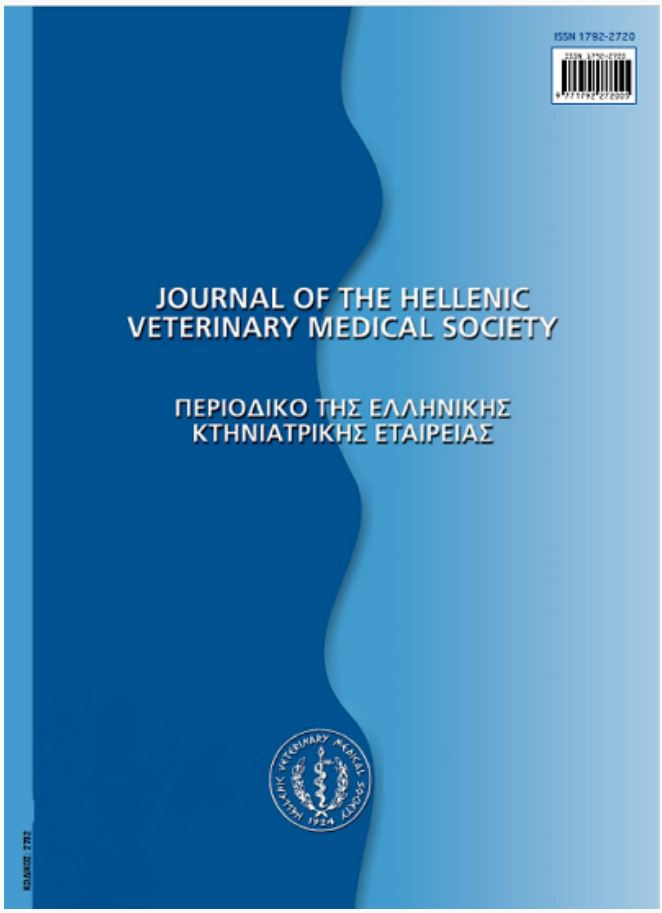
ePublishing

ΕΘΝΙΚΟ ΚΕΝΤΡΟ ΤΕΚΜΗΡΙΩΣΗΣ
NATIONAL DOCUMENTATION CENTRE

Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society

Vol 57, No 3 (2006)



Molecular diagnostic investigation of brucellosis in a caprine organic farm

J. A. IKONOMOPOULOS (Ι.Α. ΟΙΚΟΝΟΜΟΠΟΥΛΟΣ), M. GAZOULI (Μ. ΓΑΖΟΥΛΗ), E. XYLOURI (Ε. ΞΥΛΟΥΡΗ), E. K. GEORGAKILAS (Ε.Κ. ΓΕΩΡΓΑΚΙΛΑΣ), P. KARAGIANNI (Π. ΚΑΡΑΓΙΑΝΝΗ), I. MENEGATOS (Ι. ΜΕΝΑΓΑΤΟΣ)

doi: 10.12681/jhvms.15042

To cite this article:

IKONOMOPOULOS (Ι.Α. ΟΙΚΟΝΟΜΟΠΟΥΛΟΣ) J. A., GAZOULI (Μ. ΓΑΖΟΥΛΗ) M., XYLOURI (Ε. ΞΥΛΟΥΡΗ) E., GEORGAKILAS (Ε.Κ. ΓΕΩΡΓΑΚΙΛΑΣ) E. K., KARAGIANNI (Π. ΚΑΡΑΓΙΑΝΝΗ) P., & MENEGATOS (Ι. ΜΕΝΑΓΑΤΟΣ) I. (2017). Molecular diagnostic investigation of brucellosis in a caprine organic farm. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, *57*(3), 217–222. https://doi.org/10.12681/jhvms.15042

https://epublishing.ekt.gr | **e-Publisher:** EKT | **Downloaded at:** 25/01/2026 22:07:20

ΠΕΡΙΟΔΙΚΟ ΤΗΣ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗΣ ΕΤΑΙΡΕΙΑΣ 2006, 57(3): 217-222
JOURNAL OF THE HELLENIC VETERINARY MEDICAL SOCIETY 2006, 57(3): 217-222

Ενδιαφέρουσα Περίπτωσ
Interesting Case Report

Μοριακή διαγνωστική διερεύνηση βρουκέλλωσης σε βιολογική εκτροφή αιγών

Ι.Α. Οικονομόπουλος, Μ. Γαζούλη, Ε. Ξυλούρη, Ε.Κ. Γεωργακίλας, Π. Καραγιάννη, Ι. Μεναγάτος

ΠΕΡΙΛΗΨΗ. Η βρουκέλλωση των αιγοπροβάτων είναι ένα νόσημα ευρέως διαδεδομένο στις παραμεσόγειες χώρες. Το νόσημα είναι ιδιαίτερα σημαντικό για την προστασία της Δημόσιας Υγείας δεδομένου ότι μεταδίδεται στον άνθρωπο προκαλώντας σοβαρή νόσο. Τον Απρίλιο του 2005 έγινε η διερεύνηση της παρουσίας του νοσήματος ειδικά μεταξύ των αρσενικών ζώων μίας πιστοποιημένης βιολογικής εκτροφής αιγών στο νομό Ηλείας. Τα κοπάδι αριθμούσε 250 θηλυκά και 13 αρσενικά ζώα και παρουσίαζε σποραδικά περιστατικά αποβολών που εκδηλώνονταν συνήθως κατά το τελευταίο τρίτο της κυοφορίας. Τα ζώα κατά τη διάρκεια της δειγματοληψίας ήταν κλινικά υγιή, ενώ δεν ήταν δυνατό βάσει του ιστορικού να προσδιοριστεί με ακρίβεια εάν είχαν παρουσιάσει στο παρελθόν συμπτώματα προσβολής των όρχεων ή της επιδιδυμίδας. Η εργαστηριακή διαγνωστική διερεύνηση για τα συγκεκριμένα ζώα αποφασίστηκε να γίνει με την εφαρμογή της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction - PCR) για την ανίχνευση DNA της *Brucella melitensis* σε δείγματα αίματος. Δύο από τα 13 δείγματα αίματος που συλλέχθηκαν από το κοπάδι αιγών αντέδρασαν θετικά με την PCR επιτρέποντας την ενίσχυση του ειδικού για την *Brucella melitensis* τεμαχίου DNA μεγέθους 844 ζευγών βάσεων. Στην παρούσα μελέτη, η PCR επέτρεψε την ανίχνευση δύο ζώων που αν και κλινικά υγιή ήταν φορείς *Brucella* με μικροβιακό φορτίο αρκετά υψηλό ώστε να γίνει ταυτοποίηση του βακτηρίου με μία μόνο δειγματοληψία αίματος. Το εύρημα αυτό φαίνεται να συμφωνεί με την αντίληψη ότι δεξαμενή της βρουκέλλωσης στην Ελλάδα είναι οι αίγες που νοσούν πιο ελαφρά από τα πρόβατα και συντηρούν τη λοίμωξη για μακρό χρονικό διάστημα. Το ένα από τα θετικά δείγματα που ανιχνεύθηκαν ταυτοποιήθηκε με χαρτογράφηση ως *Brucella suis*, κάτι που αναφέρεται για πρώτη φορά σε σχέση με τις αίγες. Το εύρημα αυτό και η ευπάθεια του ανθρώπου στην *Brucella suis* καθιστούν την έκθεσή του στο συγκεκριμένο παθογόνο μέσω των αιγών έναν επιδημιολογικό παράγοντα που αξίζει πιθανώς να μελετηθεί ενδελεχώς. Η αναγκαιότητα γι' αυτό καταδεικνύεται και από το γεγονός ότι η κατανάλωση αιγοπρόβειων γαλακτοκομικών προϊόντων στην Ελλάδα γίνεται σε ορισμένες περιπτώσεις χωρίς να έχει προηγηθεί ή απαραίτητη θερμική τους επεξεργασία, κάτι που δεν ισχύει για την κατανάλωση χοίρειου κρέατος.

Λέξεις ευρετηρίασης: βρουκέλλωση των αιγών, βρουκέλλωση των μικρών μηρυκαστικών, αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης

Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Ζωικής Παραγωγής, Εργ. Ανατομίας & Φυσιολογίας Αγρ. Ζώων, Ιερά Οδός 75, 118 55, Αθήνα

Ημερομηνία υποβολής: 07.08.2006
Ημερομηνία εγκρίσεως: 05.12.2006

Molecular diagnostic investigation of brucellosis in a caprine organic farm

Ikonomopoulos J.A., Gazouli M., Xylouri E., Georgakilas E.K., Karagianni P., Menegatos I.

ABSTRACT. Brucellosis of sheep and goats is widely spread in the Mediterranean basin. The disease is of considerable significance with connection to Public Health protection since it can be transmitted to humans causing serious disease. In April 2005 we investigated whether brucellosis was present among the male animals of a caprine organic herd in Nomos Hleias, Greece. The herd consisted of 250 female and 13 male animals and had a record of sporadic abortions usually taking place at the final third of gestation. During sample collection all the animals were found clinically healthy, although it was not possible to determine from the records of the farm if there was any previous incidence of orchitis or epididymitis in the animals under study. The laboratory diagnostic investigation consisted of a polymerase chain reaction (PCR) assay applied for the detection of DNA belonging to *Brucella melitensis* in blood samples. Two of the 13 samples that were tested reacted positive by PCR allowing the amplification of the 844 base pair DNA fragment specific for *Brucella melitensis*. In this study, PCR allowed detection of two animals that although they were clinically healthy, they carried enough *Brucella* in their blood to allow microbial identification with only a single blood collection. This finding seems to agree with the concept that goats consist the reservoir of brucellosis in Greece developing milder disease than sheep and sustaining the infection for longer periods of time. One of the positive samples that were recorded was identified by sequencing as *Brucella suis*, something that is reported for the first time with connection to goats. This finding and the sensitivity of man to *B. suis* renders human exposure to this pathogen through goats, an epidemiology factor worth of detailed investigation. This necessity is associated with the fact that as opposed to porcine meat, sheep and goat dairy products in Greece are sometimes consumed without the necessary heat treatment.

Key words: caprine brucellosis, small ruminant brucellosis, polymerase chain reaction

Agricultural University of Athens, Faculty of Animal Science, Department of Anatomy and Physiology, Iera odos 75, 118 55, Athens, Greece

Submission date: 07.08.2006
Approval date: 05.12.2006

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η βρουκέλλωση των αιγοπροβάτων είναι ένα νόσημα ευρέως διαδεδομένο στις παραμεσόγειες χώρες (FAO 1997), (Godfroid and Kasbohrer, 2002) και ιδιαίτερα σημαντικό για τη Δημόσια Υγεία δεδομένου ότι μεταδίδεται στον άνθρωπο προκαλώντας σοβαρή νόσο (Wallach et al., 1997), (Tsolia et al., 2002). Η ανάγκη, όμως, για συνεχή επαγρύπνηση λόγω του κινδύνου μετάδοσης της βρουκέλλωσης από τα ζώα στον άνθρωπο σχετίζεται τα τελευταία χρόνια και με τη διάδοση της βιολογικής μεθόδου εκτροφής αιγοπροβάτων. Αυτή συνιστά πιθανώς ένα νέο παράγοντα στην επιζωοτιολογία του νοσήματος δεδομένου ότι προϋποθέτει μία διαφορετική πρακτική στη χρήση αντιβιοτικών και εμβολίων.

Τον Απρίλιο του 2005 έγινε η διερεύνηση της παρουσίας του νοσήματος ειδικά μεταξύ των αρσενικών ζώων μίας πιστοποιημένης βιολογικής εκτροφής αιγών στο νομό Ηλείας δεδομένου ότι για ζωοτεχνικούς λόγους, το ενδιαφέρον των ιδιοκτητών του κοπαδιού εστιαζόταν σε αυτά. Τα κοπάδι που αποτελείτο από ζώα της εγχώριας φυλής αιγών, αριθμούσε 250 θηλυκά και 13 αρσενικά ζώα και παρουσίαζε σποραδικά περιστατικά αποβολών που εκδηλώνονταν συνήθως κατά το τελευταίο τρίτο της κυοφορίας. Κανένα από τα ζώα της εκτροφής δεν είχε λάβει θεραπεία, ενώ δεν είχε πραγματοποιηθεί ποτέ στο παρελθόν εμβολιασμός του κοπαδιού για την πρόληψη της βρουκέλλωσης. Τα ζώα κατά τη διάρκεια της δειγματοληψίας ήταν κλινικά υγιή, ενώ δεν ήταν δυνατό βάσει του ιστορικού να προσδιοριστεί με ακρίβεια εάν είχαν παρουσιάσει στο παρελθόν συμπτώματα προσβολής των όρχεων ή της επιδιδυμίδας.

Η εργαστηριακή διαγνωστική διερεύνηση για τα συγκεκριμένα ζώα αποφασίστηκε να γίνει με την εφαρμογή της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction - PCR) για την ανίχνευση DNA της *Brucella melitensis* σε δείγματα αίματος.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Συλλογή δειγμάτων

Έγινε λήψη 2 ml ολικού αίματος από τα 13 αρσενικά ζώα της εκτροφής. Το αίμα συγκεντρώθηκε σε ηπαρινισμένα φιαλίδια, τα οποία αποθηκεύθηκαν αμέσως σε φορητά δοχεία ψύξης και συντηρήθηκαν σε θερμοκρασία 2-7°C για χρονικό διάστημα 2-4 ωρών έως την κατάψυξή τους στους –20°C. Τα δείγματα παρέμειναν σε αυτήν τη θερμοκρασία για διάστημα μικρότερο του ενός μηνός και στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν για απομόνωση DNA. Η συλλογή των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε τον Μάιο του 2005.

1. INTRODUCTION

Brucellosis of sheep and goats is widely spread in the Mediterranean basin (FAO 1997), (Godfroid and Kasbohrer, 2002). The disease is of considerable significance with connection to Public Health protection since it can be transmitted to humans causing serious disease (Wallach et al., 1997), (Tsolia et al., 2002). However, the need for constant alertness due to the transmissibility of brucellosis from animals to humans is also associated, at least in the last few years, with the wide application of organic farming of sheep and goats. This may very well represent a new factor in the epidemiology of the disease since it involves a different practice with reference to the use of antibiotics and vaccines.

In April 2005 we investigated whether brucellosis was present specifically among the male animals of a registered organic goat farm in Nomos Hleias, since for zootechnic reasons the interest of the farm owners was restricted to them. The herd consisted of 250 female and 13 male animals of the local goat breed and it had a record of sporadic abortions that occurred in most cases at the final third of gestation. Treatment or vaccination for the prevention of brucellosis had not been applied in the herd. The animals were clinically healthy at the time of sample collection, although it was not possible to determine from the records of the farm if there was any previous incidence of orchitis or epididymitis.

Decision was taken to apply the polymerase chain reaction (PCR) for the laboratory diagnostic investigation of brucellosis, in order to investigate the presence of DNA belonging to *Brucella melitensis* in blood samples collected from the animals under study.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1 Sample collection

Two (2) ml of heparinised whole blood samples were collected from the 13 male animals of the herd. The samples were kept in portable refrigerated containers at 2-7°C for 2-4 hours. Subsequently they were stored in a freezer at –20°C, where they remained for less than a month until they were processed for DNA isolation. Sample collection was performed in May 2005.

2.2 DNA isolation

DNA isolation was performed on 300 μl of whole blood using the Qiagen kit (Giagen Mini Blood, Qiagen GmbH, Germany) following the instructions of the manufacturer. Evaluation of the quality of the extracted product with reference to its quantity and integrity was performed with optical density counts and electrophoresis in agarose gels as previously described

Πίνακας 1. Οι συνθήκες και τα χαρακτηριστικά των αντιδράσεων PCR που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση επιλεγμένων περιοχών του κυτοχρώματος c των αιγοπροβάτων (A/A 1) και για την ανίχνευση και ταυτοποίηση DNA της *Brucella melitensis* (A/A 2).

A/A	Σύνθεση των ολιγονουκλεοτιδίων εκκινητών	Θερμοκρασιακές εναλλαγές της PCR*	Μέγεθος προϊόντος
1.	CATCGACCTTCCAGGCCCATCAAACAT TGTTCTACTGGTTGGCCTCCAATTCA	95°C x 30", 53°C x 30", 72°C x 30"	931
2.	GGGAACGTACCATTTGCTA TAACCGCGACCGGGATGT	95°C x 30", 55°C x 60", 72°C x 60"	844

* Η χημική σύσταση των αντιδράσεων ήταν και στις δύο περιπτώσεις η ακόλουθη: 1,5mM MgCl2, 0,25mM dNTPs, 0,2μM από κάθε ολιγονουκλεοτίδιο εκκινητή, 2,5U Taq πολυμεράση, 5μl DNA και νερό ποιότητας υγρής χρωματογραφίας μέχρι τελικού όγκου 50μl. Κάθε αντίδραση PCR περιελάμβανε 35 κύκλους επανάληψης.

Table 1. Primer sequence and PCR conditions of the assays that were used for the amplification of selected nucleotide regions of the sheep and goat cytochrom c (A/A 1) and for the detection and identification of DNA belonging to *Brucella melitensis* (A/A2).

A/A	Sequence of oligonucleotide primers	Temperature profile of PCR*	Size of amplification product
1.	CATCGACCTTCCAGGCCCATCAAACAT TGTTCTACTGGTTGGCCTCCAATTCA	95°C x 30", 53°C x 30", 72°C x 30"	931
2.	GGGAACGTACCATTTGCTA TAACCGCGACCGGGATGT	95°C x 30", 55°C x 60", 72°C x 60"	844

* Concentration of the reaction mixture was in both cases the following: 1,5mM MgCl2, 0,25mM dNTPs, 0,2μM of each of the oligonucleotide primers, 2,5U Taq polymerase, 5μl DNA and HPLC quality water to the volume of 50μl. Each reaction was completed after 35 cycles of amplification.

2.2 Απομόνωση DNA

Η απομόνωση DNA πραγματοποιήθηκε σε 300 μl ολικού αίματος με την τυποποιημένη εμπορική μέθοδο Qiagen (Giagen Mini Blood, Qiagen GmbH, Germany), ακολουθώντας τη διαδικασία που υποδεικνύεται από τον κατασκευαστή. Η εκτίμηση της ποιότητας του παραγόμενου προϊόντος αναφορικά με την ποσότητα, την ποιότητα και την ακεραιότητά του, έγινε με μετρήσεις οπτικής απορρόφησης και ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης, όπως έχει περιγραφεί στο παρελθόν (Ikonomopoulos et al., 2005). Για την εκτίμηση της παρουσίας αναστολέων της PCR, τα διαλύματα DNA που παρασκευάστηκαν χρησιμοποιήθηκαν σε μία αντίδραση PCR που ενισχύει επιλεκτικά μία περιοχή μεγέθους 981 ζευγών βάσεων (ζβ) του κυτοχρώματος c (in house gene) των αιγοπροβάτων (Πίνακας 1). Προϊόντα DNA χαμηλής ποιότητας απορρίφθηκαν και η διαδικασία απομόνωσης επαναλήφθηκε από τα δείγματα αίματος που είχαν αποθηκευθεί στην κατάψυξη. Τα διαλύματα DNA, των οποίων η ποιότητα κρίθηκε ικανοποιητική, χρησιμοποιήθηκαν για ανίχνευση της *Brucella melitensis* με PCR.

(Ikonomopoulos et al., 2005). In order to assess the presence of PCR inhibitors, the DNA preparations were incorporated in a PCR assay amplifying selectively a 981 base pair (bp) fragment of the cytochrom c (in house gene) of sheep and goats (Table 1). Low quality DNA products were discarded and isolation was repeated from the original sample. The DNA preparations of acceptable quality were incorporated to the detection of *Brucella melitensis* by PCR.

2.3 The polymerase chain reaction

Detection and identification of DNA belonging to *Brucella melitensis* was performed using a previously described method (Conchi et al., 1995) after optimization of the reaction conditions (Table 1).

In all cases, PCR was performed on 5 μl of the DNA extracted from whole-blood samples that were processed and evaluated together with positive and negative control samples that consisted of confirmed PCR-positive (blood samples inoculated with cultivated *Brucella melitensis*) and negative (blood samples from healthy animals and humans) DNA preparations. Our

2.3 Αλυσιδωτή αντίδραση της Πολυμεράσης

Η ανίχνευση και η ταυτοποίηση του DNA της *Brucella melitensis* στα δείγματα αίματος που συλλέχθηκαν πραγματοποιήθηκε με μία διαδικασία που αναπτύχθηκε στο παρελθόν (Conchi et al., 1995) μετά από βελτίωση των συνθηκών της αντίδρασης (Πίνακας 1).

Η PCR εφαρμόστηκε σε 5 μl από το DNA που απομονώθηκε από τα δείγματα ολικού αίματος, τα οποία επεξεργάστηκαν και αξιολογήθηκαν μαζί με θετικούς και αρνητικούς μάρτυρες. Γι' αυτόν το σκοπό χρησιμοποιήθηκαν προϊόντα DNA που είχαν απομονωθεί από δείγματα ολικού αίματος που ήταν αντίστοιχα θετικά (ενοφθαλμισμένα με βακτήρια από καλλιέργειες *Brucella*) και αρνητικά (από υγιή ζώα και ανθρώπους) στην PCR, που χρησιμοποιήθηκε εδώ για την ανίχνευση DNA της *Brucella melitensis*. Επιπροσθέτως, ως αρνητικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν και φιαλίδια PCR που περιείχαν μόνο το μίγμα της αντίδρασης και 5 μl νερού, ίδιου με αυτό που χρησιμοποιήθηκε για τη διάλυση των ιζημάτων DNA των δειγμάτων ολικού αίματος.

Τα προϊόντα της αντίδρασης αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 2% και φωτογράφηση σε διάταξη Polaroid με τη χρήση κατάλληλου λογισμικού (Gene Runner) μετά την ανάμιξή τους με βρωμιούχο αιθίδιο σε αναλογία όγκου 5%.

Η ειδικότητα της διαδικασίας ενίσχυσης επαληθεύθηκε με τη χαρτογράφηση των προϊόντων PCR μετά από διαχωρισμό τους με την τυποποιημένη εμπορική διαδικασία Qiaquick PCR Purification kit (Qiagen GmbH, Germany). Η χαρτογράφηση έγινε και στις δύο αλυσίδες DNA με τη χρήση της διαδικασίας Dye terminator cycle sequencing, ABI (Applied Biosystems) και της αυτόματης συσκευής χαρτογράφησης DNA, ABI PRISM® 377. Η νουκλεοτιδική αλληλουχία των προϊόντων ενίσχυσης συγκρίθηκε με τις δημοσιευμένες γενωμικές αλληλουχίες της βάσης δεδομένων GenBank (www.ncbi.nih.gov.GenBank), χρησιμοποιώντας τη μηχανή αναζήτησης BLAST.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Δύο από τα 13 δείγματα αίματος που συλλέχθηκαν από το κοπάδι αιγών αντέδρασαν θετικά με την PCR, επιτρέποντας την ενίσχυση του ειδικού για την *Brucella melitensis* τεμαχίου DNA μεγέθους 844 ζβ. Τα ζώα ήταν ηλικίας 2 και 3 ετών. Μετά τη χαρτογράφηση των δύο προϊόντων ενίσχυσης της PCR, το ένα από τα θετικά δείγματα ταυτοποιήθηκε ως *Brucella melitensis* και το άλλο ως *Brucella suis.*

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα μελέτη, η PCR επέτρεψε την ανίχνευση δύο ζώων, που αν και κλινικώς υγιή, ήταν φο-

negative control samples were further implemented by the addition of PCR tubes containing only the reaction mixture and 5 μl of water, of the same source used for the dilution of the DNA isolated from our test samples.

PCR products were analysed by submerged electrophoresis on a 2% agarose gel and then photographed by a Polaroid computer-integrated system using an appropriate software (Gene Runner) after staining with 5% v:v ethidium bromide.

The specificity of DNA amplification was confirmed by nucleotide sequencing of the PCR products after their isolation using the Qiaquick PCR Purification kit (Qiagen GmbH, Germany). Sequencing was performed on both strands using the Dye terminator cycle sequencing kit supplied by ABI (Applied Biosystems) and an ABI PRISM 377 automated DNA sequencer. The nucleotide sequence of the amplification products was compared with those published in the GenBank (www.ncbi.nih.gov.GenBank) using BLAST Search.

3. RESULTS

Two of the 13 blood samples collected from the goat herd reacted positively by PCR allowing the amplification of the *Brucella melitensis* specific 844 bp DNA fragment. The positive reactors were 2 and 3 years of age. Sequencing allowed identification of the one of the amplification products as *Brucella melitensis* and of the other as *Brucella suis.*

4. DISCUSSION

In the present study, PCR allowed detection of two animals that although they were clinically health, they carried *Brucella* at a concentration high enough to produce a positive result with only a single blood sample. Although the sensitivity of PCR is usually high, the uneven distribution of the bacterium and the fact that in most cases it does not circulate in the blood of carrier animals (Ziller et al., 2002) demonstrate an interesting aspect of the finding mentioned above, since it refers to clinically healthy goats found at a state of bacteraemia. This seems to agree with the concept that goats consist a brucellosis reservoir in Greece, developing a milder disease than sheep and preserving the infection for longer periods of time (Papadopoulos 1992). Our intention to exploit this aspect of brucellosis and obvious practical reasons indicated blood as the type of sample that should be collected since positive reactions would indicate in a conclusive manner, animals with bacteraemia. This was also supported by the fact that serology evaluation of test samples, although interesting, would not be easily interpreted (Reviriego et al., 2000) considering the prevalence of

ρείς *Brucella* με μικροβιακό φορτίο αρκετά υψηλό ώστε να γίνει ταυτοποίηση του βακτηρίου με μία μόνο δειγματοληψία αίματος. Αν και η ευαισθησία της PCR είναι συνήθως υψηλή, η ανομοιόμορφη κατανομή του βακτηρίου και το γεγονός ότι αυτό δεν κυκλοφορεί συνήθως στο αίμα σε ζώα φορείς (Ziller et al., 2002) καταδεικνύει μία ενδιαφέρουσα παράμετρο του παραπάνω ευρήματος δεδομένου ότι αφορά σε ζώα κλινικά υγιή, που βρίσκονται ταυτόχρονα σε φάση βακτηριαιμίας. Το εύρημα αυτό φαίνεται να συμφωνεί με την αντίληψη ότι δεξαμενή της βρουκέλλωσης στην Ελλάδα είναι οι αίγες που νοσούν πιο ελαφρά από τα πρόβατα και συντηρούν τη λοίμωξη για μακρό χρονικό διάστημα (Παπαδόπουλος 1992). Η σκοπιμότητα να εκτιμηθεί αυτή η παράμετρος της βρουκέλλωσης και ευνόητοι πρακτικοί λόγοι υπέδειξαν το αίμα ως το είδος δείγματος που θα ήταν σκόπιμο να συλλεχθεί, δεδομένου ότι το θετικό αποτέλεσμα θα προσδιόριζε με βεβαιότητα ζώα σε κατάσταση βακτηριαιμίας. Άλλωστε ήταν αναμενόμενο ότι η ορολογική εξέταση των δειγμάτων αν και ενδιαφέρουσα, δεν θα ήταν εύκολα αξιολογήσιμη (Reviriego et al., 2000) δεδομένης της διάδοσης του νοσήματος στην περιοχή.

Η ταυτοποίηση ως *Brucella suis* του ενός από τα δύο θετικά αποτελέσματα που καταγράφηκαν σε αυτήν τη μελέτη είναι στο βαθμό που οι συγγραφείς μπορούν να βεβαιώσουν η πρώτη αναφορά προσβολής αίγας από το συγκεκριμένο παθογόνο. Το εύρημα αυτό δεν είναι δυνατό να συνδεθεί γενικά με το βιολογικό σύστημα εκτροφής αιγοπροβάτων δεδομένου ότι κάτι τέτοιο θα προϋπέθετε μίας μεγαλύτερης κλίμακας αλλά και διαφορετικής κατεύθυνσης μελέτη. Αξίζει όμως να αναφερθεί ότι στην περιοχή συνηθίζεται η ανταλλαγή αρσενικών ζώων για αναπαραγωγή με σκοπό την αποφυγή της γενετικής κατάπτωσης του κοπαδιού λόγω αιμομιξίας και η παράλληλη εκτροφή μικρού αριθμού χοίρων που προορίζονται για ιδιοκατανάλωση. Μάλιστα, στη συγκεκριμένη περιοχή εκτρέφεται ο εντόπιος ελληνικός χοίρος με μη συστηματικό τρόπο, με συνέπεια αυτά τα ζώα συχνά να μην παρακολουθούνται από τις αρμόδιες υγειονομικές υπηρεσίες. Στην εκτροφή που μελετήθηκε δεν υπήρχαν χοίροι την εποχή που έγινε η δειγματοληψία, αν και λίγους μήνες πριν εκτρέφονταν μερικά χοιρίδια τα οποία προέρχονταν από παρακείμενη εκτροφή.

Βάσει των παραπάνω δεν είναι εύκολο να γίνει κάποια ασφαλής εκτίμηση ως προς την πηγή μετάδοσης της *Brucella suis* στο συγκεκριμένο ζώο, αν και φαίνεται πιθανό ότι αυτή έγινε με άμεση ή έμμεση επαφή με χοίρους. Είναι όμως ενδιαφέρον το γεγονός ότι το ζώο από το οποίο καταγράφηκε το θετικό αποτέλεσμα βρισκόταν σε κατάσταση βακτηριαιμίας αρκετούς μήνες

the disease in the area.

To the best of our knowledge the identification of *Brucella suis* as the one of the positive samples recorded here, is the first case of a goat infection caused by this pathogen. The present report does not allow association of this finding with the organic farming of sheep and goats, since this would require a study of much greater scale and different orientation. However, it is worth mentioning that the exchange of male animalsto avoid the genetic degradation of the herd caused by incestuous breeding, is customary in the area, as it is the breeding in the same premises of a small number of pigs aimed for consumption by the farmers. The local porcine Greek breed that is commonly used for this purpose in the specific region is often farmed in a non systematic manner that often fails the attention of the local veterinary authorities. At the time of sampling there were no porcine in the farm, but a few months earlier a small number of piglets, that were provided by a nearby establishment, was retained together with the goats.

Obviously it is not easy to make a safe assessment as to the source of *Brucella suis* in the specific animal, although it seems probable that this was the direct or indirect contact with pigs. However it is interesting that several months after the contact of this animal with pigs, it was still at a state of bacteraemia. The evidences available to this day cannot define the significance of this finding with reference to health protection of the herd or to the risk of Public Health. However, this finding and the high genetic similarity (exceeding 98%) of *Brucella melitensis* and *Brucella suis* (Gandara et al., 2001) indicate that the ability of goats to retain infections with the former pathogen for long may not differ much to that with the latter. Regardless this event, the sensitivity of humans to *Brucella suis* (Boschiroli et al., 2005) indicates that his exposure to this pathogen through goats consists an epidemiology factor worth of detailed investigation. The necessity for this is also demonstrated by the fact that as opposed to porcine meat, sheep and goat dairy products in Greece are sometimes consumed without the necessary heat treatment. ❑

μετά την επαφή του με χοίρους. Φυσικά δεν είναι δυνατό με τα στοιχεία που είναι σήμερα διαθέσιμα να προσδιορίσει κανείς με βεβαιότητα τη σημασία του γεγονότος αυτού σε σχέση με την προστασία της υγείας του κοπαδιού, αλλά και της Δημόσιας Υγείας. Το παραπάνω εύρημα και η μεγάλη γενετική συγγένεια (υπερβαίνει το 98%) της *Brucella melitensis* με την *Brucella suis* (Gandara et al., 2001) υποδηλώνουν ότι είναι πιθανό η ικανότητα των αιγών να διατηρούν τη λοίμωξη με *B. melitensis* να μη διαφέρει πολύ και για τη *B. suis.* Ανεξαρτήτως όμως αυτού του ενδεχομένου, η ευπάθεια του ανθρώπου στην *Brucella suis* (Boschiroli et al., 2005) καθιστά την έκθεσή του στο συγκεκριμένο παθογόνο μέσω των αιγών έναν επιδημιολογικό παράγοντα που αξίζει πιθανώς να μελετηθεί ενδελεχώς. Η αναγκαιότητα γι' αυτό καταδεικνύεται και από το γεγονός ότι η κατανάλωση αιγοπρόβειων γαλακτοκομικών προϊόντων στην Ελλάδα γίνεται σε ορισμένες περιπτώσεις χωρίς να έχει προηγηθεί ή απαραίτητη θερμική τους επεξεργασία, κάτι που δεν ισχύει για την κατανάλωση χοίρειου κρέατος. ❑

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ - REFERENCES

Boschiroli ML, Foulogne V, O' Callaghan D (2005). Brucellosis – new aspects of an old disease. J Appl Microbiol 98: 1270-1281.

Romero C, Gamazo C, Pardo M, Lopez-Goni I (1995). Specific detection of *Brucella* DNA by PCR. J Clin Microbiol 33: 615-617.

FAO/OIE/WHO (1997). Animal Health Yearbook, FAO, Animal Production and Health Series, FAO, Rome Italy.

Gandara B, Ahide AL, Rogel MA, Martinez-Romero E (2001). Limited Genetic Diversity of *Brucella* spp. J Clin Microbiol 39: 235–240.

Godfroid J, Kasbohrer A (2002). Brucellosis in the European Union and Norway at the turn of the twenty-first century. Vet Microbiol 90:135-45.

Ikonomopoulos J, Pavlik I, Bartos M, Svastova P, Ayele WY, Roubal P, Loukas J, Cook N, Gazouli M (2005). Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in retail cheeses from Greece and the Czech Republic. Appl Envir Microbiol 71: 8934-8936.

Papadopoulos O (1992). Infectious Diseases of Animals. Publication Service of Aristotelian University of Thessaloniki.

Reviriego FJ, Moreno MA, Dominguez L (2000). Risk factors for brucellosis seroprevalence of sheep and goat flocks in Spain. Prevent Vet Med 44:167-73.

Tsolia M, Drakanaki S, Messaritaki A, Farmakakis T, Kostaki M, Tsapra H, Karpatios T (2002). Clinical features, complications and treatment outcome of childhood brucellosis in central Greece. Jour Infect 44:257-62.

Wallach JC, Samartino LE, Efron A, Baldo PC (1997). Human infection by *Brucella melitensis*: an outbreak attributed to contact with infected goats. FEMS Immunol Med Microbiol 19:315-321.

Ziller M, Selhorst T, Teuffert J, Schluter H (2002). Analysis of sampling strategies to substantiate freedom from disease in large areas. Prevent Vet Med 52:333-343.