.2.2.2.1.2. Στοιχειομετρία της αντίδρασης PCR

Η ενίσχυση του DNA γινόταν σε μια αντίδραση πολλαπλασιασμού τελικού όγκου 50 μ l. Το μείγμα της PCR αποτελούνταν από:

- 50 mM Tris-HCl (pH 8,5)
- 17 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2 mM MgCl_2
- 6,7 μ M EDTA, 10 mM β -μερκαπτοαιθανόλη
- 0,1 mg αλβουμίνη ορού βοός ανά ml
- 0,01 % ζελατίνη
- 200 μ mol από κάθε δεοξυτριφωσφορικό νουκλεοτίδιο (deoxynucleotide triphosphate-dNTP)
- 5 μ l DNA-στόχου
- 0,5 μονάδες Hot StarTaq πολυμεράσης ανά αντίδραση (Qiagen, Valencia, CA).

Το ένζυμο αυτό είναι δομικά και λειτουργικά σταθερό σε υψηλές θερμοκρασίες, που καταλύει την αντίδραση επέκτασης των υβριδισμένων

εκκινητών, μέσω της προσθήκης νουκλεοτιδίων (dNTPs) με κατεύθυνση 5' → 3'.

Οι εκκινητές προστίθενταν σε συγκέντρωση 100 pmol.

2.2.2.2.1.3. Συνθήκες της αντίδρασης PCR

Τα μείγματα της αντίδρασης προθερμαίνονταν για 15 min στους 95°C για την ενεργοποίηση της HotStarTaq πολυμεράσης (1^{ος} κύκλος). Με τον τρόπο αυτό μειώνονταν σημαντικά η δημιουργία μη ειδικών προϊόντων πολλαπλασιασμού, εφόσον ελαχιστοποιούνταν η πιθανότητα επέκτασης των μη ειδικά συνδεδεμένων εκκινητών, καθώς και των διμερών τους.

Η ενζυμική αντίδραση πολλαπλασιασμού πραγματοποιούνταν στον θερμικό κυκλοποιητή PTC-0200 DNA Engine (MJ Research, Inc., Massachusetts, USA) σε συνολικά 40 κύκλους. Ο τελικός κύκλος ακολουθούνταν από ένα στάδιο επιμήκυνσης για 7 min στους 72°C (Πίνακας 17).

Πίνακας 17. Συνθήκες πολλαπλασιασμού του DNA

1 κύκλος	95°C	1 min
40 κύκλοι	90°C	1 min
	60 °C	30 sec
	72 °C	1 min
1 κύκλος	72 °C	7 min

Σε όλες τις δοκιμές συμπεριλαμβάνονταν:

- θετικοί μάρτυρες (positive controls), που περιείχαν DNA απομονωμένο από *B. melitensis*
- αρνητικοί μάρτυρες (negative controls), που περιείχαν όλα τα συστατικά του μείγματος αντίδρασης εκτός του DNA στόχου.

Για την εξασφάλιση της αξιοπιστίας των αποτελεσμάτων, όλα τα δείγματα δουλεύονταν εις διπλούν.

2.2.2.2.2. Ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (Real Time PCR) μεθοδολογία με χρήση hybridization probes

2.2.2.2.2.1. Εκκινητές της RT-PCR

Όσον αφορά την μελέτη της εφαρμογής ποσοτικής RT PCR χρησιμοποιήθηκε μεθοδολογία που βασιζόταν στον άμεσο πολλαπλασιασμό αλληλουχίας DNA με 207 ζεύγη βάσεων (base pair-bp) του γονιδίου που κωδικοποιεί για την σύνθεση της ίδιας ανοσογόνου πρωτεΐνης 31 kilodalton του γένους *Brucella* (BCSP31), που χρησιμοποιήθηκε και στη PCR-ELISA μεθοδολογία.

Το ζεύγος εκκινητών που χρησιμοποιήθηκε ήταν επίσης το ίδιο:

- B4 (5' TGG GCT TGC CAA TAT CAA 3') και
- B5 (5' CGC GCT CTT TCA GGT CTG 3') (Baily et al, 1992).

2.2.2.2.2.2. Στοιχειομετρία της RT-PCR

Κάθε γυάλινο τριχοειδές του LightCycler, περιείχε 20 μl από το μείγμα της αντίδρασης που αποτελούνταν από:

- 2,6 μl PCR-grade νερό
- 2,4 μl διαλύματος χλωριούχου μαγνησίου 25 mM
- 4,0 μl μείγματος αντίδρασης (που περιείχε εκκινητές και ιχνηθέτες)
- 4,0 μl μείγματος εσωτερικού μάρτυρα (internal control-IC) (που περιείχε εκκινητές, ιχνηθέτες και DNA)
- 2 μl μείγματος FastStart (που περιέχει Taq DNA πολυμεράση και μίγμα dNTPs) και
- 5 μl DNA-στόχου (δείγμα ή standard).

Ο σχεδιασμός και η προμήθεια των εκκινητών (primers) και ιχνηθετών (probes) έγινε από την Tib Molbiol (Berlin, Germany).

2.2.2.2.2.3. Συνθήκες πολλαπλασιασμού του DNA με την RT-PCR

Για την ενζυμική αντίδραση πολλαπλασιασμού χρησιμοποιήθηκε διαπιστευμένος θερμικός κυκλοποιητής πραγματικού χρόνου (LightCycler 1.5, Roche Diagnostics GmbH's, Mannheim Germany).

Το πρωτόκολλο της αντίδρασης αποτελούνταν από τα ακόλουθα στάδια:

- αποδιάταξη: αποδιάταξη του δείγματος και ενεργοποίηση του ενζύμου (1^{ος} κύκλος)
- κυκλοποίηση: πολλαπλασιασμός του DNA στόχου
- ανάλυση της καμπύλης τήξης (melting curve analysis) για ταυτοποίηση του προϊόντος της PCR που προήλθε από το DNA στόχο

Τα παραπάνω στάδια περιγράφονται αναλυτικά στον ακόλουθο Πίνακα 18:

1 κύκλος	95°C	10 min
55 κύκλοι	95°C	10 sec
	55°C	8 sec
1 κύκλος	72°C	15 sec
	95°C	20 sec
	40°C	20 sec
	85°C	0 sec

Οι καμπύλες φθορισμού αναλύονταν με το λογισμικό LightCycler software, έκδοση 3.5.

2.2.2.2.4. Ανάλυση αποτελεσμάτων με τη μελέτη της καμπύλης τήξης του προϊόντος (melting curve analysis)

Μετά τον πολλαπλασιασμό, η μελέτη της καμπύλης τήξης του προϊόντος (melting curve analysis) καθόριζε την ειδικότητα του

πολλαπλασιασμένου γενετικού υλικού (1 κύκλος αποτελούμενος από 95°C για 20 sec, 40°C για 20 sec και 85°C για 0 sec). Το προερχόμενο από το *bcs31* προϊόν πολλαπλασιασμού ταυτοποιούνται τρέχοντας την καμπύλη τήξης με ένα συγκεκριμένο σημείο τήξης στους 67,5°C (εξαρτώμενο από τη συγκέντρωση).

2.2.2.2.5. Ποσοτικοποίηση του προϊόντος πολλαπλασιασμού με την RT-PCR

Μια προκαθορισμένη καμπύλη (standard curve), που περιελάμβανε 10-πλάσιες αραιώσεις DNA του γονιδίου *bcs31* της *Brucella* από 10^1 - 10^7 ισοδύναμους στόχους, επέτρεπε ποσοτικοποίηση άγνωστων δειγμάτων.

Στην παρεχόμενη σειρά standard (TIM MOLBIOL):

- η κατώτερη συγκέντρωση (10 αντίγραφα) πολλαπλασιάστηκε σε 35-36 κύκλους
- 100 αντίγραφα πολλαπλασιάστηκαν μετά από 32-33 κύκλους
- 10.000 αντίγραφα πολλαπλασιάστηκαν μετά 25-26 κύκλους και
- 1.000.000 αντίγραφα πολλαπλασιάστηκαν μετά από 17-18 κύκλους αντίστοιχα (με το σημείο διασταύρωσης, crossing point, υπολογιζόμενο από το «δεύτερο μέγιστο παράγωγο»).

Με τη μέθοδο “fit points” το σημείο διασταύρωσης ήταν 32-33, 28-29, 22-23 και 15-16 κύκλοι, αντίστοιχα.

Το όριο ανίχνευσης της μεθόδου που εντοπίστηκε με συνεχείς αραιώσεις του DNA της *B. melitensis* ήταν 10 copies/5 μl απομονωμένου DNA.

Τα αποτελέσματα της PCR ήταν διαθέσιμα σε μία ώρα.

Για την εκτίμηση της ποιότητας του χειρισμού των δειγμάτων χρησιμοποιούνταν αρνητικοί και θετικοί μάρτυρες:

- Αρνητικός μάρτυρας (PCR-grade νερό) που χρησιμοποιούνταν σε όλα τα στάδια, αρχίζοντας από αυτό της απομόνωσης του γενετικού υλικού, για τον έλεγχο πιθανών επιμολύνσεων
- Θετικοί μάρτυρες που αντιστοιχούσαν στις υποδεκαπλάσιες συγκεντρώσεις (από 10^1 ως 10^7) *Brucella* BCSP31 DNA (σειρά standard συγκεντρώσεων)
- Εσωτερικός μάρτυρας (internal control-IC) για τον έλεγχο ύπαρξης αναστολέων.

2.2.2.3.1. Ανίχνευση του προϊόντος πολλαπλασιασμού με την PCR-EIA μεθοδολογία

2.2.2.3.1.1. Ηλεκτροφόρηση σε γέλη αγαρόζης

Το προϊόν πολλαπλασιασμού (10 µl), σε πρώτο στάδιο εξεταζόταν οπτικά μετά από ηλεκτροφόρηση σε γέλη αγαρόζης (2% w/v agarose) παρουσία βρωμιούχου αιθιδίου (2µg/ml), μιας ειδικής χρωστικής που κάνει ορατά τα νουκλεϊκά οξέα στην υπεριώδη (UV) ακτινοβολία. Η ηλεκτροφόρηση ήταν ένα στάδιο που προηγούνταν του παρακάτω σταδίου ανίχνευσης με υβριδισμό, μέσω της οποίας προσδιοριζόταν το μέγεθος του προϊόντος, μετά τη σύγκριση του με μάρτυρα γνωστού μοριακού μεγέθους, διερευνούνταν πιθανές επιμολύνσεις ή τυχόν προβλήματα στην εξέλιξη της αντίδρασης PCR και διαμορφωνόταν, έτσι, μια αρχική εκτίμηση της αξιοπιστίας των αποτελεσμάτων. Βέβαια, η ηλεκτροφόρηση δεν επέτρεπε με σαφήνεια την επαλήθευση της ειδικότητας του προϊόντος της PCR.

2.2.2.3.1.2. Ανίχνευση του προϊόντος με ELISA

Το προϊόν πολλαπλασιασμού ανιχνεύονταν μετά από υβριδισμό σε μικροπλάκα Hybridowell (Argene Biosoft, France), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Το kit επιτρέπει την ανίχνευση προϊόντων πολλαπλασιασμού μεγαλύτερων από 100 bp.

Η διαδικασία περιελάμβανε τα ακόλουθα στάδια:

1) Χημική αποδιάταξη και κατακράτηση:

- προσθήκη σε 5 µl προϊόντος πολλαπλασιασμού 10 µl διαλύματος αποδιάταξης (denaturation solution) 1 και ισχυρή ανάδευση (vortex)
- προσθήκη 10 µl διαλύματος αποδιάταξης 2 και ισχυρή ανάδευση
- επώαση για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- προσθήκη 200 µl διαλύματος διαλύματος κατακράτησης (coating solution), ομογενοποίηση με vortex
- προσθήκη 100 µl ανά πηγαδάκι από το προϊόν πολλαπλασιασμού (ο αρνητικός μάρτυρας που παρέχεται από το kit προστίθενται εις διπλούν)
- επώαση για 2 ώρες στους 37°C

2) Υβριδισμός :

- προσθήκη 100 μl διαλύματος υβριδισμού (hybridization solution) που περιείχε 50 ng/ml του σημασμένου με βιοτίνη ολιγονουκλεοτιδικού ιχνηθέτη (probe):
 - ✓ BMpr (5' TCA GAC GTT GCC TAT TGG GCC 3') (MWG-Biotech AG) (Morata et al, 2003).
 - ✓ Το διάλυμα υβριδισμού παρασκευάζονταν ως εξής:
 - ✓ ανάμειξη των hybridization mediums A και B σε αναλογία 6:1(π.χ. 1800 μl medium A και 300 μl medium B)
 - ✓ ανάμειξη του παραπάνω διαλύματος με τον probe σε τελική συγκέντρωση 50 ng/ml
- πλύσιμο της μικροπλάκας 4 φορές με πλυστικό διάλυμα που παρασκευαζόταν με αραίωση του παρεχόμενου πλυστικού διαλύματος με απεσταγμένο νερό σε αναλογία 1:9

3) Ανίχνευση των υβριδίων:

- προσθήκη 100 μl διαλύματος συζεύγματος (conjugate) που περιείχε το ένζυμο στρεπταβιδίνη-υπεροξειδάση
- επώαση για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- πλύσιμο της μικροπλάκας 4 φορές

4) Οπτικοποίηση:

- προσθήκη 100 μl υποστρώματος (substrate) του ενζύμου, δηλαδή του χρωμογόνου 3,3',5,5' τετραμεθυλβενζιδίνη (tetramethylbenzidine-TMB)
- επώαση για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι
- διακοπή της ενζυμικής αντίδρασης με προσθήκη 100 μl διαλύματος ανακοπής (stop solution).

Η οπτική πυκνότητα (optical density, OD) μετρούνταν σε μήκος κύματος 450/650 nm σε οπτικό φωτόμετρο, μέσα σε 10 min από το τέλος της διαδικασίας.

5) Υπολογισμός και ερμηνεία των αποτελεσμάτων

α) έλεγχος εγκυρότητας της διαδικασίας και υπολογισμός της τιμής του cut-off (CO)

Η δοκιμασία ήταν έγκυρη αν η OD του αρνητικού μάρτυρα του kit σε κάθε ένα από τα δύο πηγαδάκια ήταν $< 0,4$ OD

Η τιμή του **cut-off** υπολογιζόταν ως εξής:

- $CO = \text{μέσος όρος OD των αρνητικών μαρτύρων} + 0,075$

Έλεγχος επιμόλυνσης:

- η τιμή απορρόφησης του αρνητικού μάρτυρα της αντίδρασης πολλαπλασιασμού έπρεπε να ήταν μικρότερη από το cut-off

Έλεγχος πολλαπλασιασμού:

- η τιμή απορρόφησης του θετικού μάρτυρα της αντίδρασης πολλαπλασιασμού έπρεπε να ήταν μεγαλύτερη από το cut-off

β) Ερμηνεία των αποτελεσμάτων

Αν οι μάρτυρες ήταν έγκυροι, τα αποτελέσματα αναλύονταν ως εξής:

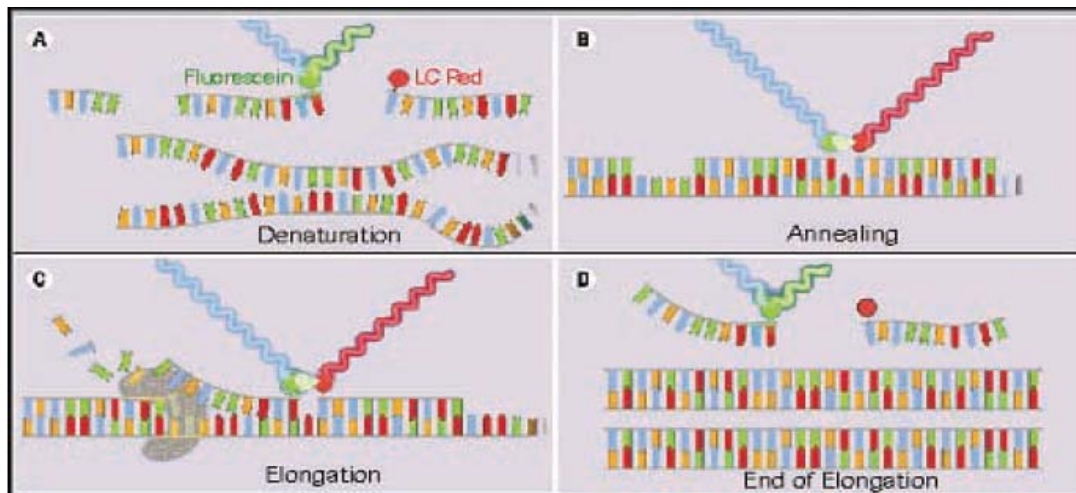
- αρνητικό όταν: $OD \text{ δείγματος} < CO - 10\%$
- θετικό όταν: $OD \text{ δείγματος} > CO + 10\%$
- αμφίβολο όταν: $OD \text{ δείγματος} = CO \pm 10\%$

Σε αμφίβολο αποτέλεσμα, επαναλαμβάνονταν όλη η διαδικασία και αν αυτό παρέμενε το ίδιο, γινόταν επανέλεγχος, όπου ήταν δυνατό με νέο δείγμα.

Ο συνολικός χρόνος για τη διενέργεια της PCR μεθοδολογίας ήταν περίπου 8 ώρες, 1 ώρα για την απομόνωση του DNA, 3 ώρες για την PCR και 4 ώρες για την ανίχνευση.

2.2.2.3.2. Ανίχνευση του προϊόντος πολλαπλασιασμού με την RT PCR μεθοδολογία

Η ανίχνευση του ειδικού προϊόντος γινόταν χρησιμοποιώντας τη φθορίζουσα τεχνική των hybridization probes σημασμένων με φθοριόχρωμα LightCycler Red 640, ο φθορισμός του οποίου ανιχνευόταν στο κανάλι F2 του LightCycler (Εικόνα 4). Μια αντίδραση πολλαπλασιασμού μάρτυρα στο τρίτο κανάλι (F3) λειτουργούσε σαν εσωτερικός έλεγχος. Μια διπλή στο ίδιο σωληνάριο LightCycler-PCR (LC-PCR) γίνονταν χρησιμοποιώντας το kit FastStart DNA Master Hybridization Probes (Roche Diagnostics).



Εικόνα 4: Σχηματική απεικόνιση του τρόπου λειτουργίας των Hybridization probes (από Technical Note No. LC18/2004, Roche Applied Science)

Στη συγκεκριμένη μεθοδολογία, ο πολλαπλασιασμός του στόχου και η ανίχνευση του προϊόντος γίνονται ταυτόχρονα στο ίδιο σωληνάριο οπότε δεν ακολουθούσε περαιτέρω στάδιο ανίχνευσης.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. Αποτελέσματα από την εφαρμογή της PCR-EIA μεθοδολογίας και κλασσικών διαγνωστικών μεθόδων στον πληθυσμό των 243 ασθενών

3.1.1. Αποτελέσματα εφαρμογής κλασσικών διαγνωστικών μεθόδων

Όλοι οι ασθενείς είχαν πυρετό, 138 υπέφεραν από μη εστιακό εμπύρετο σύνδρομο και 39 ασθενείς είχαν διάφορες εστιακές επιπλοκές (Πίνακας 13).

Η *Brucella* απομονώθηκε σε αιμοκαλλιέργειες από 179 ασθενείς (73,7%). Όλα τα απομονωθέντα στελέχη ταυτοποιήθηκαν ως *B. melitensis*.

Από τους 179 ασθενείς με θετικές αιμοκαλλιέργειες, οι 167 ήταν επίσης θετικοί και με τις 3 ορολογικές δοκιμασίες. Αναλυτικότερα, οι 174 ασθενείς είχαν θετική ELISA, οι 170 RBP και οι 167 Wright.

Οι υπόλοιποι 64 ασθενείς διαγνώστηκαν με βάση κλινικά και ορολογικά κριτήρια και βρέθηκαν θετικοί τουλάχιστον σε μια ορολογική δοκιμασία.

Γενικά, η συγκολλητινοαντίδραση RB ήταν θετική (από 2+ έως 4+) σε 232 περιπτώσεις (95,4%). Οι τίτλοι στην συγκολλητινοαντίδραση Wright ήταν εντός του διαγνωστικού εύρους (τίτλοι >1/160) σε 178 περιπτώσεις (73,2%), αλλά ήταν ψευδώς αρνητική σε 12 από τις 179 περιπτώσεις με θετικές αιμοκαλλιέργειες. Όταν ο τίτλος ήταν ίσος με 1/160, ένα δεύτερο δείγμα λαμβάνονταν 15-20 ημέρες μετά το πρώτο.

Όσον αφορά την εκτίμηση των αποτελεσμάτων της ELISA, δείγματα με οπτική πυκνότητα (Optical Density, OD) 10% μεγαλύτερη του cutt off θεωρούνταν θετικά και κατά συνέπεια 240 (98,7%) περιπτώσεις βρέθηκαν εντός του διαγνωστικού εύρους.

Το είδος των αντισωμάτων που ταυτοποιήθηκαν με ELISA ήταν:

- 91,7% IgG (220 από τα 240 θετικά δείγματα με ELISA)
- 68,3% IgA (164 από τα 240 θετικά δείγματα με ELISA)
- 62,5% IgM (150 από τα 240 θετικά δείγματα με ELISA)

3.1.2. Αποτελέσματα από την εφαρμογή της PCR-ELISA μεθοδολογίας

Διακόσιοι σαράντα ένας από τους 243 ασθενείς με βρουκέλλωση ήταν θετικοί με την PCR-EIA μεθοδολογία.

Τα δύο ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα αντιστοιχούσαν σε δύο ασθενείς με θετικές αιμοκαλλιέργειες, που είχαν επίσης θετικά

αποτελέσματα με ELISA και RBP αλλά αρνητική συγκολλητινοαντίδραση Wright. Η παρουσία αναστολέων στα δύο δείγματα με αρνητική PCR αποκλείστηκε εξετάζοντας δείγματα ολικού αίματος και ορού αραιωμένα 1:10 με νερό. Για να αποκλειστεί η πιθανότητα ανεπαρκούς απομόνωσης DNA, τμήματα από τα αρχικά δείγματα αποψύχθηκαν και επαναλήφθηκε η απομόνωση DNA και η PCR με τα ίδια αποτελέσματα.

Εκατόν σαράντα εννέα από τους 243 ασθενείς με βρουκέλλωση (61,3%) είχαν θετική PCR-EIA σε δείγματα ολικού αίματος και ορού (Πίνακας 19).

Η διαγνωστική ευαισθησία της PCR-EIA μεθοδολογίας ήταν:

- 99,2% (241/243) για δείγματα ολικού αίματος και ορού
- 79% (192/243) για δείγματα ορού
- 81,5% (198/243) για δείγματα ολικού αίματος

Όλα τα δείγματα ολικού αίματος και ορού από την ομάδα μαρτύρων ήταν αρνητικά με την PCR-EIA μεθοδολογία, παρέχοντας ειδικότητα 100%.

Πίνακας 19: Σύγκριση των αποτελεσμάτων της PCR-EIA μεθοδολογίας με αυτά των καλλιεργητικών και ορολογικών τεχνικών

Αποτέλεσμα της PCR-EIA	Αρ. ασθενών	Καλλιεργητικά και ορολογικά αποτελέσματα	
		Ορολογικά (+), αιμοκαλλιέργεια (+)	Ορολογικά (+) αιμοκαλλιέργεια (-)
Ολικό αίμα (+), ορός (+)	149	149	0
Ολικό αίμα (-), ορός (+)	43	10	33
Ολικό αίμα (+), ορός (-)	49	18	31
Ολικό αίμα (-), ορός (-)	2	2	0
Σύνολο	243	179	64

3.2. Αποτελέσματα από την εφαρμογή της real-time PCR μεθοδολογίας και κλασσικών διαγνωστικών μεθόδων

3.2.1.1. Αποτελέσματα κλασσικών διαγνωστικών μεθόδων στον πληθυσμό των 126 ασθενών

Από τους 126 ασθενείς με οξεία βρουκέλλωση δείγματα αιμοκαλλιιεργειών εξετάστηκαν σε 86 εκ των οποίων θετικά είχαν οι 60 (69,8%). Όλα τα στελέχη που απομονώθηκαν ταυτοποιήθηκαν ως *B. melitensis*.

Στους υπόλοιπους 66 ασθενείς η διάγνωση βασίστηκε στην κλινική εικόνα και τα ορολογικά κριτήρια.

Η συγκολλητινοαντίδραση RBP ήταν θετική σε 120 ασθενείς (95,2%). Οι τίτλοι στην συγκολλητινοαντίδραση Wright ήταν εντός του διαγνωστικού εύρους (τίτλοι > 1:160) σε 92 ασθενείς (73%). Η ELISA ήταν θετική σε 124 ασθενείς (98,4%).

3.2.1.2. Αποτελέσματα κλασσικών διαγνωστικών μεθόδων στον υποπληθυσμό των 78 ασθενών κατά την αρχική διάγνωση

Η *Brucella* απομονώθηκε αρχικά σε αιμοκαλλιιεργειες από 26 (54%) από τους 48 ασθενείς με διαθέσιμα δείγματα αίματος του υποπληθυσμού των 78 ασθενών.

Από τους 26 ασθενείς που είχαν θετικές αιμοκαλλιιεργειες, οι 24 είχαν επίσης θετικά αποτελέσματα και στις 3 χρησιμοποιούμενες ορολογικές δοκιμασίες, ενώ οι δύο είχαν θετικά αποτελέσματα μόνο στις δύο ορολογικές δοκιμασίες (συγκολλητινοαντίδραση RBP και ELISA).

Στους υπόλοιπους 52 (67%) από τους 78 ασθενείς, στους οποίους είτε δεν είχε σταλεί αιμοκαλλιιεργεια είτε ήταν αρνητική, η διάγνωση βασίστηκε στην κλινική εικόνα και τα ορολογικά κριτήρια.

Στον Πίνακα 20, συνοψίζονται τα εργαστηριακά ευρήματα των 78 ασθενών ανάλογα με το αν ήταν διαθέσιμο ή όχι δείγμα αιμοκαλλιιεργειας.

Γενικά, η συγκολλητινοαντίδραση RBP ήταν θετική σε 74 ασθενείς (95%). Οι τίτλοι στην συγκολλητινοαντίδραση Wright ήταν εντός του διαγνωστικού εύρους (τίτλοι > 1:160) σε 72 ασθενείς (92%). Για την εκτίμηση των αποτελεσμάτων της ELISA, δείγματα με οπτική πυκνότητα (Optical Density, OD) 10% μεγαλύτερη από την οπτική πυκνότητα του cut off θεωρούνταν θετικά· δείγματα και από τους 78 ασθενείς (100%) ήταν θετικά.

Ο τύπος των αντισωμάτων που ανιχνεύτηκαν με ELISA στους 78 ασθενείς ήταν:

- 69% IgG (54 από τα 78 θετικά δείγματα με ELISA)
- 87% IgA (68 από τα 78 θετικά δείγματα με ELISA)
- 80% IgM (62 από τα 78 θετικά δείγματα με ELISA)

Πίνακας 20: Ανάλυση των 78 RT-PCR θετικών ασθενών

√	<u>Ασθενείς με καλλιέργεια αίματος (48/78)</u>		
	κ/α (+)	ορολ. (+)	26/48 (54%)
	κ/α (-)	ορολ. (+)	22/48 (46%)
	κ/α (+)	ορολ. (-)	0/48
	κ/α (-)	ορολ. (-)	0/48
√	<u>Ασθενείς χωρίς καλλιέργεια αίματος (30/78)</u>		
	ορολ. (+), συμβατή κλινική εικόνα 30/30 (100%)		

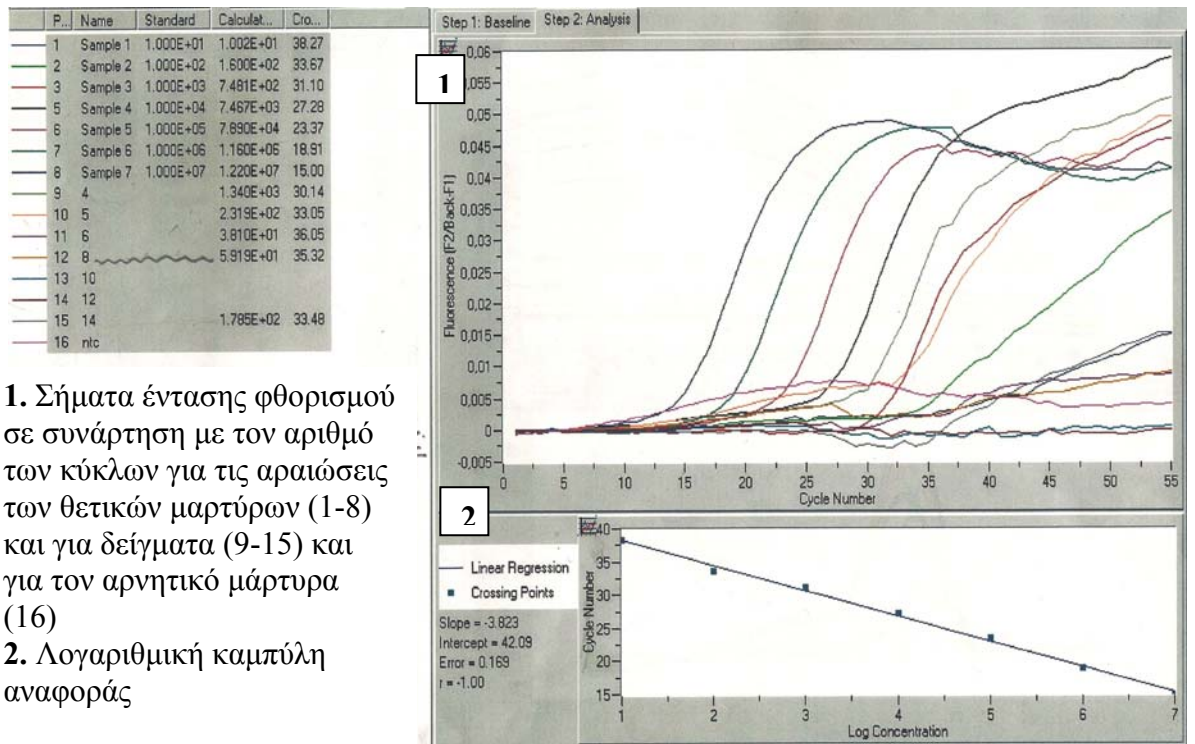
3.2.2. Αποτελέσματα από την εφαρμογή της RT-PCR μεθοδολογίας

Η RT-PCR μεθοδολογία πολλαπλασίασε επιτυχώς τη σειρά των θετικών μαρτύρων και δημιουργήθηκε η καμπύλη αναφοράς για την ποσοτικοποίηση του αποτελέσματος.

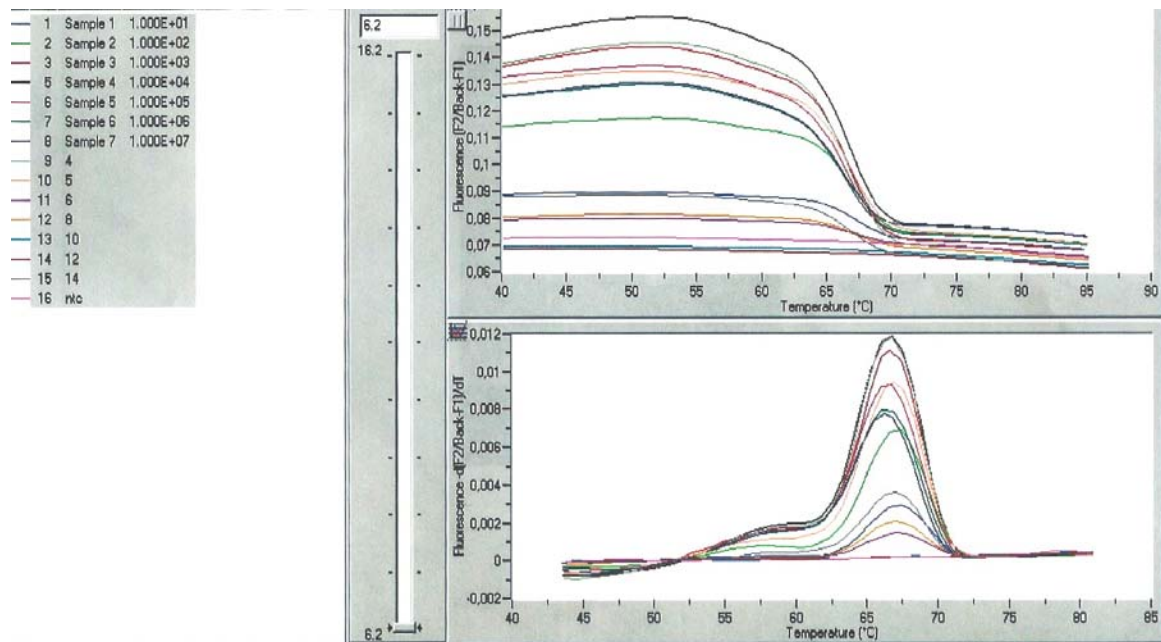
Το όριο ανίχνευσης, όπως προαναφέρθηκε, ήταν 10 αντίγραφα DNA / 5 μL απομονωμένου DNA (**Εικόνα 5**).

Η καμπύλης τήξης του προϊόντος της RT-PCR (melting curve analysis) για όλα τα δείγματα τα θετικά για *Brucella* έδωσε τα αναμενόμενα αποτελέσματα, ως προς την ειδικότητα του προϊόντος: θερμοκρασία τήξης 68-69° C (**Εικόνα 6**).

Εικόνα 5: Παράδειγμα αποτελεσμάτων RT-PCR και της καμπύλης αναφοράς



Εικόνα 6. Παράδειγμα αποτελεσμάτων RT-PCR μετά την melting curve ανάλυση



3.2.2.1. Αποτελέσματα της RT-PCR στον πληθυσμό των 126 ασθενών

Στους 123 από τους 126 ασθενείς με οξεία βρουκέλλωση ανιχνεύτηκε *Brucella* DNA είτε στο ολικό αίμα, είτε στον ορό, είτε και στα δύο δείγματα:

- 108 ασθενείς (85,7%) και στα δύο είδη δειγμάτων,
- 6 (4,8%) μόνο στον ορό, και
- 9 (7,1%) θετικοί μόνο στο ολικό αίμα

Όλα τα δείγματα ολικού αίματος και ορού από την ομάδα μαρτύρων ήταν αρνητικά με την RT-PCR μεθοδολογία, παρέχοντας ειδικότητα 100%.

Η ευαισθησία της μεθόδου ανάλογα με το είδος του δείγματος ήταν:

- 92,8% για το ολικό αίμα,
- 90,5% για τον ορό και
- 97,6% για το συνδυασμό των δειγμάτων.

Εδώ θα πρέπει να αναφερθεί ότι και στις δύο μεθοδολογίες που εφαρμόστηκαν στην παρούσα μελέτη, το ολικό αίμα είχε καλύτερη ευαισθησία σε σχέση με τον ορό για την ανίχνευση DNA *Brucella* (Πίνακας 21):

Πίνακας 21: Συγκριτικά αποτελέσματα των δύο PCR μεθοδολογιών ανάλογα με το είδος του κλινικού δείγματος

Μεθοδολογία	Αριθ. δειγμάτων / αριθ. ασθενών	Είδος κλινικού δείγματος	Ευαισθησία (%)	Ειδικότητα (%)
PCR-EIA	243/243	Ολικό αίμα	81,5	100
	243/243	Ορός	79	100
RT-PCR	126/126	Ολικό αίμα	92,8	100
	126/126	Ορός	90,5	100

3.2.2.2. Αποτελέσματα της RT-PCR στον υποπληθυσμό των 78 ασθενών

Όλα τα δείγματα από τον υποπληθυσμό των 78 ασθενών κατά την αρχική διάγνωση είχαν θετικά αποτελέσματα με την Real-Time PCR μεθοδολογία (ευαισθησία 100%).

Όλα τα δείγματα από την ομάδα μαρτύρων ήταν αρνητικά για *B. melitensis* (ειδικότητα 100%)

Το μέσο φορτίο DNA της *B. melitensis* (\pm SD) για τους 78 ασθενείς κατά τη διάγνωση ήταν 803 ± 1236 copies/5 μ l απομονωμένου DNA (εύρος 26-4570 copies/5 μ l απομονωμένου DNA). Στο τέλος της θεραπείας, δείγματα από 68 ασθενείς (87%) παρέμειναν θετικά για *B. melitensis*, με μέσο βακτηριακό φορτίο DNA (\pm SD) 240 ± 314 copies/5 μ l απομονωμένου DNA (εύρος 0-1230 copies/5 μ l απομονωμένου DNA).

Δύο μήνες μετά το τέλος της θεραπείας, εξετάστηκαν δείγματα από 68 ασθενείς, και το μέσο βακτηριακό φορτίο DNA (\pm SD) ήταν 192 ± 236 copies/5 μ l απομονωμένου DNA (εύρος 0-875 copies/5 μ l απομονωμένου DNA· τα αποτελέσματα για 54 ασθενείς παρέμειναν θετικά).

Έξι μήνες μετά το τέλος της θεραπείας, εξετάστηκαν δείγματα από 52 ασθενείς, και το μέσο βακτηριακό φορτίο DNA (\pm SD) ήταν 96 ± 135 copies/5 μ l απομονωμένου DNA (εύρος, 0-432 copies/5 μ l απομονωμένου DNA· τα αποτελέσματα για 40 ασθενείς παρέμειναν θετικά).

Δώδεκα με εικοσιτέσσερις μήνες μετά το τέλος της θεραπείας, εξετάστηκαν δείγματα από 32 ασθενείς, και το μέσο βακτηριακό φορτίο DNA (\pm SD) ήταν 80 ± 126 copies/5 μ l απομονωμένου DNA (εύρος 0-420 copies/5 μ l απομονωμένου DNA). Τα αποτελέσματα για 22 ασθενείς παρέμειναν θετικά, και δύο ασθενείς είχαν αρνητικά αποτελέσματα για 2 συνακόλουθα δείγματα και μετά είχαν θετικά αποτελέσματα αλλά δεν υποτροπίασαν.

Εικοσιτέσσερις με τριάντα έξι μήνες μετά το τέλος της θεραπείας, εξετάστηκαν δείγματα από 20 ασθενείς, και το μέσο βακτηριακό φορτίο DNA (\pm SD) ήταν 56 ± 74 copies/5 μ l απομονωμένου DNA (εύρος 0-220 copies/5 μ l απομονωμένου DNA· 14 ασθενείς συνέχιζαν να έχουν θετικά αποτελέσματα.

Από τους 42 ασθενείς που παρακολουθούνταν για περισσότερο από ένα χρόνο μετά τη θεραπεία, 26 συνέχιζαν να έχουν θετικά αποτελέσματα με την RT PCR μεθοδολογία αλλά ήταν ασυμπτωματικοί. Δύο ασθενείς είχαν θετικά αποτελέσματα με την RT PCR μεθοδολογία 2 χρόνια μετά τη λοίμωξη, αν και είχαν αρνητικά αποτελέσματα στο follow-up του ενός χρόνου.

Πιο συνοπτικά, στους 78 ασθενείς που παρακολούθηθηκαν, οι μέσες τιμές του DNA (\pm SD) σε δείγματα **ολικού αίματος** ήταν:

- Τη στιγμή της διάγνωσης: 803 \pm 1236 copies/5 μ L DNA extract (εύρος, 26-4570)
- Στο τέλος της θεραπείας: 240 \pm 314 copies/5 μ L DNA extract (εύρος, 0-1230)
- Δύο μήνες μετά το τέλος της θεραπείας: 192 \pm 236 copies/5 μ L DNA extract (εύρος, 0-875)
- Έξι μήνες μετά το τέλος της θεραπείας: 96 \pm 135 copies/5 μ L DNA extract (εύρος, 0-432)
- 12-24 μήνες μετά το τέλος της θεραπείας: 80 \pm 126 copies/5 μ L DNA extract (εύρος, 0-420)
- 24-36 μήνες μετά το τέλος της θεραπείας: 56 \pm 74 copies/5 μ L DNA extract (εύρος, 0-220)

Τα παραπάνω αποτελέσματα συνοψίζονται στον ακόλουθο Πίνακα 22:

Χρόνος	Αριθμός ασθενών	Μέσο φορτίο DNA (copies/ 5 μ l DNA)	Εύρος φορτίου DNA (copies/ 5 μ l DNA)	Αριθμός (+) RT – PCR ασθενών (%)
Διάγνωση	78	803 \pm 1236	25 – 4570	78 (100 %)
Τέλος θεραπείας	78	240 \pm 314	0 - 1230	68 (87 %)
2 m μετά το τέλος θεραπείας	68	192 \pm 236	0 - 875	54 (79,4 %)
6 m μετά το τέλος θεραπείας	52	96 \pm 135	0 - 432	40 (77 %)
12-24 m μετά το τέλος θεραπείας	32	80 \pm 126	0 - 420	20 (62,5 %)
24-36 m μετά το τέλος θεραπείας	20	56 \pm 74	0 - 220	14 (70 %)

Η εξέλιξη του βακτηριακού φορτίου DNA αποτυπώνεται στο Σχεδιάγραμμα 1 (σελ. 141).

Όσον αφορά τα αποτελέσματα στις ορολογικές δοκιμασίες γι' αυτούς τους ασθενείς, κατά την περίοδο παρακολούθησης, δεν διέφεραν σημαντικά ανάμεσα στα άτομα με ανιχνεύσιμα και μη ανιχνεύσιμα βακτηριακά φορτία, με ένα μέσο τίτλο στη συγκολλητινοαντίδραση Wright 1:40, την παρουσία IgG αντισωμάτων καθορισμένων με ELISA

σε όλους τους ασθενείς, και την παρουσία IgA αντισωμάτων σε μειοψηφία των ασθενών.

Κατά τη διάρκεια της περιόδου παρακολούθησης της μελέτης, μόνο 6 ασθενείς υπέστησαν υποτροπή. Κατά την υποτροπή 2 ασθενείς είχαν θετική καλλιέργεια αίματος, ενώ οι άλλες 4 υποτροπές διαγνώστηκαν με βάση τα κλινικά ευρήματα και τις ορολογικές δοκιμασίες.

Στους 6 ασθενείς με υποτροπή, δεν υπήρχε αύξηση στο βακτηριακό φορτίο κατά την επανεμφάνιση των συμπτωμάτων, σε σύγκριση με τις προηγούμενες μετρήσεις του βακτηριακού φορτίου κατά το follow-up, αν και οι τίτλοι δεν μειώθηκαν επίσης.

Δεν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε σχέση με το αρχικό ή το βακτηριακό φορτίο μετά τη θεραπεία ανάμεσα σε αυτούς που υποτροπίασαν και σ' αυτούς που δεν υποτροπίασαν.

Τα αποτελέσματα των καλλιεργειών αίματος, όταν τα δείγματα λήφθηκαν μετά την ολοκλήρωση της θεραπείας, ήταν αρνητικά σε όλους τους ασθενείς που δεν υποτροπίασαν.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

4.1. Συζήτηση-συμπεράσματα από την εφαρμογή της PCR-ELISA μεθοδολογίας

Η οριστική διάγνωση της ανθρώπινης βρουκέλλωσης είναι δύσκολη· οι σύγχρονες ημιαυτόματες τεχνικές χειρισμού αιμοκαλλιεργείων και οι διαθέσιμες ορολογικές δοκιμασίες ανίχνευσης ειδικών αντισωμάτων έχουν σοβαρούς περιορισμούς (Young, 1995; Araj, 1999; Yagupsky, 1999). Στην Ελλάδα, μια χώρα όχι απαλλαγμένη από βρουκέλλωση αιγοπροβάτων και βοοειδών, περισσότερες από 85% των περιπτώσεων ανθρώπινης βρουκέλλωσης διαγιγνώσκονται μόνο ορολογικά (National Epidemiological Surveillance Center, 2000). Πολλά από τα μειονεκτήματα που σχετίζονται με την ευαισθησία ανίχνευσης με την καλλιέργεια και τις ορολογικές μεθόδους μπορούν να ξεπεραστούν με τις μοριακές τεχνικές.

Υπάρχουν πρόσφατες αναφορές που υποστηρίζουν ότι η ανίχνευση του DNA της *Brucella* με PCR είναι πιο ευαίσθητη μέθοδος από την αιμοκαλλιέργεια και πιο ειδική από τις ορολογικές μεθόδους για τη διάγνωση της οξείας νόσου (Morata et al, 1999; Morata et al, 2003; Zerva et al, 2001, Mitka et al, 2007).

Από την άλλη η διαδικασία της PCR πρέπει να ακολουθηθεί από ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης για την ανίχνευση του προϊόντος πολλαπλασιασμού (Navarro et al, 1997; Morata et al, 1998; Morata et al, 1999; Morata et al, 2001; Zerva et al, 2001), που είναι μάλλον υποκειμενική και μπορεί να χρειαστεί επιπλέον επιβεβαίωση με dot (Queipo-Ortuno et al, 1997) ή Southern blot υβριδισμό, ανάλυση με περιοριστικά ένζυμα (Matar et al, 1996), ή/και sequencing (Queipo-Ortuno et al, 1997; Romero et al, 1995). Επιπλέον το βρωμιούχο αιθίδιο, που χρησιμοποιείται συνήθως στην ηλεκτροφόρηση είναι τοξικό προϊόν.

Στην παρούσα μελέτη έγινε προσπάθεια να ξεπεραστούν κάποιες από τις παραπάνω δυσκολίες και να βελτιωθεί η ικανότητα ανίχνευσης της μεθόδου πολλαπλασιασμού, χρησιμοποιώντας μια τεχνική PCR συνδυασμένη με μια απλή, βασισμένη σε υβριδισμό σε μικροπλακα ανοσοενυμική μεθοδολογία (PCR-enzyme immunoassay/PCR-EIA) για την ανίχνευση του προϊόντος πολλαπλασιασμού της *Brucella*. Αν και υπάρχουν βιβλιογραφικά δεδομένα για την εφαρμογή της PCR-EIA στη διάγνωση διαφόρων λοιμώξεων (Jantos et al, 1998; Luk et al, 1997; Zambardi et al, 1995; Matsiota-Bernard et al, 2000; Andreoletti et al, 1996), μελέτες που αφορούν την εφαρμογή της στην ανθρώπινη βρουκέλλωση είναι περιορισμένες και αφορούν, ειδικότερα αυτές, σε δείγματα περιφερικού ολικού αίματος μόνο (Morata et al, 2003; Queipo-Ortuno et al, 2005a).

Στην μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικοί τύποι δειγμάτων περιφερικού αίματος –ολικό αίμα και ορός- για τον πολλαπλασιασμό του DNA της *Brucella*.

Αφού η *Brucella* επιβιώνει και πολλαπλασιάζεται εντός των κυττάρων του μονοπυρηνικού-φαγοκυτταρικού συστήματος, ολικό αίμα, και ειδικότερα λευκά αιμοσφαίρια, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την απομόνωση του DNA (Matar et al, 1996; Queiro-Ortuno et al, 1997; Romero et al, 1995).

Ωστόσο, διάφοροι ανασταλτικοί παράγοντες της PCR, όπως το EDTA και η ηπαρίνη που χρησιμοποιούνται σαν αντιπηκτικά, συστατικά της αίμης από τα αιμολυμένα ερυθροκύτταρα, ή οι υψηλές συγκεντρώσεις λευκοκυτταρικού DNA, μπορούν να μειώσουν την ευαισθησία της PCR (Morata et al, 1998).

Στρατηγικές για τη βελτίωση του πολλαπλασιασμού του DNA στην PCR που χρησιμοποιείται για τη διάγνωση της ανθρώπινης βρουκέλλωσης έχουν προταθεί (Morata et al, 1998), αλλά καθιστούν τη διαδικασία απομόνωσης του DNA πιο πολύπλοκη και χρονοβόρα.

Η χρησιμοποίηση στην παρούσα μελέτη, ενός εμπορικά διαθέσιμου extraction kit καθιστούσε δυνατή την εκχύλιση καθαρού DNA, έτοιμου για άμεσο πολλαπλασιασμό σε μόνο 20 λεπτά, δεδομένου ότι για την καθαρότητα του DNA δεν απαιτούνταν χρήση φαινόλης/χλωροφορμίου ή καθίζηση αλκοόλης.

Καθώς το δείγμα ορού είναι ελεύθερο από αναστολείς, όπως αντιπηκτικά, αιμοσφαιρίνη και ανθρώπινο DNA, η χρήση του αντί για δείγματα ολικού αίματος είναι προτιμότερη στις μεθόδους πολλαπλασιασμού νουκλεϊκών οξέων. Επιπλέον, αρκετές μελέτες έχουν αποδείξει την παρουσία κυκλοφορούντων παθογόνων νουκλεϊκών οξέων σε δείγματα ορού που πιθανά απελευθερώνονται στην κυκλοφορία σαν προϊόντα αποδόμησης κατά τη διάρκεια της βακτηριαιμίας (Zerva et al, 2001; Matsiota-Bernard et al, 2000; Bougnoux et al, 1999; Brown et al, 1995; Kawamura et al, 1999; Murdoch et al 1996).

Παρόμοιες μελέτες με την παρούσα που αφορούν ανίχνευση DNA *Brucella* με PCR απέφεραν συγκρίσιμα αποτελέσματα. Σε μια μελέτη όπου δείγματα 31 ασθενών εξετάστηκαν χρησιμοποιώντας PCR η αναφερόμενη ευαισθησία των δειγμάτων ολικού αίματος ήταν 61%, ενώ η ευαισθησία των δειγμάτων ορού ήταν 94%. Η συνδυασμένη ευαισθησία από τα δείγματα ολικού αίματος και ορού ήταν 97% (Zerva et al, 2001). Όταν 50 δείγματα ολικού αίματος από 47 ασθενείς εξετάστηκαν με μια άλλη PCR μεθοδολογία, η αναφερόμενη ευαισθησία ήταν 100% και η ειδικότητα 98,3% (Queiro-Ortuno et al, 1997). Σε μια μελέτη που εφάρμοσε παρόμοια PCR-EIA μεθοδολογία, εξετάστηκαν 59 δείγματα ολικού αίματος από 57 ασθενείς με βρουκέλλωση. Η αναφερόμενη ευαισθησία ήταν 94,9%, ενώ η ειδικότητα ήταν 96,5%, με

3 (5,1%) ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα που αντιστοιχούσαν σε 3 ασθενείς με θετικές αιμοκαλλιέργειες (Morata et al, 2003). Σχετικά υψηλά ποσοστά ευαισθησίας και ειδικότητας (90% και 91,9% αντίστοιχα) είχε και η εφαρμογή επίσης παρόμοιας PCR-EIA μεθοδολογίας σε 60 δείγματα ολικού αίματος από 59 ασθενείς με οξεία νόσο (Queiro-Ortuno et al, 2005a). Τα αποτελέσματα των μελετών αυτών συγκριτικά με την παρούσα μελέτη παρατίθενται στον Πίνακα 23.

Πρέπει να αναφερθεί ότι η παραπάνω αναφερόμενη υψηλή ευαισθησία (94%) για δείγματα ορού (Zerva et al, 2001) που εξετάστηκαν με μέθοδο PCR, δεν παρατηρήθηκε στη μελέτη μας (79%), όπου δείγματα ορού εξετάστηκαν με PCR-EIA μεθοδολογία. Όταν δείγματα ολικού αίματος εξετάστηκαν με τη μέθοδο μας η ευαισθησία ήταν 81,5%, που είναι μικρότερη από την αναφερόμενη ευαισθησία όταν χρησιμοποιήθηκε είτε PCR (100%) ή παρόμοια PCR-EIA μεθοδολογία (94,9% και 90%). Ωστόσο, η ευαισθησία της εφαρμοζόμενης PCR-EIA μεθοδολογίας από το συνδυασμό των δειγμάτων ολικού αίματος και ορού (99,2%) συγκρινόταν καλά με την αναφερόμενη από τους Zerva et al, Morata et al, Queiro-Ortuno et al, (1997) και Queiro-Ortuno et al, (2005a) 97%, 94,9%, 100% και 90% αντίστοιχα.

Άλλοι ερευνητές, χρησιμοποιώντας παρόμοιες μεθόδους, έχουν αναφέρει ότι η ικανότητα ανίχνευσης της PCR-EIA μεθοδολογίας είναι συγκρίσιμη με αυτή της συνδυασμένης εφαρμογής συμβατικής PCR και Southern hybridization (Jantos et al, 1998; Luck et al, 1997; Zambardi et al, 1995).

Η ύπαρξη δύο ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων σε δύο ασθενείς με θετικές καλλιέργειες αίματος μπορεί να αποδοθεί στο γεγονός ότι ο όγκος του αίματος που εξετάζεται μέσω των φιαλών του συστήματος BacT/Alert είναι 8-10 ml, που είναι σημαντικά μεγαλύτερος από τα 0,2 ml της PCR-EIA. Επίσης, πρέπει να αναφερθεί ότι τα ψευδώς αρνητικά με PCR, θετικά με καλλιέργεια δείγματα ανιχνεύτηκαν μετά από 10 ημέρες περίοδο επώασης, γεγονός που καταδεικνύει την παρουσία μικρού μικροβιακού φορτίου στα εξεταζόμενα κλινικά δείγματα.

Η ειδικότητα της εφαρμοζόμενης μεθοδολογίας ήταν εξαιρετική (100%), και σε συμφωνία με τα αποτελέσματα των Zerva et al. (Zerva et al, 2001) αλλά υψηλότερη από την αναφερόμενη των Morata et al. (Morata et al, 2003) και Queiro-Ortuno et al. (Queiro-Ortuno et al, 2005a). Άλλοι ερευνητές, που μελέτησαν την ειδικότητα των ίδιων εκκινητών (B4 και B5) σε μια ποικιλία μικροοργανισμών ανέφεραν υψηλή ευαισθησία. Συγκεκριμένα, με τη χρήση αυτών των εκκινητών πολλαπλασιαζόταν DNA μόνο από ένα μικροοργανισμό, το *Ochrobactrum anthropi*, ένα παθογόνο φυλογενετικά πολύ κοντά με τη *Brucella* spp. (Baily et al, 1992; Casanas et al, 2001; Romero et al, 1995).

Ωστόσο, λοιμώξεις οφειλόμενες σε *O. anthropi* αναφέρονται σπάνια και συνήθως αφορούν άτομα με σοβαρή ανοσοκαταστολή ή άτομα εξασθενημένα από άλλα νοσήματα και στην πλειοψηφία τους είναι Νοσοκομειακές λοιμώξεις ασθενών με καθετήρες ή άλλα ξένα σώματα (Ezzedine et al, 1994; Grandsen et al, 1992), ενώ η βρουκέλλωση είναι λοίμωξη της κοινότητας που προσβάλλει άτομα ανοσοεπαρκή.

Επιπρόσθετα, ψευδώς θετικά αποτελέσματα που αναφέρθηκαν από άλλους ερευνητές αποδόθηκαν σε υποκλινική είτε αυτοπεριοριζόμενη νόσο είτε επανενεργοποίηση της λοίμωξης από *Brucella* (Morata et al, 2001; Morata et al, 2003, Queiro-Ortuno et al, 2005a). Για την αποφυγή τέτοιων ψευδών αποτελεσμάτων, στην μελέτη μας επιλέχθηκαν ως ομάδα μαρτύρων υγιή άτομα (αιμοδότες), που δεν είχαν ιστορικό βρουκέλλωσης ή έκθεση σε *Brucella*.

Σημαντικά πλεονεκτήματα της PCR-EIA μεθοδολογίας, πλην της υψηλής ευαισθησίας και ειδικότητας, είναι:

- 1) απλή και γρήγορη εκτέλεση, με χρόνο διενέργειας λιγότερο από 8 ώρες
- 2) υψηλή ασφάλεια, λόγω αποφυγής οποιουδήποτε άμεσου χειρισμού του παθογόνου βακτηρίου, μειώνοντας έτσι τον πιθανό κίνδυνο μόλυνσης του προσωπικού του εργαστηρίου (Yagupsky et al, 2000)
- 3) εύκολος τρόπος συλλογής και αποθήκευσης κλινικών δειγμάτων στους -20°C και επεξεργασία τους άμεσα ή σε δεύτερο χρόνο
- 4) σχετικά χαμηλό κόστος, με την προϋπόθεση ότι το κλινικό μικροβιολογικό εργαστήριο είναι εξοπλισμένο με την βασική υποδομή της Μοριακής Μικροβιολογίας.

Σύμφωνα με τα προαναφερθέντα, η PCR-EIA μεθοδολογία μπορεί να βοηθήσει στην έγκαιρη και έγκυρη διάγνωση της οξείας βρουκέλλωσης.

Πίνακας 23: Συγκριτικά αποτελέσματα PCR μεθόδων ανίχνευσης *Brucella*-DNA

<i>Βιβλιογραφία</i>	Μέθοδοι	Αριθ. δειγμάτων / αριθ. ασθενών	Είδος κλινικού δείγματος	Ευαισθησία (%)	Ειδικότητα (%)
Quiépo-Ortuno et al., 1997	PCR	50/47	Ολικό αίμα	100	98,3
Zerva et al., 2001	PCR	31/31 31/31 62/31	Ολικό αίμα Ορός ολικό αίμα + ορός	61 94 97	100 100 100
Morata et al., 2003	PCR - EIA	59/57	Ολικό αίμα	94,9	96,5
Quiépo-Ortuno et al., 2005a	PCR - EIA	60/59	Ολικό αίμα	90	91,9
Παρούσα μελέτη	PCR - EIA	243/243 243/243 486/243	Ολικό αίμα Ορός ολικό αίμα + ορός	81,5 79 99,2	100 100 100

4.2. Συζήτηση-συμπεράσματα από την εφαρμογή της real-time PCR μεθοδολογίας

Μια σχετικά νέα μέθοδος που εφαρμόζεται για την ανίχνευση και ταυτοποίηση ποικίλων λοιμωδών παραγόντων στο κλινικό εργαστήριο είναι η Real Time PCR (Espy et al, 2006), η οποία αναπτύχθηκε για να βελτιώσει την ευαισθησία, την ειδικότητα και την ταχύτητα στην ανίχνευση προϊόντων πολλαπλασιασμού PCR (Tenover, 2007). Δεν απαιτεί χειρισμό των προϊόντων μετά τον πολλαπλασιασμό, μειώνοντας έτσι τον κίνδυνο εργαστηριακής επιμόλυνσης και ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων. Επιπλέον, η RT PCR έχει προβληθεί σαν ένα ισχυρό μέσο ποσοτικοποίησης του μικροβιακού φορτίου, πολύτιμο για πολυάριθμα λοιμώδη νοσήματα (π.χ. ηπατίτιδα, λοίμωξη από CMV, EBV, HIV).

Παρόμοιες μελέτες με την παρούσα όσον αφορά την ανίχνευση DNA *Brucella* με RT PCR, απέφεραν συγκρίσιμα αποτελέσματα. Τα βιβλιογραφικά δεδομένα αφορούν κατά κύριο λόγο δείγματα ορού. Έτσι, στην πρώτη μελέτη εφαρμογής της RT PCR σε ανθρώπινα κλινικά δείγματα η ευαισθησία ήταν 91,9% και η ειδικότητα 96,4% (Colmenero et al, 2003). Σε δύο μεταγενέστερες μελέτες των Queiro-Ortuno και συν., του 2005 μελετήθηκαν 62 και 60 δείγματα ορού από 60 και 59 ασθενείς αντίστοιχα. Τα ποσοστά ευαισθησίας ήταν 93,3% και 91,9% και ειδικότητας 94,6% και 95,4% αντίστοιχα (Queiro-Ortuno et al, 2005a; Queiro-Ortuno et al, 2005b). Τα υψηλά αυτά ποσοστά ευαισθησίας δεν αναπαράχθηκαν σε μια μελέτη που εφάρμοσε παρόμοια με τη δική μας RT-PCR μεθοδολογία. Μελετήθηκαν, όμως, μόνο 17 δείγματα ορού με ποσοστό ευαισθησίας χαμηλό, 64,7%. Το χαμηλό αυτό ποσοστό αποδόθηκε εν μέρει στη μη καλή συντήρηση αρκετών δειγμάτων (> από 3 μήνες στους -20°C) (Debeaumont et al, 2005).

Όταν εξετάστηκαν 110 δείγματα από 46 ασθενείς με βρουκέλλωση ενώ το ποσοστό ευαισθησίας ήταν ακόμη υψηλότερο (95,7%), το ποσοστό ειδικότητας ήταν το χαμηλότερο (92,2%). Το σχετικά χαμηλό αυτό ποσοστό ειδικότητας θα μπορούσε να εξηγηθεί από την μεγάλη ετερογένεια του πληθυσμού των μαρτύρων που περιελάμβανε πρόσφατα θεραπευμένους ασθενείς, ασυμπτωματικά άτομα που εκτέθηκαν στη νόσο και ασθενείς με εμπύρετα σύνδρομα στη διαφοροδιάγνωση των οποίων συμπεριλαμβανόταν και η βρουκέλλωση (Queiro-Ortuno et al, 2008).

Σε μια πρόσφατη μελέτη με 50 δείγματα ορού από αντίστοιχους ασθενείς το ποσοστό ευαισθησίας ενώ ήταν υψηλό στους ασθενείς με οξεία (91,2%) και εστιακή νόσο (90%), ήταν αρκετά χαμηλότερο στο μικρό ποσοστό (12%) των ασθενών με χρόνια νόσο (66%). Αυτό αποδόθηκε στο χαμηλό βακτηριακό φορτίο στο αίμα ασθενών με χρόνια

νόσο καθώς και στον περιορισμένο αριθμό αντίστοιχων ασθενών (μόνο 6 από τους 50) που μελετήθηκαν. Κατά συνέπεια, το συνολικό ποσοστό ευαισθησίας μειώθηκε στο 88% ενώ η ειδικότητα ήταν 100% (Surucuoglu et al, 2009).

Σε μια άλλη μελέτη που εξετάστηκαν δείγματα ολικού αίματος (351 από 340 ασθενείς) το χαμηλό ποσοστό ευαισθησίας (66,7%) δεν ήταν συγκρίσιμο με το αντίστοιχο της παρούσας μελέτης (92,8%). Ωστόσο, από το μεγάλο αυτό δείγμα των 340 ασθενών, μόνο οι 24 είχαν ενεργό νόσο ενώ οι υπόλοιποι ήταν είτε ασθενείς με θεραπευθείσα βρουκέλλωση είτε, η μεγάλη πλειοψηφία (299), οροαρνητικά άτομα με αρχική υποψία βρουκέλλωσης (Kattar et al, 2007) και αυτή η ετερογένεια του εξετασθέντος πληθυσμού θα μπορούσε να εξηγήσει τη μεγάλη διαφορά στην ευαισθησία.

Εδώ θα πρέπει να αναφερθεί ότι με την RT PCR τροποποιήθηκε η κλασική εκδοχή της «εκρίζωσης». Η αρνητικοποίηση των καλλιιεργειών έχει επί μακρόν χρησιμοποιηθεί σαν το τελικό σημείο σε κλινικές μελέτες για αρκετές λοιμώξεις, προκειμένου να αποσαφηνιστεί ο βαθμός ίασης ή και η ανταπόκριση στη θεραπεία. Ωστόσο, τα δεδομένα αυτά πιθανά να μην ισχύουν σε μια δυνητικά χρόνια ενδοκυττάρια λοίμωξη όπως η βρουκέλλωση. Κατά συνέπεια, το μικροβιακό φορτίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν έμμεσος δείκτης της παρουσίας ή μη του παθογόνου. Ωστόσο, πρέπει να ληφθούν υπόψιν όλοι οι πιθανοί κινδύνοι μιας τέτοιας εφαρμογής, όπως ότι η απομόνωση σωματιδίων DNA δεν μπορεί να διακρίνει μεταξύ ζωντανών ή όχι μικροοργανισμών. Επιπλέον, το μικροβιακό φορτίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν δείκτης εκτίμησης νόσου, επιτρέποντας έτσι την ομαδοποίηση των ασθενών με βάση την βαρύτητα της νόσου, την πιθανότητα υποτροπής και τα θεραπευτικά σχήματα που απαιτούνται.

Σε ένα σημαντικό αριθμό ασθενών, στην παρούσα μελέτη, ανιχνευόταν βακτηριακό φορτίο ακόμη και χρόνια μετά την θεραπεία καθώς και σε απουσία συμπτωμάτων ενδεικτικών επιμονής της νόσου ή υποτροπής. Τα αποτελέσματα μας είναι ενδεικτικά της μακρόχρονης παρουσίας βιώσιμων βακτηρίων στον ανθρώπινο οργανισμό σε μια κυτταρική δεξαμενή που χρειάζεται περαιτέρω διευκρίνιση. Μπορούν τα αποτελέσματα να εξηγηθούν σαν αποτέλεσμα αποβολής σωματιδίων από νεκρά βακτήρια; Αυτά τα νεκρά βακτήρια θα μπορούσαν να είναι αποτέλεσμα της αντιβιοτικής θεραπείας που είχε χορηγηθεί. Έτσι, σ' αυτήν την περίπτωση, βακτήρια πράγματι επιμένουν για μακρύ χρονικό διάστημα μετά τη λοίμωξη και την θεραπεία. Αυτά τα βακτήρια απέτυχαν να προκαλέσουν κλινικές εκδηλώσεις, πιθανά λόγω μιας άριστης, ειδικής ανοσολογικής απάντησης (Tolomeo et al, 2003).

Η επίμονη παρουσία βακτηριακού φορτίου μετά την ολοκλήρωση της αντιμικροβιακής θεραπείας έχει επίσης αναφερθεί για ασθενείς με νόσους

όπως η φυματίωση, η λεπτοσπείρωση και η νόσος του Lyme (Kain et al, 1993; Malawista et al, 1994; Nocton et al, 1994; Young et al, 2002).

Η ανίχνευση βακτηριακού DNA παρά τις αρνητικές αιμοκαλλιέργειες μπορεί να οφείλεται στην ύπαρξη μη διαιρούμενων αλλά ζωντανών, λοιμογόνων βακτηρίων που παραμένουν σε λανθάνουσα κατάσταση κάτω από τον έλεγχο του ανοσοποιητικού συστήματος του ξενιστή. Έχει προταθεί (Kain et al, 1993; Malawista et al, 1994; Nocton et al, 1994) ότι το DNA από νεκρά μικρόβια καθαρίζεται γρήγορα από το αίμα, πιθανά λόγω νουκλεολυτικής δράσης των ιστών και υγρών του σώματος.

Σε ένα πειραματικό μοντέλο, DNA από θερμικά φονευμένο στέλεχος *Borrelia burgdorferi* ενέθηκε ενδοδερμικά σε σκύλο. Με PCR ανιχνεύθηκε το αντίστοιχο DNA μόνο για τρεις εβδομάδες, γεγονός που υπονοεί ότι κατά τη διάρκεια φυσικής, οξείας λοίμωξης το DNA νεκρών μικροοργανισμών απομακρύνεται γρήγορα (Staubinger, 2000). Τα ευρήματα αυτά ενισχύουν τη θεωρία ότι το DNA της *B. melitensis* που ανιχνεύεται μεγάλο χρονικό διάστημα μετά τη λοίμωξη προέρχεται από ζωντανά βακτήρια με λοιμογόνο δύναμη ικανή να προκαλέσει συμπτώματα (Castano and Solera, 2009).

Η μόνη επικρατούσα παθοφυσιολογική υπόθεση είναι ότι, τουλάχιστον στην πλειοψηφία των ασθενών, τα είδη της *Brucella* επιμένουν εντός του ανθρώπινου οργανισμού παρά την προφανή κλινική ίαση. Το παθογόνο μπορεί να πολλαπλασιάζεται με χαμηλή συχνότητα και να προκαλεί παροδική, χαμηλού επιπέδου βακτηριαμία που μπορεί να αντιμετωπισθεί από το ανοσοποιητικό σύστημα του οργανισμού ώστε να αποφευχθεί η εμφάνιση κλινικής νόσου. Σ' αυτήν την περίπτωση, η βρουκέλλωση πρέπει να θεωρηθεί σαν χρόνια λοίμωξη (προσομοιάζουσα με την φυματίωση), η κλινική εκδήλωση της οποίας εξαρτάται από την ισορροπία ανάμεσα στο ανοσοποιητικό σύστημα και στην παθογένεια του μικροβίου.

Αρκετές μελέτες ασθενών με χρόνια βρουκέλλωση έχουν πράγματι εστιάσει σε μια τέτοια απορρύθμιση αυτής της ισοροπίας (Bouga et al, 1999). Το επίπεδο στο οποίο αυτή η αλληλεπίδραση εμφανίζεται είναι ασαφές. Χαμηλού επιπέδου βακτηριαμία μπορεί να μην ανιχνευτεί εύκολα και η παρακολούθηση μέσω καλλιέργειών δειγμάτων μυελού οστών, θεωρητικά βάσιμη και προτεινόμενη ως "gold standard" (Gotuzzo et al, 1986), δεν είναι εύκολα εφαρμόσιμη. Επιπλέον, κάποιος θα μπορούσε να υποθέσει ότι, με τη χρήση πιο ευαίσθητων διαγνωστικών τεχνικών, θα μπορούσε να αποδειχθεί ότι ασθενείς με μη ανιχνεύσιμα φορτία στην πραγματικότητα έχουν μικροβιακά φορτία.

Αντιφατικά αποτελέσματα έχουν αναδειχθεί από τις λίγες σχετικές μελέτες, με μικρότερους αριθμούς δειγμάτων, που έχουν πρόσφατα δημοσιευτεί. Παρόμοια με την παρούσα μελέτη ευρήματα προέκυψαν από μια ισπανική μελέτη (Navarro et al, 2006) που κατέδειξε ότι 4 από τα

7 άτομα που υποτροπίασαν και 3 από τα 11 που δεν υποτροπίασαν είχαν επίσης ανιχνεύσιμα βακτηριακά φορτία μετά από μακρόχρονη παρακολούθηση. Παρόμοιο αποτέλεσμα αναφέρθηκε επίσης σε μια μελέτη στο Περού (Maas et al, 2007) στην οποία χρησιμοποιήθηκε απλή PCR για παρακολούθηση. Η πλειοψηφία των ασθενών είχαν θετικά αποτελέσματα ακόμη και μήνες μετά την ολοκλήρωση της θεραπείας. Επίσης σε μια πρόσφατη μελέτη παρακολούθησης του βακτηριακού DNA με RT PCR 6 από τους 11 ασθενείς είχαν θετικά δείγματα κατά την περίοδο παρακολούθησης μετά τη θεραπεία (Castano and Solera, 2009). Αυτά τα αποτελέσματα, ωστόσο, δεν αναπαράχθηκαν σε μια άλλη ισπανική μελέτη (Queiro-Ortuno et al, 2005a) που χρησιμοποίησε μια ελάχιστα διαφορετική μεθοδολογία. Δύο άλλες μελέτες με χρήση RT PCR δεν εκτίμησαν την εξέλιξη του βακτηριακού φορτίου κατά τα στάδια της νόσου (Debeaumont et al, 2005; Kattar et al, 2007).

Κάποιος θα μπορούσε να υποθέσει ότι ασθενείς με ανιχνεύσιμα βακτηριακά φορτία ήταν απλά ανεπαρκώς θεραπευμένοι και γι' αυτό υποψήφιοι για υποτροπή. Ωστόσο, ο μικρός αριθμός ασθενών που υποτροπίασαν (6), δεν ανήκε κατά προτίμηση στην υποομάδα ασθενών με συνεχώς ανιχνεύσιμο μικροβιακό φορτίο. Επιπρόσθετα, αυτοί οι ασθενείς δεν παρουσίαζαν υψηλότερα φορτία ούτε κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση μ' αυτούς που δεν υποτροπίασαν. Επιπλέον, οι υποτροπές συνήθως εμφανίζονται κατά τη διάρκεια των πρώτων μηνών μετά το τέλος της θεραπείας, και σε ένα ποσοστό 90% κατά τη διάρκεια του πρώτου χρόνου παρακολούθησης (Pappas et al, 2005a), ένα όριο που ξεπεράστηκε από τους ασθενείς μας. Δεν μπορούν να εξαχθούν συμπεράσματα για το αν ένα συγκεκριμένο θεραπευτικό σχήμα σχετιζόταν με μακροπρόθεσμη ανίχνευση μικροβιακών φορτίων γιατί η πλειοψηφία των ασθενών αντιμετωπίστηκε με το ίδιο σχήμα. Στην ισπανική μελέτη (Navarro et al, 2006), χρησιμοποιήθηκαν πολυάριθμα σχήματα και το μικρό στατιστικό δείγμα δεν επέτρεψε την εξαγωγή συμπερασμάτων.

Κάποιος θα μπορούσε να ισχυριστεί ότι η σπουδαιότητα της μελέτης μειώνεται από το γεγονός ότι όλοι οι ασθενείς με ανιχνεύσιμα DNA φορτία κατά την περίοδο παρακολούθησης είχαν αρνητικές καλλιέργειες αίματος: έτσι τα αποτελέσματα της PCR μπορούν να θεωρηθούν αμφίβολα. Ωστόσο αυτό το γεγονός (δηλ. αρνητικά αποτελέσματα στις καλλιέργειες αίματος) υπογραμμίζει την σημασία των ευρημάτων μας. Αν αυτοί οι ασθενείς είχαν θετικές αιμοκαλλιέργειες, θα θεωρούνταν *de facto* ότι υποτροπίασαν (επανεμφάνιση θετικών αποτελεσμάτων στις καλλιέργειες αίματος θεωρείται ενδεικτικό υποτροπής ακόμη και απουσία συμπτωμάτων). Αυτοί οι ασθενείς, ωστόσο, δεν είχαν κανένα κριτήριο υποτροπής ή νόσου γενικότερα, παρά το ανιχνεύσιμο φορτίο DNA *Brucella*. Περιπτώσεις επανεμφάνισης λοίμωξης από *Brucella*

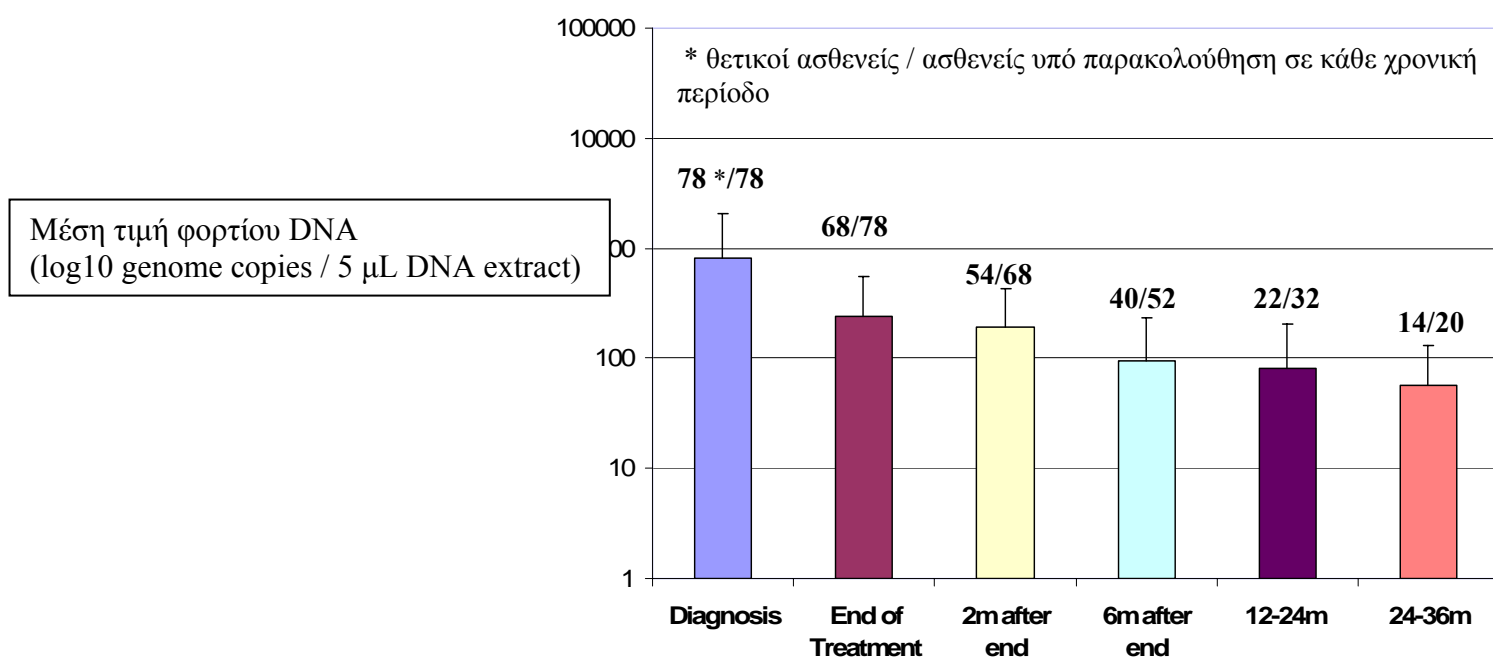
χρόνια μετά την αρχικά συμπτώματα δεν είναι σπάνιες, ειδικά στο πλαίσιο επιμόλυνσης και παραμονής του βακτηρίου σε προσθετικό εμφύτευμα (Dhand and Ross, 2007).

Κάποιος θα μπορούσε να ισχυριστεί ότι υπάρχει προκατάληψη στα αποτελέσματα μας, μιας και το βακτηριακό φορτίο εκτιμήθηκε μόνο σε 20 ασθενείς στην περίοδο των 24-36 μηνών. Ωστόσο, οι υπόλοιποι ασθενείς της μελέτης δεν υπέστησαν υποτροπή, όπως αξιολογήθηκε με τηλεφωνική συνέντευξη που πραγματοποιήθηκε κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου· έτσι, οι 20 ασθενείς των οποίων τα δεδομένα του βακτηριακού φορτίου ήταν διαθέσιμα μπορούν να θεωρηθούν αντιπροσωπευτικοί όλου του δείγματος. Επιπλέον, παρόμοια τάση παρατηρήθηκε ανάμεσα σε μεγαλύτερες υποομάδες ασθενών στα ποικίλα χρονικά πλαίσια της περιόδου παρακολούθησης που απεικονίζονται στο σχεδιάγραμμα 1.

Η αναγνώριση ότι η βρουκέλλωση είναι μια χρόνια λοίμωξη σημαίνει ότι η κατανόηση από εμάς της παθοφυσιολογίας, η διάγνωση και η θεραπεία της νόσου μπορεί να αλλάξουν δραστικά. Αρχικά, πρέπει να διερευνηθεί τι καταστέλλει την παθογόνο δράση των ειδών *Brucella* κατά την διάρκεια της παρατεινόμενης περιόδου μετά τη θεραπεία που το βακτηριακό φορτίο είναι ανιχνεύσιμο. Επιπλέον πρέπει να διευκρινιστεί ποιοι είναι οι ουσιώδεις παράγοντες αυτής της καταστολής και αν ασθενείς με χρόνια βρουκέλλωση έχουν έλλειμμα σε αυτούς. Κατά δεύτερο λόγο, πρέπει να προσδιοριστεί αν το αρχικό βακτηριακό φορτίο σχετίζεται με τη βαρύτητα της νόσου, με τάση για υποτροπή ή με ανάγκη για ενισχυμένη αντιβιοτική θεραπεία. Κατά τρίτο λόγο, πρέπει να βρεθούν άλλοι προγνωστικοί δείκτες υποτροπής, γιατί από τη RT PCR δεν ανέκυψε κάποια συσχέτιση στην παρούσα μελέτη. Και τελικά, όσον αφορά τη θεραπεία, κάποιος πρέπει να επαναπροσδιορίσει τους στόχους της θεραπείας. Η εκρίζωση δεν ετίθετο ποτέ ως θέμα στη βρουκέλλωση, και το «αποδεκτό» ποσοστό υποτροπών ήταν αυθαίρετο. Ωστόσο, το μελλοντικό ερώτημα θα είναι το αν θα θεραπεύσει ο κλινικός επιθετικά, παρακολουθώντας το βακτηριακό φορτίο, ή αν απλά θα αγνοήσει τα αποτελέσματα επιτρέποντας στο παθογόνο να παρασιτεί εντός του ανθρώπινου οργανισμού (Pappas et al, 2005b).

Συμπερασματικά, οι νεότερες μοριακές τεχνικές είναι ταχείες, ασφαλείς για το προσωπικό του εργαστηρίου και παρουνισιάζουν καλύτερη διαγνωστική ευαισθησία από τις κλασσικές διαγνωστικές μεθόδους στο σύνολο τους και υψηλό ποσοστό ευαισθησίας. Ο κλινικός γιατρός μπορεί να γνωρίζει ότι ο εργαστηριακός γιατρός διαθέτει τα νέα αυτά διαγνωστικά εργαλεία που μπορούν να τον βοηθήσουν στην ακριβή και έγκαιρη αιτιολογική διάγνωση της νόσου μειώνοντας την άσκοπη παραμονή στο νοσοκομείο, την μη σωστή χρήση των αντιβιοτικών και

την άστοχη διερεύνηση άλλων εμπύρετων νοσημάτων. Επιπρόσθετα η δυνατότητα παρακολούθησης του βακτηριακού DNA με την ποσοτική RT-PCR, μπορεί να βοηθήσει στη διεξαγωγή χρήσιμων συμπερασμάτων για κάθε ασθενή ξεχωριστά όσον αφορά την πραγματική σχέση του με το παθογόνο σε κάθε φάση «συνύπαρξης» τους, εξατομικεύοντας έτσι τη διαγνωστική και θεραπευτική προσέγγιση



Σχεδιάγραμμα 1: Παρακολούθηση του βακτηριακού DNA στους 78 ασθενείς με βρουκέλλωση

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν αφενός μεν η αξιολόγηση της εφαρμογής δύο (2) μοριακών τεχνικών στη διάγνωση της οξείας βρουκέλλωσης, της PCR-ενζυμοσυνδετικής-ανοσολογικής μεθοδολογίας (PCR-ELISA) και της Real Time PCR (RT-PCR), αφετέρου δε η παρακολούθηση με τη μέθοδο της RT-PCR του βακτηριακού DNA, πριν και μετά τη θεραπεία και η πιθανή συσχέτιση του με την έκβαση και πορεία της νόσου.

Όσον αφορά την εφαρμογή της PCR-ELISA, εξετάστηκαν δείγματα ολικού αίματος και ορού από 243 ασθενείς. Μετά την αντίδραση πολλαπλασιασμού ενός τμήματος με 223 ζεύγη βάσεων του γονιδίου που κωδικοποιεί για τη σύνθεση μιας ανοσογόνου μεμβρανικής πρωτεΐνης μεγέθους 31 kDa (BCSP31), ειδικής για το γένος της *Brucella* με τη χρήση ειδικών εκκινητών, ακολουθούσε το στάδιο ανίχνευσης. Κατά το στάδιο αυτό το προϊόν πολλαπλασιασμού ανιχνευόταν μετά από υβριδισμό σε μικροπλάκα με τη βοήθεια ειδικού ιχνηθέτη σημασμένου με βιοτίνη (biotinylated probe).

Για την αξιολόγηση της ποσοτικής RT PCR μεθοδολογίας στη διάγνωση της βρουκέλλωσης, εξετάστηκαν δείγματα ολικού αίματος και ορού από 126 ασθενείς με διάγνωση οξείας νόσου. Από αυτούς για την παρακολούθηση του βακτηριακού DNA, εξετάστηκαν από έναν υποπληθυσμό 78 ασθενών τουλάχιστον 3 δείγματα ολικού αίματος. Η αντίδραση πολλαπλασιασμού ενός τμήματος με 207 ζεύγη βάσεων του γονιδίου που κωδικοποιεί για τη σύνθεση της ίδιας μεμβρανικής πρωτεΐνης (BCSP31) και η ανίχνευση του προϊόντος πολλαπλασιασμού με την χρησιμοποίηση της φθορίζουσας τεχνικής των hybridization probes γινόταν ταυτόχρονα στο ίδιο τριχοειδές σωληνάριο ειδικού θερμικού κυκλοποιητή (LightCycler). Το στάδιο πολλαπλασιασμού ακολουθούνταν από μελέτη της καμπύλης τήξης του προϊόντος (melting curve analysis) που επέτρεπε και ποιοτική ανάλυση για τον έλεγχο της ειδικότητας του πολλαπλασιασμένου γενετικού υλικού.

Διακόσιοι σαράντα ένας από τους 243 ασθενείς που μελετήθηκαν με την PCR-ELISA είχαν ανιχνεύσιμο DNA *Brucella*, είτε στα δείγματα ολικού αίματος, είτε στα δείγματα ορού : σε 149 (61,3%) ασθενείς ανιχνεύθηκε DNA και στα δύο είδη δειγμάτων, σε 43 (17,7%) μόνο στα δείγματα ορού και σε 49 (20,2%) μόνο στα δείγματα ολικού αίματος. Η διαγνωστική ειδικότητα της μεθόδου και για τα δύο είδη δειγμάτων ήταν 100%, ενώ η ευαισθησία ήταν 81,5% για τα δείγματα ολικού αίματος, 79% για τα δείγματα ορού και 99,2% για το συνδυασμό των δειγμάτων.

Στους 123 από τους 126 ασθενείς που μελετήθηκαν με την RT-PCR, ανιχνεύτηκε DNA *Brucella* είτε στο ολικό αίμα, είτε στον ορό είτε και στα δύο είδη δειγμάτων : σε 108 (85,7%) ασθενείς και στα δύο είδη

δειγμάτων, σε 6 (4,8%) μόνο στα δείγματα ορού και σε 9 (7,1%) μόνο στα δείγματα ολικού αίματος. Η διαγνωστική ειδικότητα της μεθόδου και για τα δύο είδη κλινικών δειγμάτων ήταν 100%, ενώ η ευαισθησία ήταν 92,8% για τα δείγματα ολικού αίματος, 90,5% για τα δείγματα ορού και 97,6% για το συνδυασμό των δύο ειδών κλινικών δειγμάτων.

Από τον υποπληθυσμό των 78 ασθενών, η πλειοψηφία (87% στο τέλος της θεραπείας, 77% στους 6 μήνες μετά την ολοκλήρωση της θεραπείας και 70% μετά το δεύτερο έτος από το τέλος της θεραπείας) είχαν επίμονα ανιχνεύσιμο βακτηριακό φορτίο, αν και ήταν ασυμπτωματικοί. Οι 6 ασθενείς που υποτροπίασαν, δεν είχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στο βακτηριακό τους φορτίο σε σχέση μ' αυτούς που δεν υποτροπίασαν.

Συμπερασματικά, η εφαρμογή των δύο μεθοδολογιών για την ανίχνευση του DNA της *Brucella* έδειξε ότι πρόκειται για ευαίσθητες και ειδικές μέθοδοι που μπορούν να βοηθήσουν στην έγκαιρη και έγκυρη διάγνωση της οξείας βρουκέλλωσης. Επιπλέον, η RT-PCR μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παρακολούθηση του βακτηριακού φορτίου και επομένως της πορείας της νόσου του ασθενή καθώς και την εξαγωγή χρήσιμων συμπερασμάτων για τη βελτίωση της θεραπευτικής προσέγγισης.

SUMMARY

The aim of this study was the evaluation of application two (2) molecular methods in diagnosis of acute brucellosis, polymerase chain reaction-enzyme immunoassay (PCR-EIA) and real time PCR (RT-PCR). RT-PCR was also used for monitoring bacterial DNA load before, during and after treatment in order to find a possible correlation with the outcome and course of the disease.

Whole blood and serum specimens from 243 patients with acute brucellosis were examined by PCR-EIA. Following the amplification of a 223-bp sequence of a gene that codes for the synthesis of an immunogenic 31 kDa membrane protein specific for the *Brucella* genus (BCSP31), the amplified product was detected in a microtiter plate by hybridization with specific biotinylated probe.

For the evaluation of a quantitative RT PCR assay, whole blood and serum specimen from 126 patients with acute brucellosis were examined. The evolution of bacterial DNA load was then monitored in 78 from these patients with at least 3 whole blood specimens. The RT PCR assay was based on direct amplification of a 207-base pair DNA sequence of the same membranous protein (BCSP31). The amplification product was detected by using the hybridization probes fluorescence technique. The amplification reaction and the detection of amplified product were performed at the same glass capillary of thermal cycler (LightCycler). After amplification, melting curve analysis was performed to verify the specificity of PCR products.

Two hundred forty-one of the 243 patients, who were studied with PCR-EIA, had detectable *Brucella* DNA in either whole blood or serum specimens: 149 (61.3%) patients were positive in both blood and serum specimens, 43 (17.7%) were positive in serum specimens only, and 49 (20.2) were positive in whole blood specimens only. The diagnostic specificity of the PCR-EIA assay for both specimen categories was 100%, while the sensitivity was 81.5% for whole blood specimens, 79% for serum specimens, and 99.2% for whole blood and serum specimens combined.

One hundred twenty-six of the 126 patients, who were studied with PCR-EIA, had detectable *Brucella* DNA in either whole blood or serum specimens: 108 (85.7%) patients were positive in both blood and serum specimens, 6(4.8%) were positive in serum specimens only, and 9 (7.1%) were positive in whole blood specimens only. The diagnostic specificity of the RT PCR assay for both specimen categories was 100%, while the sensitivity was 92.8% for whole blood specimens, 90.5% for serum specimens, and 97.6% for whole blood and serum specimens combined.

The majority of 78 patients (87% at the end of treatment, 77% at 6 months after treatment completion, and 70% at >2 years after treatment) exhibited persistent detectable microbiological load despite being asymptomatic. The 6 patients who experienced relapse did not exhibit any statistically significant difference in their bacterial load at any stage of disease or during follow-up.

In conclusion, the application of two assays for the detection of *Brucella* DNA showed that they are sensitive and specific methods which can assist the accurate rapid diagnosis of acute brucellosis efficiently. Moreover, RT PCR assay can be used for monitoring bacterial DNA load and, subsequently, the course of the disease in order to improve the clinical management of patients with brucellosis.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Abdoel TH, Smits HL (2007) Rapid latex agglutination test for the sero diagnosis of human brucellosis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 57: 123-128.
2. Akova M, Uzun O, Alkalin HE, et al (1993) Quinolones in treatment of human brucellosis: comparative trial of ofloxacin-rifampin versus doxycycline-rifampin. *Antimicro Agents Chemother* 7: 1831-1834.
3. Akova M, Gur D, Livermore DM, Kocagoz T, Alkalin HE (1999) In vitro activities of antibiotics alone and in combination against *Brucella melitensis* at neutral and acidic pHs. *Antimicrob Agents Chemother* 43:1298-1300.
4. Al Dahook S, Tomaso H, Nockler K, Neubauer H, Frangoulidis D (2003) Laboratory-based diagnosis of brucellosis-a review of the literature. Part I: techniques for direct detection and identification of *Brucella* spp. *Clin Lab* 49: 487-505.
5. Al Dahook S, Tomaso H, Nockler K, Neubauer H (2004) The detection of *Brucella* spp. using PCR-ELISA and real-time PCR assays. *Clin Lab* 50: 387-394.
6. Al Dahook S, Fleche PL, Nockler K, et al. (2007) Evaluation of *Brucella* MLVA typing for human brucellosis *J Microbiol Methods* 69: 137-145.
7. Al Faran MF (1990) *Brucella meli*ensis endogenous endophthalmitis. *Ophthalmologica* 201 :19-22.
8. Alishkan H (2008) The value of culture and serological methods in the diagnosis of human brucellosis. *Microbiyol Bul* 42(1): 185-195.
9. Allardet-Servent A, Bourg G, Ramuz M, et al. DNA polymorphism in strains of the genus *Brucella*. *J Bacteriol* 170: 4603-4607.
10. Alton GC, Jones LM, Pietz DE (1975) Laboratory techniques in brucellosis, 2nd edn World Health Organization, Geneva.
11. Andreoletti L, Hober D, Belaich S, Lobert PE, Dewilde A, Watre P (1996) Rapid detection of Enterovirus in clinical specimens using PCR and microwell capture hybridization assay. *J Virol Methods* 62: 1-10.
12. Araj GF, Kaufman AF (1989) Determination of *Brucella* specific IgG, IgM and IgA by ELISA in sera of patients with brucellosis against *B.*

- melitensis* major outer membrane proteins (MOMP) and whole cell heat killed (HK) antigens. J Clin Microbiol 27: 1909-1912.
13. Araj GF, Dhar R, Lastimoza JL, Haj M (1990) Indirect fluorescent antibody test versus enzyme linked immuno sorbent assay and agglutination tests in the serodiagnosis of patient with brucellosis. Serodiag Immunother Infect Dis 4: 1-8.
 14. Araj GF, Awar GN (1997) The value of ELISA vs negative Coombs findings in the serodiagnosis of human brucellosis. Serodiag Immunother Infect Dis 8: 169-172.
 15. Araj GF (1999) Human brucellosis: a classical infectious disease with persistent diagnostic challenges. Clin Lab Sci 12: 207-212.
 16. Araj GF (2010) Update on laboratory diagnosis of human brucellosis. Int J Antimicrob Agents (article in press).
 17. Arellano-Reynoso B, Lapaque N, Salcedo S, Briones G, Ciocchini AE, Ugalde R, Moreno E, Moriyon I, Gorvel JP (2005) Cyclic β -1,2-glycan is a *Brucella* virulence factor required for intracellular survival. Nat Immunol 6:618-625.
 18. Arenas GN, Staskevich AS, Aballay J, Mayorga LS (2000) Intracellular trafficking of *Brucella abortus* in J774 macrophages. Infect Immun 68:4255-4263.
 19. Ariza J, Pellicer T, Pallares R, et al (1992) Specific antibody profile in human brucellosis. Clin Infect Dis 14:131-140.
 20. Ariza J, Corredoira J, Pallares R, et al (1995) Characteristics of and risk factors for relapse of brucellosis in humans. Clin Infect 20: 1241-1249.
 21. Ariza J, Corredoira J, Pallares R, et al (1995) Characteristics of and risk factors for relapse of brucellosis in humans. Clin Infect Dis 20: 1241-1249.
 22. Ariza J, Pigrau C, Canas C, et al (2001) Current understanding and management of chronic hepatosplenic suppurative brucellosis. Clin Infect Dis 32: 1024-33.
 23. Ates Ö, Çayli SR, Koçak A, Kutlu R, Önal RE, Tekiner A (2005) Spinal epidural abscess caused by brucellosis-two cases reports-. Neurol Med Chir (Tokyo) 45: 66-70.

24. Avdikou I, Maipa V, Alamanos Y (2005) Epidemiology of human brucellosis in a defined area of northwestern Greece. *Epidemiol Infect* 133: 905-10.
25. Baddour MM, Alkhalifa DH (2008) Evaluation of three polymerase chain reaction techniques for detection of *Brucella* DNA in peripheral human blood. *Can J Microbiol* 54: 352-357.
26. Baily GC, Kraahn JB, Drasar BS, Stokeer NG (1992) Detection of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* by DNA amplification. *J Trop Med Hyg* 95: 271-275.
27. Baldi PC, Miguel CA, Wallach JC (1996) Serological follow-up of human brucellosis by measuring IgG antibodies to lipopolysaccharide and cytoplasmic proteins of *Brucella* species. *Clin Infect Diseases* 22: 446-455.
28. Baron EJ, Scott JD, Tompkins LS (2005) Prolonged incubation and extensive subculturing do not increase recovery of clinically significant microorganisms from standard automated blood cultures. *Clin Infect Dis* 41: 1677-1680.
29. Baucheron S, Grayon M, Zygmunt MS, Cloeckert A (2002) Lipopolysaccharide heterogeneity in *Brucella* strains isolated from marine mammals. *Res Microbiol* 153: 277-280.
30. Baum M, Zamir O, Bergman-Rios, et al (1995) Comparative evaluation of microagglutination test as supplementary diagnostic methods for brucellosis. *J Clin Microbiol* 33:2166-2170.
31. Baycam N, Esener H, Ergonul O, Eren S, Celikbas AK, Dokuzoguz B (2004) In vitro antimicrobial susceptibility of *Brucella* species. *Intern J Antimicrob Agents* 23: 405-407.
32. Baysallar M, Aydogan H, Kilic A, Kucukkaraaslan A, Senses Z, Doganci L (2006) Evaluation of the BacT/ALERT and BACTEC 9240 automated blood culture systems for growth time of *Brucella* species in a Turkish tertiary hospital. *Med Sci Monit* 12: BR235-238.
33. Bertotto A, Gerli R, Spinozzi F, Muscat C, Scalise F, Castellucci G, Sposito M, Candio F, Vaccaro R (1993) Lymphocytes bearing the gamma delta T cell receptor in acute *Brucella melitensis* infection. *Eur J Immunol* 23:1177-1180.

34. Bevan LEW (1921-22) Infectious abortion of cattle and its possible relation to human health. *Trans R Soc Trop Med Hyd* 15: 215-31.
35. Bingol A, Togay-Isikay C (2006) Neurobrucellosis as an exceptional cause of transient ischemic attacks. *Eur J Neurol* 13:544-8.
36. Boschiroli ML, Ouahrani-Bettache S, Foulongne V, Michaux-Charachon S, Bourg G and Allardet-Servent A et al (2001) The *Brucella suis* virB operon is induced intracellularly in macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:1544-1549.
37. Bougnoux ME, Dupont C, Mateo J, Saulnier P, Faivre V, Payen D, Nicolas-Chanoine MH (1999) Serum is more suitable than whole blood for diagnosis of systemic candidiasis by nested PCR. *J Clin Microbiol* 37: 925-930.
38. Boura P, Skendros P, Kountouras J, Zacharioudaki E, Tsapas T (1999) Effects of bacterial extracts on the immunologic profile in chronic relapsing brucellosis patients. *Int J Immunopathol Pharmacol* 12: 103-111.
39. Bouza E, Garcia de la Torre M, Parra F, et al (1987) Brucellar meningitis. *Rev Infect Dis* 9 :810-822.
40. Brachrach G, Banai M, Bardenstein S, Hoida G, Genizi A, Bercovier H (1994) *Brucella* ribosomal protein L7/L12 is a major component in the antigenicity of Brucellin INRA for delayed hypersensitivity in *Brucella*-sensitized guinea-pigs. *Infect Immun* 62:5361-6.
41. Bravo MJ, Colmenero JD, Alonso A, Caballero A (2003) HLA-B39 allele confers susceptibility to osteoarticular complications in human brucellosis. *J Rheumatol* 30: 1051-3.
42. Brew SD, Perrett LL, Stack JA, MacMillan AP, Staunton NJ (1999) Human exposure to *Brucella* recovered from a sea mammal. *Vet Rec* 144:483.
43. Bricker BJ, Halling SM (1994) Differentiation of *Brucella abortus* bv. 1, 2 and 4, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis*, and *Brucella suis* bv. 1 by PCR. *J Clin Microbiol* 32: 2660-2666.
44. Bricker BJ, Ewalt DR, MacMillan AP, Foster G, Brew S (2000) Molecular characterization of *Brucella* strains isolated from marine mammals. *J Clin Microbiol* 38: 1258-62.

45. Bricker BJ, Ewalt DR, Halling SM (2003) *Brucella* 'HOOF-Prints': strain typing by multi-locus analysis of variable number tandem repeats (VNTRs). *BMC Microbiol* 3:15.
46. Brown PD, Gravenkamp C, Carrington DG, van de Kemp H, Harrtskeeri RA, Edwards CN, Everard CO, Terpstra WJ, Levett PN (1995) Evaluation of the polymerase chain reaction for early diagnosis of leptospirosis. *J Med Microbiol* 43: 110-114.
47. Bryk R, Griffin P, Nathan C (2000) Peroxynitrite reductase activity of bacterial peroxiredoxins. *Nature* 407: 211-215.
48. Bundle DR, Cherwonogrodzky JW, Gidney JW et al (1992) Definition of *Brucella* A and M epitopes by monoclonal typing reagents and synthetic oligosaccharides. *Infect Immun* 57:2829-2836.
49. Candara B, Lopez Merino A, Rogel MA, Martinez- Romero E (2001) limited genetic diversity of *Brucella* spp. *J Clin Microbiol* 39: 235-240.
50. Capasso L (2002) Bacteria in two-millenia-old cheese, and related epizoonoses in Roman populations. *J Infect* 45:122-127.
51. Casanas MC, Queipo-Ortuno MI, Rodriguez-Torres A, Ondura A, Colmenero JD, Morata P (2001) Specificity of a polymerase chain reaction of a target sequence on the 31-kilodalton *Brucella* antigen DNA used to diagnose human brucellosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 20: 127-131.
52. Casao MA, Smits HL, Navarro E, Solera J (2003) Clinical utility of a dipstick assay in patients with brucellosis: correlation with the period of evolution of the disease. *Clin Microbiol Infect* 9: 301-305.
53. Castano MJ, Solera J (2009) Chronic brucellosis and persistence of *Brucella melitensis* DNA. *J Clin Microbiol* 47: 2084-2089.
54. Chapin KC, Lauderdale T (2007) Reagents, stains and media: Bacteriology. In *Manual of Clinical Microbiology*. Eds, PR Murray, EJO Baron, JH Jorgensen, MA Pfaller, ML Landry. Ninth ed. Washington, D.C. American Society for Microbiology, pp 334-364.
55. Christopher GW, Agan MB, Cieslak TJ, Olson PE (2005) History of U.S. military contributions to the study of bacterial zoonoses. *Mil Med* 170, Suppl. 39-48.

56. Citak EC, Citak FE, Tanyeri B, Arman D (2010) Hematologic manifestations of brucellosis in children : 5 years experience of an Anatolian center. *J Pediatr Hematol Oncol* 32(2): 137-40.
57. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2010) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twentieth Informational Supplement. M100-S20.
58. Cloeckaert A, Verger JM, Crayon M, et al. (1996) Molecular and immunological characterization of the major outer membrane proteins of *Brucella*. *FEMS Microbiol Lett* 145:1-8.
59. Cloeckaert A, Verger JM, Grayon M, Vizcaino N (1996) Molecular and immunological characterization of the major outer membrane proteins of *Brucella*. *FEMS Microbiology Lett* 145:1-8.
60. Cloeckaert A, Grayon M, Grepinet O (2000) An IS711 element downstream of the bp26 gene is a specific marker of *Brucella* spp. isolated from marine mammals. *Clin Diagn Lab Immunol* 7: 835-639.
61. Cloeckaert A, Verger JM, Grayon M, et al (2001) Classification of *Brucella* spp. isolated from marine mammals by DNA polymorphism at the omp2 locus. *Microbes Infect* 3: 729-738.
62. Colmenero JD, Fernandez-Gallardo LC, Agundez JA, Sedenio J, Benitez J, Valverde E (1994) Possible implications of doxykykline-rifampin interaction for treatment of brucellosis. *Antimicrob Agents Chemother* 38: 2798-2802.
63. Colmenero JD, Queipo-Ortuno MI, Pachon ME et al. (2003) Rapid diagnosis of human brucellosis by quantitative real time PCR. *Brucellosis 2003 International Research Conference, Ramplona (Spain); September 15-17th, 2003 : 112.*
64. Colmenero JD, Queipo-Ortuno MI, Reguera JM, Baeza G, Salazar JA, Morata P (2005) Real time polymerase chain reaction: a new powerful tool for the diagnosis of neurobrucellosis. *J Neurosurg Psychiatry* 76: 1025-1027.
65. Conde-Alvarez R, Grillo MJ, Salcedo SP, de Miguel MJ, Fugier E, Gorvel JP, Moriyon I, Iriatre M (2006) Synthesis of phosphatidylcholine, a typical eukaryotic phospholipid, is necessary for full virulence of the intracellular bacterial parasite *Brucella abortus*. *Cell Microbiol* 8:1322-1335.

66. Corbel MJ (1998) *Brucella*. In Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections. Eds, L Collier, A Balows, and M Sussman. 9th ed. Oxford University Press, Inc., New York, USA, pp 829-852.
67. Corbel MJ, Morgan WJB (1975) Proposals for minimal standards for descriptions of new species and biotypes of the genus *Brucella*. *Int J Syst Bacteriol* 25:83-9.
68. Corbel MJ, Brinley-Morgan WJ (1984) Genus *Brucella*. In: Krieg NR, Holt JG (eds) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Baltimore, MD: Williams and Wilkins, Vol. 1, pp. 377-388.
69. Corbel MJ, Stuart FA, Brewer RA (1984) Observations in serological cross-reactions between smooth *Brucella* species and organisms of other genera. *Dev Biol Stand* 56: 341-348.
70. Corbel MJ, Thomas EL (1985) Use of phage for the identification of *Brucella canis* and *Brucella ovis* cultures, *Res. Vet. Sci*, 38:35-40.
71. Corbel MJ, Hendry DMFD (1985) Urease activity of *Brucella* species. *Res Vet Sci* 38: 252-3.
72. Cutler SJ, Whatmore AM, Commander NJ (2005) Brucellosis-new aspects of an old disease. *Journal of Applied Microbiology* 98:1270-1281.
73. Dabdoob WA, Abdula ZA (2000) A panel of eight tests in the sero diagnosis and immunological evaluation of acute brucellosis. *Eastern Mediterranean Health Journal* 6: 304-312.
74. Dakdouki GK, Al Awar GN (2005) *Brucella* prostatic abscess : first case report. *Scand J Infect Dis* 37(9): 692-94.
75. De BK, Stauffer L, Koylass MS, Sharp SE, Gee JE, Helsel LO, Steigerwalt AG, Vega R, Clark TA, Daneshvar MI, Wilkins PP, Whatmore AM (2008) Novel *Brucella* strain (BO1) associated with a prosthetic breast implant infection. *J Clin Microbiol* 46: 43-49.
76. De Jong MF, Sun YH, den Hartigh AB, van Dijl JM, Tsolis RM (2008) Identification of VceA and VceC, two members of the VjbR regulon that are translocated into macrophages by the *Brucella* type IV secretion system. *Mol Microbiol* 70: 1378-1396.
77. Debeaumont C, Falconnet PA, Maurin M (2005) Real-time PCR for detection of *Brucella* spp. DNA in human serum samples. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 24: 842-845.

78. Delrue R, Lestrade P, Tibor A, Letesson J and De Bolle X (2004) *Brucella* pathogenesis, genes identified from random large-scale screens. *FEMS Microbiol Lett* 231:1-12.
79. DelVecchio VG, Kapatal V, Redkar RJ, Patra G, Mujer C and Los T et al. (2002) The genome sequence of the facultative intracellular pathogen *Brucella melitensis*. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 99: 443-448.
80. Dhand A, Ross JJ (2007) Implantable cardioverter-defibrillator infection due to *Brucella melitensis*: case report and review of brucellosis of cardiac devices. *Clin Infect Dis* 44: e37-39.
81. Dornand J, Gross A, Lafont V, Liautard J, Oliaro J, Liautard JP (2002) The innate immune response against *Brucella* in humans. *Vet Microbiol* 90: 383-394.
82. Douglas JT, Rosenberg EY et al (1984) Porins of *Brucella* species. *Infect Immun* 44: 16-21.
83. Doyle TJ, Bryan RT (2000) Infectious disease morbidity in the US region bordering Mexico, 1990-1998. *J Infect Dis* 182:1503-10.
84. Dubray G (1972) Etude ultrastructurale des bacteries de colonies lisses (S) et rugueuses (R) du genre *Brucella*. *Ann Inst Pasteur (Paris)* 123: 171-93.
85. Dubray G and Plommet M (1976) Structure et constituents de *Brucella*. Characterisation des fractions et proprietes biologiques. *Dev Biol Stand* 31 :68-91.
86. Ellner PD, Stoessei CJ (1966) The role of temperature and anticoagulant on the in vitro survival of bacteria in blood. *J Infect Dis* 116: 238-242.
87. Eriksen N, Lemming L, Hojlyng N, Bruun B (2002) Brucellosis in immigrants in Denmark. *Scand J Infect Dis* 34: 540-42.
88. Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM, et al (2006) Real time PCR in clinical microbiology : applications for routine laboratory testing. *Clin Microbiol Rev* 19: 165-256.
89. Etemadi H, Raissadat A, Pickett MJ, Zafari Y, Vahedifar P (1984) Isolation of *Brucella* spp. from clinical specimens. *J Clin Microbiol* 20: 586.
90. Ewalt DR, Payeur JB, Martin BM, et al. (1994) Characteristics of a *Brucella* species from a bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). *J Vet Diagn Invest* 6:448-452.

91. Ezzedine H, Mourad M, van Osel C, Logge C, Squifflet JP, Renaul F, Wauters G, Giggi J, Wilmotte L, Haxhe JJ (1994) An out break of *Ochrobactrum anthropi* bacteraemia in five organ transplant patients. *J Hosp Infect* 27: 35-42.
92. Fecete A, Bantle JA, Halling SM, Sanborn MR (1990) Preliminary development of a diagnostic test for *Brucella* using polymerase chain reaction. *J Appl Bacteriol* 69: 216-227.
93. Ferrero MC, Fossati CA, Baldi PC (2009) Smooth *Brucella* strains invade and replicate in human lung epithelial cells without inducing cell death. *Microbes Infect* 11:476-483.
94. Ficht TA, Bearden SW, Sowa BA, et al (1989) DNA sequences and expression of the 36-kilodalton outer membrane protein gene of *Brucella abortus*. *Infect Immun* 57: 3281-3291.
95. Forestier C, Deleuil F, Lapaque N, Moreno E, Gorvel JP (2000) *Brucella abortus* lipopolysaccharide in murine peritoneal macrophages acts as a down regulator of T cell activation. *J Immunol* 165:5202-5210.
96. Fosgate GT, Carpenter TE, Chomel BB, Case JT, DeBess EE, Reilly KF (2002) Time-space clustering of human brucellosis, California, 1973-1992. *Emerg Infect Dis* 8: 672-78.
97. Foster G, MacMillan AP, Godfroid J, Howie F, Ross HM, Cloeckart A, Reid RJ, Brew S, Patterson IAP (2002) A review of *Brucella* sp. infection of sea mammals with particular emphasis on isolates from Scotland. *Vet Microbiol* 90: 563-580.
98. Foster G, Osterman BS, Godfroid J, Jacques I, Cloeckart A (2007) *Brucella ceti* sp. nov. and *Brucella pinnipedialis* sp. nov. for *Brucella* strains with cetaceans and seals as their preferred hosts. *Int J Syst Evol Microbiol* 57 : 2688-2693.
99. Franco MP, Mulder M, Gilman RH, Smits HL (2007) Human brucellosis. *Lancet Infect Dis* 7:775-786.
100. Fretin D, Fauconnier A, Kohler S, Halling S, Leonard S, Nisjens C, Ferooz J, Delrue RM, Danese I, Vandenhoute J, Tibor A, de Bolle X, Letesson JJ (2005) The sheathed flagellum of *Brucella melitensis* is involved in persistence in a murine model of infection. *Cell Microbiol* 7:687-698.

101. Garrity GM and Holt JG (2001) Taxonomic outline of the Archaea and Bacteria. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Eds, DR Boone, and RC Castenholz. Second ed., Vol. 1. Springer-Verlag, New York, N.Y.
102. Gee JE, DeBK, Levett PN, Whitney AM, Novak RT, Popovic T (2004) Use of 16S rRNA gene sequencing for rapid confirmatory identification of *Brucella* isolates. *J Clin Microbiol* 42: 3649-3654.
103. Georgiou PR, Young EJ (1991) Prolonged incubation in brucellosis. *Lancet* 337: 2325-2336.
104. Godfroid J (2002) Brucellosis in wildlife. *Rev Sci Tech Off Epiz* 21:277-286.
105. Godfroid J and Kasbohrer A (2002) Brucellosis in the European Union and Norway at the turn of the twenty-first century. *Vet Microbiol* 90: 135-145.
106. Godfroid J, Kasborer A (2002) Brucellosis in the European Union and Norway at the turn of the twenty first century. *Vet Microbiol* 90: 135-145.
107. Godfroid J, Cloeckaert A, Liautard JP, Kohler S, Fretin D, Walravens K, Garin-Bastuji B, Letesson JJ (2005) From the discovery of the Malta fever's agent to the discovery of a marine mammal reservoir, brucellosis has continuously been a re-emerging zoonosis. *Vet Res* 36: 313-326.
108. Gorvel JP, Moreno E (2002) *Brucella* intracellular life: from invasion to intracellular replication. *Vet Microbiol* 90: 281-297.
109. Gottuzo E, Garrillo C, Guerra J, Llosa L (1986) An evaluation of diagnostic methods for brucellosis-the value of bone marrow culture. *J Infect Dis* 153: 122-125.
110. Gransden WR, Eykyn SJ (1992) Seven cases of bacteremia due to *Ochrobactrum antropi*. *Clin Infect Dis* 15: 1068-1069.
111. Gross A, Terraza A, Ouahrani-Bettache S, Liautard JP, Dornald J (2000) In vitro *Brucella suis* infection prevents the programmed cell death of human monocytic cells. *Infect Immun* 68:342-351.
112. Gross A, Bouaboula M, Casellas P, Liautard JP, Dornand J (2003) Subversion and utilization of the host cell cyclic adenosine 5'-monophosphate/protein kinase a pathway by *Brucella* during macrophage infection. *J Immunol* 170:5607-5614.
113. Gulsun S, Aslan S, Satici O, Gul T (2011) Brucellosis in pregnancy. *Trop Doct* 41: 82-84.

114. Hadjichristodoulou C, Voulgaris P, Toulieres L, Babalis T, Manetas G, Goutziana G, Kastritis I, Tselentis I (1994). Tolerance of the human brucellosis vaccine and the intradermal reaction test for brucellosis. *Eur J Clin Microbiol* 13: 129-134.
115. Hadjinikolaou L, Triposkiadis F, Zairis M, et al (2001) Successful treatment of *Brucella melitensis* endocarditis with combined medical and surgical approach. *Eur J Cardiothorac Surg* 19: 806-810.
116. Halling SM, Peterson-Burch BD, Bricker BJ, Zuerner RL, Qing Z, Li LL, Kapur V, Alt DP, Olsen SC (2005) Completion of the genome sequence of *Brucella abortus* and comparison to the highly similar genomes of *Brucella melitensis* and *B. suis*. *J Bacteriol* 187: 2715-2726.
117. Her M, Cho DH, Kang SI, Cho YS, Hwang IY, Bae YC, Yoon H, Heo YR, Jung SC, Yoo H (2010) The development of a selective medium for the *Brucella abortus* strains and its comparison with the currently recommended and used medium. *Diagn Microbiol Infect Dis* 67(1): 15-21.
118. Herman L, De Ridder H (1992) Identification of *Brucella* spp. by using the polymerase chain reaction. *Appl Environ Microbiol* 58 : 2099-2101.
119. Hindler JF, Patel JB (2007) Susceptibility test methods: Fastidious bacteria. In *Manual of Clinical Microbiology*. Eds, PR Murray, EJO Baron, JH Jorgensen, MA Pfaller, ML Landry. Ninth ed. Washington, D.C. American Society for Microbiology, pp 1193-1213.
120. Hoffmann EM, Houle JJ (1983) Failure of *Brucella abortus* lipopolysaccharide (LPS) to activate the alternative pathway of complement. *Vet. Immunol. Immunopathol* 5:65-76.
121. Huber B, Scholz HC, Lucero N, Busse HJ (2009) Development of a PCR assay for typing and sub typing of *Brucella* species. *Int J Med Microbiol* 299: 563-573.
122. Humes R, Snyder JW (2007) Laboratory detection of potential agents of bioterrorism. In *Manual of Clinical Microbiology*. Eds, PR Murray, EJO Baron, JH Jorgensen, MA Pfaller, ML Landry. Ninth ed. Washington, D.C. American Society for Microbiology, pp 107-117.
123. Jahans KL, Foster G, Broughton ES (1997) The characteristics of *Brucella* strains isolated from marine mammals. *Vet Microbiol* 57: 373-382.

124. Jantos CA, Roggendorf R, Wupperman FN, Hegemann JH (1998) Rapid detection of *Chlamydia pneumoniae* by PCR-enzyme immunoassay. J Clin Microbiol 36: 1890-1894.
125. Jiang X, Leonard B, Benson R, Baldwin CL (1993) Macrophage control of *Brucella abortus*: role of reactive oxygen intermediates and nitric oxide. Cell Immunol 151:309-319.
126. Jimenez de Bagues MP, Dudal S, Dornand J, Gross A (2005) Cellular bioterrorism: how *Brucella* corrupts macrophage physiology to promote invasion and proliferation. Clin Immunol 114:227-238.
127. Jubier-Maurin V, Boigegrain RA, Cloeckert A, Gross A, Alvarez-Martinez MT, Terraza A, Liautard J, Kohler S, Rouot B, Dornand J, Liautard JP (2001) Major outer membrane protein Omp25 of *Brucella suis* is involved in inhibition of TNF- α production during infection of human macrophages. Infect Immun 69:4823-4830.
128. Jumas-Bilak E, Michaux-Charachon S, Bourg G, O'Callaghan D and Ramuz M (1998) Differences in chromosome number and genome rearrangements in the genus *Brucella*. Mol Microbiol 27: 99-106.
129. Kain KC, Brown AE, Lanar DE, Ballow WR, Webster HK (1993) Response of *Plasmodium vivax* variants to chloroquine, as determined by microscopy and quantitative polymerase chain reaction. Am J Trop Med Hyg 49: 478-484.
130. Karabay O, Sencan I, Kayas D, Sahin I (2004) Ofloxacin plus rifampicin versus doxykykline plus rifampicin in the treatment of brucellosis: a randomized clinical trial [ISRCTN11871179]. BMC Infect Dis 4:18.
131. Kattar MM, Zalloua PA, Araj GF, Samaha-Kfoury J, Shbaklo H, Kanj SK, Khalife S, Deed M (2007) Development and evaluation of real time polymerase chain reaction assays on whole blood and paraffin-embedded tissues for rapid diagnosis of human brucellosis. Diagn Microbiol Infect Dis 59: 23-32.
132. Kaufmann AF, Meltzer MI, Schmid GP (1997) The economic impact of a bioterrorist attack: are prevention and postattack intervention programs justifiable? Emerg Infect Dis 3: 83-94.
133. Kawamura S, Maesaki S, Noda T, Hirakata Y, Tomono K, Tashiro T, Kohno S (1999) Comparison between PCR and the detection of antigen in

- sera for diagnosis of pulmonary aspergillosis. *J Clin Microbiol* 37: 218-220.
134. Khan MY, Mah MW, Memish ZA (2001) *Clin Infect Dis* 32(8): 1172-1177.
135. Klein GC, Behan KA (1981) Determination of *Brucella* immunoglobulin G agglutinating antibody titer with dithiothreitol. *J Clin Microbiol* 14: 24-25.
136. Ko J, Splitter GA (2003) Molecular host-pathogen interaction in brucellosis: current understanding and future approaches to vaccine development for mice and humans. *Clin Microbiol Rev* 16:65-78.
137. Ko J, Splitter GA (2003) Molecular host-pathogen interaction in Brucellosis: current understanding and future approaches to vaccine development for mice and humans. *Clin Microbiol Rev* 16:65-78.
138. Kohler S, Michaux-Charachon S, Porte F, Ramuz M, Liautard JP (2003) What is the nature of the replicative niche of a stealthy bug named *Brucella*? *Trends Microbiol* 11:215-219.
139. Kolman S, Maayan MC, Gotesman G, Rozenzajn LA, Wolach B, Lang R (1991) Comparison of the BACTEC and lysis concentration methods for recovery of *Brucella* species from clinical specimens. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 10: 647-648.
140. Lang R, Dagan R, Potasman I, et al (1992) Failure of ceftriaxone in the treatment of acute brucellosis. *Clin Infect Dis* 14: 506-509.
141. Leal-Klevezas DS, Lopez- Merino A, Martinez-Soriano JP (1995). Molecular detection of *Brucella spp.*: rapid identification of *B. abortus* biovar 1 using PCR. *Archives Med Res* 3: 263-267.
142. Lecaroz C, Blanco-Prieto MJ, Burrell MA, Gamazo C (2006) Intracellular killing of *Brucella melitensis* in human macrophages with microsphere-encapsulated gentamicin. *J Antimicrob Chemother* 58: 549-556.
143. Lindquist D, Chu MC, Probert WS (2007) *Francisella* and *Brucella*. In *Manual of Clinical Microbiology*. Eds, PR Murray, EJO Baron, JH Jorgensen, MA Pfaller, ML Landry. Ninth ed. Washington, D.C. American Society for Microbiology, pp 815-834.
144. Lopez-Goni I, Garcia-Yoldi D, Marin M, De Miguel MJ, Munoz PM, Blasso JM, Jacques I, Grayon M, Cloeckert A, Ferreira AC, Cardoso R,

- De Sa Correa MI, Walravens K, Albert D, Garin-Bastuji B (2008) Evaluation of a multiplex PCR assay (Bruce-ladder) for molecular typing of all *Brucella* species, including the vaccine strains. J Clin Microbiol 46: 3484-3487.
145. Lopez-Merino A, Contreras-Rodriguez A, Migranas-Ortiz R, et al (2004) Susceptibility of Mexican *brucella* isolates to moxifloxacin, ciprofloxacin and other antimicrobials used in the treatment of human brucellosis. Scand J Infect Dis 36: 636-638.
146. Lucero NE, Bolpe JE (1998) Buffered plate antigen test as a screening test for diagnosis of human brucellosis. J Clin Microbiol 36:1425-1427.
147. Luk JMC, Kongmaung U, Tsang RW, Lindberg AA (1997) Enzyme-linked immunosorbent assay to detect PCR products of the *rfbS* gene from serogroup D salmonellae: a rapid screening prototype. J Clin Microbiol 35: 714-718.
148. Lulu AR, Araj GF, Khateeb ML (1988) Human brucellosis in Kuwait : a prospective study of 400 cases. Q J Med 66: 39-54.
149. Lynch M, Kuramitsu H (2000) Expression and role of superoxide dismutases (SOD) in pathogenic bacteria. Microbes Infect 2: 1245-1255.
150. Maas KS, Mendez M, Zavaleta M, et al (2007) Evaluation of brucellosis by PCR and persistence after treatment in patients returning to the hospital for follow-up. Am J Trop Med Hyg 76: 698-702.
151. Magee JT (1980) An enzyme-labeled immunosorbent assay for *Brucella abortus* antibodies. J Med Microbiol 13: 167-172.
152. Malawista SE, Barthold SW, Persing DE (1994) Fate of *Borrelia burgdorferi* DNA in tissues of infected mice after antibiotic treatment. J Infect Dis 170: 1312-1316.
153. Manterola L, Moriyon I, Moreno E, Sola-Landa A, Weiss DS, Koch MHJ, Howe J, Brandenburg K, Lopez-Goni I (2005) The lipopolysaccharide of *Brucella abortus* BvrS/BvrR mutants contains lipid modifications and has higher affinity for bactericidal cationic peptides. J Bacteriol 187:531-5639.
154. Mantur BG, Akki AS, Mangalgi SS, et al (2004) Childhood brucellosis-a microbiological, epidemiological and clinical study. J Trop Pediatr 53: 153-157.

155. Mantur BG, Mangalgi SS (2004) Evaluation of conventional Castaneda and lysis centrifugation culture techniques for diagnosis of human brucellosis. *J Clin Microbiol* 42: 4327-4328.
156. Mantur BG, Biradar MS, Bidri RC, Mulimani MS, Veerappa, Kariholu P et al. (2006) Protean clinical manifestations and diagnostic challenges of human brucellosis in adults: 16 year' experience in an endemic area. *J Med Microbiol* 55: 897-903.
157. Mantur BG, Amarnath SK, Shinde RS (2007) Review of clinical and laboratory features of human brucellosis. *Indian Jurnal of Medical Microbiology* 25(3): 188-202.
158. Marianelli C, Ciuchini F, Tarantino M, Pasquali P, Adone R (2004) Genetic bases of the rifampin resistance phenotype in *Brucella* spp. *J Clin Microbiol* 42: 5439-5443.
159. Martin Roop II R, Gaines JM, Anderson ES, Caswell CC, Martin DW (2009) Survival of the fittest: how *Brucella* strains adapt to their intracellular niche in the host. *Med Microbiol Immunol* 198: 221-338.
160. Martinez-Navarro A, Navarro E, Castano MJ, Solera J (2008) Rapid diagnosis of human brucellosis by quantitative real-time PCR: a case report of brucellar spondylitis. *J Clin Microbiol* 46: 385-387.
161. Matar GM, Khneisser IA, Abdelnoor AM (1996) Rapid laboratory confermation of human brucellosis by PCR analysis of a target sequence on the 31-kilodalton *Brucella* antigen DNA. *J Clin Microbiol* 34: 477-478.
162. Matsiota-Bernard P, Wasser S, Vrioni G (2000) Detection of *Legionella pneumophila* DNA in urine and serum samples from patients with pneumonia. *Clin Microbiol Infect* 6: 223-225.
163. Mayer-Scholl A, Draeger A, Gollner C, Scholz HC, Nockler K (2010) Advancement of a multiplex PCR for the differantion of all currently described *Brucella* species. *J Microbiol Methods* 80: 112-114.
164. Mayfield JE, Bricker BJ, Godfrey H, Crosby RM, Knight DJ, Halling SM, Ballinsky D, Tabatabai LB (1988) The cloning and nucleotide sequence of a gene coding for an immunogenic *Brucella abortus* protein. *Gene* 63: 1-9.
165. McDonald WL, Jamaludin R, Mackereth G, Hansen M, Humphrey S, Short P, et al (2006) Characterization of a *Brucella* sp. strain as a marine-

- mammal type despite isolation from a patient with spinal osteomyelitis in New Zealand. *J Clin Microbiol* 44: 4363-4370.
166. McLean DR, Russell N, Khan Y (1992) Neurobrucellosis. Clinical and therapeutic features. *Clin Infect Dis* 15: 582-590.
 167. Meltzer E, Sidi Y, Smolen G, Banai M, Bardenstein S, Schwartz E (2010) Sexually transmitted brucellosis in humans. *Clin Infect Dis* 51: 12-15.
 168. Memish ZA, Mah MW, Al-Mahmood SA, et al. (2000) *Brucella* bacteraemia : clinical and laboratory observations in 160 patients. *J Infect* 2000 40:59-63.
 169. Memish ZA, Balkhy HH (2004) Brucellosis and international travel. *J Travel Med* 11: 49-55.
 170. Mernich ZA, Balkhy HH (2004) Brucellosis and international travel. *J Travel Med* 11:49-55.
 171. Michaux S, Paillison J, Carles-Nurit MJ, Bourg G, Allardet-Servent A and Ramuz M (1993) Presence of two independent chromosomes in the *Brucella melitensis* genome. *J Bacteriol* 175: 701-705.
 172. Miller WG, Adams LG, Ficht TA, Cheville NF, Payeur JP, Harley DR, House C and Ridgay SH (1999) *Brucella*-induced abortions and infection in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). *J Zoo Wildl Med* 30: 100-110.
 173. Ministry of health (2000) Report of communicable diseases, October 1998-October 2000. National Epidemiological Surveillance Center, Athens, Greece.
 174. Mitka S, Anetakis C, Souliou E, Diza E, Kansouzidou A (2007) Evaluation of different PCR assays for early detection of acute and relapsing brucellosis in humans in comparison with conventional methods. *J Clin Microbiol* 45: 1211-1218.
 175. Mizanbayeva S, Smits HL, Zhalilova K, Abdoel TH, Kozakov S, Ospanov KS, et al (2009) The evaluation of a user-friendly lateral flow assay for the serodiagnosis of human brucellosis in Kazakhstan. *Diagn Microbiol Infect Dis* 65: 14-20.
 176. Morata P, Queipo-Ortuno MI, Colmenero JD (1998) Strategy for optimizing DNA amplification in a peripheral blood PCR assay used for diagnosis of human brucellosis. *J Clin Microbiol* 36: 2443-2446.

177. Morata P, Queipo-Ortuno MI, Reguera JM, Garcia-Ordonez MA, Pichardo C, Colmenero JD (1999) Posttreatment follow-up of brucellosis by PCR assay. *J Clin Microbiol* 37: 4163-4166.
178. Morata P, Queipo-Ortuno MI, Reguera JM, Miralles F, Lopez-Gonzalez JJ, Colmenero JD (2001) Diagnostic yield of a PCR assay in focal complications of brucellosis. *J Clin Microbiol* 39: 3743-3746.
179. Morata P, Queipo-Ortuno MI, Reguera JM, Garcia-Ordonez MA, Cardenas A, Colmenero JD (2003) Development and evaluation of a PCR-enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of human brucellosis. *J Clin Microbiol* 41: 144-148.
180. Moreno E, Stackebrandt E, Dorsch M, et al. (1990) *Brucella abortus* 16S rRNA and lipid A reveal a phylogenetic relationship with members of the alpha-2 subdivision of the class Proteobact. *J Bacteriol* 172:3569-3576.
181. Moreno S, Ariza J, Espinosa FJ, et al (1998) Brucellosis in patients infected with the human immunodeficiency virus. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 17 :319-326.
182. Moreno E, Moriyon I (2002) *Brucella melitensis*: a nasty bug with hidden credentials for virulence. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:1-3.
183. Moreno E, Cloeckert A, Moriyon I (2002) *Brucella* evolution and taxonomy. *Vet Microbiol* 90: 209-27.
184. Murdoch DR, Walford EJ, Jennings LC, Light GJ, Schousboe MI, Cheresky AY, Chambers ST, Ian Town G (1996) Use of the polymerase chain reaction to detect *Legionella* DNA in urine and serum samples from patients with pneumonia. *Clin Infect Dis* 23: 475-480.
185. Namiduru M, Gungor K, Dikensoy O, et al (2003) Epidemiological, clinical and laboratory features of brucellosis: a prospective evaluation of 120 adult patients. *Int J Clin Pract* 57:20-24.
186. Navarro E, Fernandez JA, Escribano J, Solera J (1997) PCR assay for diagnosis of human brucellosis. *J Clin Microbiol* 37: 1654-1655.
187. Navarro E, Escribano J, Fernandez JA, Solera J (2002) Comparison of three different PCR methods for detection of *Brucella* spp. in human blood samples. *FEMS Immunol Med Microbiol* 34: 147-151.
188. Navarro E, Casao MA, Solera J (2004) Diagnosis of human brucellosis using PCR. *Expert Rev Mol Diagn* 4:115-123.

189. Navarro E, Segura JC, Castano MJ, Solera J (2006) Use of real-time quantitative polymerase chain reaction to monitor the evolution of *Brucella melitensis* DNA load during therapy and post-therapy follow-up in patients with brucellosis. Clin Infect Dis 42: 1266-1273.
190. Navarro-Martinez A, Solera J, Corredoira J, Beato JL, Martinez- Alfaro E, Atienzar M, et al (2001) Epididymoorchitis due to *Brucella melitensis* : A retrospective study of 59 patients. Clin Infect Dis 33: 2017-22.
191. Newton JW, Marr AG, Wilson JB (1954) Fixation of C¹⁴ O₂ with nucleic acid constituents by *Brucella abortus*. J Bacteriol 67: 233-6.
192. Nielsen K, Yu WL (2010) Serological diagnosis of brucellosis. Prilozi 31:65-89.
193. Nocton JJ, Dressler F, Rutlege BJ, Rys RN, Persing DE, Steere AC (1994) Detection of *Borrelia burgdorferi* DNA by polymerase chain reaction in synovial fluid from patients with Lyme arthritis. N Engl J Med 330: 229-234.
194. Noviello S, Gallo R, Kelley M, Limberger R, DeAngelis K, Cain L, Wallace B, Dumas N (2004) Laboratory-acquired brucellosis. Emerg Infect Dis 10: 1848-1850.
195. O'Callaghan D and MacMillan A (2002) *Brucella*. In Molecular Medical Microbiology. Ed, M Sussman. First ed. pp1991-2010.
196. Orduna A, Almarza A, Prado A, Gutierrez MP, Garcia-Pascual A, Duenas A, et al (2000) Evaluation of an immunocapture-agglutination test (Brucellacapt) for serodiagnosis of human brucellosis. J Clin Microbiol 11: 4000-4005.
197. Osoba AO, Balkhy H, Memish Z, et al (2001) Diagnostic value of *Brucella* IgG and IgM in bacteremic and non-bacteremic patients with brucellosis. J Chemotherapy 13: 54-59.
198. Ottones F, Dornand J, Napoeni A, Liautard JP, Favero J (2000) Vγ9Vδ2 T cells impair intracellular multiplication of *Brucella suis* in autologous monocytes through soluble factor release and contact-dependent cytotoxic effect. J Immunol 165:7133-7139.
199. Palanduz A, Palanduz S, Guler N (2000) Brucellosis in a mother and her young infant : probable transmission by breast milk. Int J Infect Dis 4: 55-56.

200. Pappas G, Seitaridis S, Akritidis N, Tsianos E (2004) Treatment of brucella spondylitis: lessons from an impossible meta-analysis and initial report of efficacy of a fluoroquinolone-containing regimen. *Int J Antimicrob Agents* 24: 502-507.
201. Pappas G, Akritidis N, Bosilkovski M, Tsianos E (2005a) Brucellosis. *N Engl J Med* 352: 2325-2336.
202. Pappas G, Akritidis N, Tsianos E (2005b) Effective treatments in the management of brucellosis. *Expert Opin Pharmacother* 6: 201-209.
203. Pappas G, Panagopoulou P, Christou L, Akritidis N (2006b) *Brucella* as a biological weapon. *Cell Mol Life Sci* 63 : 2229-2236.
204. Pappas G, Papadhmhtriu P, Akritidis N, Christou L, Tsianos EV (2006a) The new global map of human brucellosis. *The Lancet Infect Dis* 6:91-99.
205. Pappas G, Papadimitriou P (2007) Challenges in *Brucella* bacteraemia. *International Journal of Antimicrobial Agents* 30S: S29-S31.
206. Paulsen I, Seshardi R, Nelson KE, Eisen JA, Heidelberg JF and Read TD et al. (2002) The *Brucella suis* genome reveals fundamental similarities between animal and plant pathogens and symbionts. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 99:13148-13153.
207. Pei J, Ficht TA (2004) *Brucella abortus* rough mutants are cytopathic for macrophages in culture. *Infect Immun* 72:5248-5254.
208. Perkins SD, Smither SJ, Atkins HS (2010) Towards a *Brucella* vaccine for humans. *FEMS Microbiol Rev* 34: 379-394.
209. Porte F, Liautard JP (2003) Role of the *Brucella suis* lipopolysaccharide O antigen in phagosomal genesis and in inhibition of phagosome-lysosome fusion in murine macrophages. *Infect Immun* 71:1481-1490.
210. Queipo-Ortuno MI, Morata P, Ocon P, Manchado P, Colmenero JD (1997) Rapid diagnosis of human brucellosis by peripheral-blood PCR assay. *J Clin Microbiol* 35: 2927-2930.
211. Queipo-Ortuno MI, Colmenero JD, Baeza G, Morata P (2005a) Comparison between Lightcycler real time polymerase chain reaction (PCR) assay with serum and PCR-Enzyme linked immunosorbent assay with whole blood samples for the diagnosis of human brucellosis. *Clin Infect Dis* 40:260-264.

212. Queipo-Ortuno MI, Colmenero JD, Reguera JM, Garcia-Ordonez MA, Pachon ME, Gonzalez M, Morata P (2005b) Rapid diagnosis of human brucellosis by SYBR Green I-based real-time PCR assay and melting curve analysis in serum samples. *Clin Microbiol Infect* 11: 713-718.
213. Queipo-Ortuno MI, Colmenero JD, Bravo MJ, Garcia-Ordonez MA, Morata P (2008) Usefulness of a quantitative real-time PCR assay using serum samples to discriminate between inactive, serologically positive and active human brucellosis. *Clin Microbiol Infect* 14: 1128-1134.
214. Raab I, Rand K, Gaskins D (1990) Buffered charcoal yeast extract medium for the isolation of *brucellae*. *J Clin Microbiol* 28:1671-1672.
215. Rees RK, Graves M, Caton N, Ely JM, Probert WS (2009) Single tube identification and strain typing of *Brucella melitensis* by multiplex PCR. *J Microbiol Methods* 78: 66-70.
216. Refai M (2002) Incidence and control of brucellosis in the Near East region. *Vet Microbiol* 90: 81-110.
217. Regeura JM, Alarcon A, Miralles F, Pachon J, Juarez C, Colmenero JD (2003) *Brucella* endocarditis : clinical, diagnostic and therapeutic approach. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 22 : 647-50.
218. Rhyan JC, Gidlewski T, Ewalt DR, et al (2001) Seroconversion and abortion in cattle experimentally infected with *Brucella* sp. Isolated from a Pacific harbor seal (*Phoca vitulina richardsi*). *J Vet Diagn Invest* 13: 379-382.
219. Rigby CE, Fraser ADE (1989) Plasmid transfer and plasmid-mediated genetic exchange in *Brucella abortus*. *Can J Vet Res* 53: 326-330.
220. Robichaud S, Libman M, Behr M, Rubin E (2004) Prevention of laboratory acquired brucellosis. *Clin Infect Dis* 38: 119-122.
221. Romero C, Gamaso C, Pardo M, Lopez-Goni I (1995) Specific detection of *Brucella* DNA by PCR. *J Clin Microbiol* 3: 615-617.
222. Romero C, Pardo M, Grillo MJ, Diaz R, Blasco JM, Lopez-Goni I (1995) Evaluation of PCR and direct enzyme-linked immunosorbent assay on milk samples for diagnosis of brucellosis in dairy cattle. *J Clin Microbiol* 33: 3198-3200.
223. Ross HM, Foster G, Reid RJ, Jahans KL, MacMillan AP (1994) *Brucella* species infection in sea-mammals. *Vet Rec* 134: 359.

224. Ross HM, Janans KL, MacMillan AP, et al.(1996) *Brucella* species infection in North Sea seal and cetacean populations. *Vet Record* 138: 647-648
225. Roushan MR, Amiri MJ, Janmohammadi N, Hadad MS, Javanian M, Baiani M, Bijani A (2010) Comparison of the efficacy of gentamicin for 5 days plus doxycycline for 8 weeks versus streptomycin for 2 weeks plus doxycycline for 45 days in the treatment of human brucellosis: a randomized clinical trial. *J Antimicrob Chemother* 65: 1028-1035.
226. Ruiz J, Lorente I, Perez J, Simarro E, Mantinez-Campos L (1997) Diaunosis of brucellosis by using blood cultures. *J Clin Microbiol* 35: 2417-2418.
227. Sadusk JF, Browne AS, Born JL (1957) Brucelolosis in man, resulting from *Brucella abortus* (strain 19) vaccine. *JAMA* 164: 1325-1328.
228. Samartino LE (2002) Brucellosis in Argentina. *Vet Microbiol* 90: 71-80.
229. Sanchez-Sousa A, Torre C, Campello MG, et al (1990) Serological diagnosis of neurobrucellosis. *J Clin Pathol* 43 : 79-81.
230. Sangari FJ, Garcia-Lobo JM, Aguero J (1994) The *Brucella abortus* vaccine strain B19 carries a deletion in the erythritol catabolic genes. *FEMS Microbiol Lett* 121:337-42.
231. Sari R, Buyukberber N, Sevinc A, et al (2002) Brucellosis in the etiology of febrile neutropenia: case report. *J Chemother* 14: 88-91.
232. Sasmazel A, Baysal A, Fedaker A, Bugra O, Ozkokeli M, Büyükbayrak F, Keleş C, Goçer S, Sunar H, Zeybek R (2010) Treatment of *Brucella* endocarditis : 15 years of clinical and surgical experience, *AnnThorac Surg* 89(5): 1432-6.
233. Schlabritz-Loutsevitch NE, Whatmore AM, Quance CR et al (2009) A novel *Brucella* isolate in association with two cases of stillbirth in non-human primates-first report .*J Med Primatol* 38: 70-73.
234. Scholz HC, Hubalec Z, Sedlacek I, Vergnaud G, Tomaso H, Al Dahook S, Melzer F, Kampf P, Neubauer H, Cloeckert A, Maquart M, Zygmunt MS, Whatmore AM, Falsen E, Bahn P, Golliner C, Pfeffer M, Huber B, Busse HJ, Nockler K (2008) *Brucella microti* sp. nov., isolated from the common vole *Microtus arvalis*. *Int J Syst Evol Microbiol* 58: 375-382.

235. Scholz HC, Nockler K, Gollner C, Bahn P, Vergnaud G, Tomaso H et al. (2010) *Brucella inopinata* sp. nov. isolated from a breast implant infection. *Int J Syst Evol Microbiol* 60 : 801-808.
236. Simmons GC, Hall WTK (1953) Epididymitis of rams. Preliminary studies on the occurrence and pathogenesis of a *Brucella*-like organism. *Aust Vet J* 29: 33-40.
237. Sohn AH, Probert WS, Glaser CA, Gupta N, Bollen AW, Wong JD, Grace EM, McDonald WC (2003) Human neurobrucellosis with intracerebral granuloma caused by a marine mammal *Brucella* spp. *Emerg Infect Dis* 9: 485-488.
238. Solera J, Espinoza A, Martinez-Allfaro E, et al (1997a) Treatment of human brucellosis with doxykykline and gentamicin. *Antimicrob Agents Chemother* 41: 80-94.
239. Solera J, Martinez-Alfaro E, Espinoza A (1997b) Recognition and optimum treatment of brucellosis. *Drugs* 53: 245-256.
240. Solera J, Martinez-Alfaro E, Espinosa A, Castillejos ML, Geijo P, Rondriguez-Zapata M (1998) Multivariate model for predicting relapse in human brucellosis. *J Infect* 36: 85-92.
241. Solera J, Lozano E, Martinez-Alfaro E, Epinosa A, Castillejos ML, Abad L (1999) Brucelar spondylitis: review of 35 cases and literature survey. *Clin Infect Dis* 29: 1440-9.
242. Solera J, Beato JL, Martinez-Allfaro E, Segura JC, de Tomas E (2001) Azithromycin and gentamicin therapy for the treatment of humans with brucellosis. *Clin Infect Dis* 32: 506-509.
243. Solomon HM, Jaackson D (1992) Rapid diagnosis of *Brucella melitensis* in blood; some operational characteristics of the BACT/ALERT. *J Clin Microbiol* 30: 222-224.
244. Sperry JF, Robertson DC (1975) Erythritol catabolism by *Brucella abortus*. *J Bacteriol* 121(2): 619-630.
245. Starr T, Ng TW, Wehrly TD, Knodler LA, Celli J (2008) *Brucella* intracellular replication requires trafficking through the late endosomal/lysosomal compartment. *Traffick* 9:678-694.

246. Straubinger RK (200) PCR-based quantification of *Borrelia burgdorferi* organisms in canine tissues over a 500-day postinfection period. J Clin Microbiol 38: 2191-2199.
247. Surucuoglu S, El S, Ural S, Gazi H, Kurutape S, Taskiran P, Yurtsever SG (2009) Evaluation of real-time PCR method for rapid diagnosis of brucellosis with different clinical manifestations. Pol J Microbiol 58: 15-19.
248. Swann AL, Garby CL et al. (1981) Safety aspects in preparing suspensions of field strains of *Brucella abortus* for serological identification. Vet Rec 109: 254-5.
249. Tenover FC (2007) Rapid detection and identification of bacterial pathogens using novel molecular technologies: infection control and beyond. Clin Infect Dis 44: 418-423.
250. Thomson BT, JR (2007) Specimen Collection, Transport and Processing: Bacteriology. In *Manual of Clinical Microbiology*. Eds, PR Murray, EJO Baron, JH Jorgensen, MA Pfaller, ML Landry. Ninth ed. Washington, D.C. American Society for Microbiology, pp 291-333.
251. Tikare NV, Mantur BG, Bidari LH (2008) *Brucella* meningitis in an infant - evidence for human breast milk transmission. J Trop Pediatr 54: 272-274.
252. Tiller RV, Gee JE, Lonsway DR, Gribble S, Bell SC, Jennison AV et al. (2010) Identification of an unusual *Brucella* strain (BO2) from a lung biopsy in a 52-years old patient with chronic destructive pneumonia. BMC Microbiol 10 : 23.
253. Tolomeo M, Di Carlo P, Abbadessa V, et al (2003) Monocyte and lymphocyte apoptosis resistance in acute and chronic brucellosis and its possible implications in clinical management. Clin Infect Dis 36: 1533-1538.
254. Trujillo TJ, Zavala AN, Caseres JG, Miranda CQ (1994) Brucellosis. Infect Dis Clin North Am 8: 225-41.
255. Turkmani A, Ioannidis A, Christidou A, Psaroulaki A, Loukaides F, Tselentis Y (2006) In vitro susceptibilities of *Brucella melitensis* isolates to eleven antibiotics. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials 5:24.

256. Valdezate S, Navarro A, Medina-Pascual MJ, Carrasco G, Saez-Nieto JA (2010) Molecular screening for rifampicin and fluoroquinolone resistance in a clinical population of *Brucella melitensis*. *J Antimicrob Chemother* 65: 51-53.
257. Vandercam B, Zech F, deCooman S, et al. (1990) Isolation of *Brucella melitensis* from human sperm. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 9:303-304.
258. Verger JM, Grimont PAD, Crayon M (1985) *Brucella*, a monospecific genus as shown by deoxyribonucleic acid hybridization. *Int J Syst Bacteriol* 35: 292-295.
259. Verger JM, Crayon M et al. (1993) Conjugative transfer and in vitro/in vivo stability of the broad host range . Inc P R751 plasmid in *Brucella* spp. *Plasmid* 29:142-146.
260. Vizcaino N, Cloeckart A, Verger JM, Grayon M, Fernandez-Lago L (2000) DNA polymorphism in the genus *Brucella*. *Microb Infect* 2 :1089-1100.
261. Vorou R, Golfopoulou K, Dougas G, Mellou K, Pierroutsakos I, Papadimitriou T (2008) Local brucellosis outbreak on Thassos, Greece : a preliminary report. *Eurosurveillance* 13
262. Vrioni G, Gartzonika C, Kostoula A, Boboyianni C, Papadopoulou C, Levidiotou S. Application of a polymerase chain reaction enzyme immunoassay in peripheral whole blood and serum specimens for diagnosis of acute human bucellosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 23: 194-199.
263. Walker J, Sharma OP, Rao NA (1992) Brucellosis and uveitis. *Am J Ophthalmol* 114: 374-375.
264. Watarai M, Kim S, Endenebaatar J, Makino S, Horiuchi M, Shirahata T, Sakagushi S, Katamine S (2003) Celluar prion proteins promotes *Brucella* infection into macrophages. *J Exp Med* 198:5-17.
265. Whatmore AM, Murphy TJ, Shankster S, Young E, Cutler SJ, Macmillan AP (2005) Use of amplified fragment length polymorphism to identify and type *Brucella* isolates of medical and veterinary interest. *J Clin Microbiol* 43: 761-769.
266. Wright AE, and Smith F (1897) On the application of the serum test to the differential diagnosis of typhoid and Malta Fever. *Lancet* 1:656.

267. Yagupsky P, Peled N, Press J, Abramson O, Abu-Rashid M (1997) Comparison of BACTEC 9240 Peds Plus medium and Isolator 1.5 microbial tube for detection of *Brucella melitensis* from blood cultures. J Clin Microbiol 35: 1382-1384.
268. Yagupsky P, Peled N, Riesenberk K, Banai M (2000) Exposure of hospital personnel to *Brucella melitensis* and occurrence of laboratory-acquired disease in an endemic area. Scand J Infect Dis 32: 31-35.
269. Yanagi M and Yamasato K (1993) Phylogenetic analysis of the family Rhizobiaceae and related bacteria by sequencing of 16S rRNA gene using PCR and DNA sequencer. FEMS Microbiol Lett 107: 115-120.
270. Young EJ (1983) Human brucellosis. Rev Infect Dis 5: 821-842.
271. Young EJ, Borchert M, Kretzer FL, Musher DM (1985) Phagocytosis and killing of *Brucella* by human polymorphonuclear leukocytes. J Infect Dis 151:682-690.
272. Young EJ (1991) Serologic diagnosis of human brucellosis : analysis of 214 cases by agglutination tests and review of the literature. Rev Infect Dis 13: 359-372.
273. Young EJ (1995) An overview of human brucellosis. Clin Infect Dis 21: 283-289.
274. Young D, Hussell T, Dougan D (2002) Chronic bacterial infections: living with unwanted guests. Nat Immunol 3: 1026-1032.
275. Young EJ (2005) *Brucella* species. In *Principles and practice of infectious diseases*. Eds, GL Mandell, JE Bennett, R Dolin. Sixth ed. Churchill Livingstone, pp 2669-2674.
276. Zambardi G, Druetta A, Roure C, Fouque B, Girardo P, Chypre C, Marchand J, Frency J, Fleurette J (1995) Rapid diagnosis of Mycobacterium tuberculosis infections by ELISA-like detection polymerase chain reaction products. Mol Cell Probes 9: 91-99.
277. Zerva L, Bourantas K, Mitka S, Kansouzidou A, Legakis NJ (2001) Serum is the preferred clinical specimen for diagnosis of human brucellosis by PCR. J Clin Microbiol 39: 1661-1664.
278. Zervos J, Bostic G (1997) Exposure to *Brucella* in the laboratory. Lancet 349: 651.

279. Λεβειδιώτου-Στεφάνου Σ, Παπαπαρασκευάς Ι (2005) Βρουκέλλες. Στο: Αντωνιάδης Α, Καρτάλη Σ, Λεγάκης ΝΑ, Μανιάτης Α, Τσελέντης Ι, εκδότες. Ιατρική Μικροβιολογία, 3^η έκδοση, Ιατρικές Εκδόσεις «Π.Χ. Πασχαλίδης», σελ. 69-74.