Διατμηματικό Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών

των Τμημάτων

Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων

Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής και Υδατοκαλλιεργειών

«Ολοκληρωμένη Διαχείριση Γάλακτος και Γαλακτοκομικών Προϊόντων»

Μεταπτυχιακή διατριβή με θέμα

Ανίχνευση του *Mycobacterium tuberculosis* complex σε νωπό αγελαδινό γάλα προέλευσης Δυτικής Αττικής, με τη χρήση της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR).

της Βιργινίας Τ. Φυτανή

Επιβλέπων Καθηγητής

Ι. Οικονομόπουλος

Αθήνα 2019

Διατμηματικό Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών

των Τμημάτων

Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων

Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής και Υδατοκαλλιεργειών

«Ολοκληρωμένη Διαχείριση Γάλακτος και Γαλακτοκομικών Προϊόντων»

Μεταπτυχιακή διατριβή με θέμα

Ανίχνευση του *Mycobacterium tuberculosis* complex σε νωπό αγελαδινό γάλα προέλευσης Δυτικής Αττικής, με τη χρήση της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR).

της Βιργινίας Τ. Φυτανή

Επιβλέπων Καθηγητής

Ι. Οικονομόπουλος

Αθήνα 2019

Μεταπτυχιακή διατριβή με θέμα

Ανίχνευση του *Mycobacterium tuberculosis* complex σε νωπό αγελαδινό γάλα προέλευσης Δυτικής Αττικής, με τη χρήση της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR).

της Βιργινίας Τ. Φυτανή

Επιβλέπων Καθηγητής

Ι. Οικονομόπουλος

<u>Εξεταστική Επιτροπή</u>

Θ. Μασούρας, Αναπληρωτής Καθηγητής

Χ. Μπαλάσκας, Επίκουρος Καθηγητής

Ι. Οικονομόπουλος, Αναπληρωτής Καθηγητής

Περίληψη

Η ζωονοτική φυματίωση σχετίζεται κυρίως με την κατανάλωση γαλακτοκομικών προϊόντων βόειας προέλευσης, και ο έλεγχός της έχει προτεραιοποιηθεί από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Τροφίμων και Γεωργίας λόγω της σημασίας της στη δημόσια υγεία. Σε αυτό το πλαίσιο, σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση της δυνατότητας χρήσης της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης ως πρώιμου διαγνωστικού δείκτη λοίμωξης από το Mycobacterium bovis, σε γαλακτοπαραγωγικές εκτροφές βοοειδών. Δείγματα γάλακτος (n=78) συλλέχθηκαν από ζώα ηλικίας άνω των 8 ετών από 4 γαλακτοπαραγωγικές εκτροφές βοοειδών που δραστηριοποιούνται σε μία επιλεγμένη περιοχή της Ελλάδας, στην οποία ο επιπολασμός της φυματίωσης των βοοειδών είναι υψηλός. Πριν την ανάλυσή τους, τα δείγματα αυτά αναμίχθηκαν ανά 2 ή και ανά 3, στην περίπτωση που ο συνολικός αριθμός αυτών που συλλέχθηκαν από μία εκτροφή ήταν μονός. Η ανίχνευση DNA βραδέως αναπτυσσόμενων ειδών του γένους Mycobacterium έγινε με δύο μεθόδους PCR που έχουν σχεδιαστεί για την ενίσχυση επιλεγμένων περιοχών των γονιδίων 16S-rRNA και 65-kDa heat shock protein. Τυχαία επιλεγμένα προϊόντα PCR υποβλήθηκαν σε ανάλυση για τον προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής τους αλληλουχίας με σκοπό την επικύρωση του αποτελέσματος της PCR. Η διαδικασία απομόνωσης DNA και η ανάλυση των δειγμάτων με PCR έγινε σύμφωνα με το πρότυπο ποιότητας ISO-17025. Το συνολικό ποσοστό θετικότητας που καταγράφηκε ήταν 47.7%, και κυμάνθηκε μεταξύ 0% και 76,9.3%. Ζώα θετικά στην PCR ανιχνεύθηκαν και στις δύο εκτροφές οι οποίες κατά την περίοδο διεξαγωγής της μελέτης ήταν θετικές στη δοκιμή του φυματινισμού (TST). Από τις δύο αρνητικές, στη δοκιμή του φυματινισμού, εκτροφές μόνο η μία ήταν αρνητική στην PCR. Η δεύτερη η οποία ήταν TST-αρνητική κατά το χρόνο της μελέτης αλλά έως το 2012 είχε μακροχρόνιο ιστορικό θετικότητας, βρέθηκε θετική με την PCR. Συμπερασματικά μπορεί να υποστηριχθεί ότι η PCR μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως πρώιμος και ευαίσθητος διαγνωστικός δείκτης, για την ανίχνευση μυκοβακτηρίων σε αναμιγμένα δείγματα γάλακτος που έχουν συλλεχθεί από τα γηραιότερα ζώα μίας αγελαδοτροφικής μονάδας γαλακτοπαραγωγικής κατεύθυνσης. Επιπλέον η μέθοδος θα μπορούσε να εφαρμοστεί συμπληρωματικά της TST, ιδίως σε περιοχές ή εκτροφές στις οποίες υπάρχει εμμονή της νόσου με σκοπό την επαλήθευση των αποτελεσμάτων της TST και την εντατικοποίηση των ελέγχων. Η συγκεκριμένη προσέγγιση έχει σημαντικά

πρακτικά πλεονεκτήματα που αντισταθμίζουν την πρόσθετη οικονομική επιβάρυνση που συνεπάγεται η χρήση της PCR.

Λέξεις κλειδιά: *Φυματίωση των βοοειδών, ζωονοτική φυματίωση, έλεγχος της φυματίωσης, δοκιμή και απομάκρυνση, δερματική δοκιμή φυματίνης, αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, δείκτη πρώιμης διάγνωσης.*

Abstract

Zoonotic tuberculosis is mainly associated with the consumption of bovine dairy products, and its' control has been prioritized by the Food and Agriculture Organisation. Within this context, the aim of this study was to assess whether the polymerase chain reaction (PCR) can be used as an early diagnostic indicator of Mycobacterium bovis infection in bovine dairy farms. Milk samples (n=78) were collected from all the animals above 8 years of age, in the 4 bovine dairy farms located in a specific agricultural region of Greece, with high prevalence in bovine tuberculosis. Detection of DNA belonging to slow growing members of the genus Mycobacterium was conducted in pooled samples using two PCR assays targeting 16S-rRNA and 65-kDa heat shock protein. Randomly selected PCR products were submitted to sequence analysis for confirmation of the specificity of the amplification process. DNA isolation and PCR testing were conducted in compliance with ISO17025 accreditation requirements. The overall percentage of positivity was 47.7% and ranged among farms from 0% to 76,9%. PCR-positive animals were detected in both farms that were at the time of investigation positive with the tuberculin skin test (TST), whereas the only farm with a negative TST record tested also negatively with PCR. Interestingly, one farm that was negative with TST since 2012 but had a long prior record of high-level TST-positivity, tested positively with PCR. In conclusion it can be stated that PCR can be used for the detection of mycobacteria in pooled samples of milk collected from the older animals of a dairy farm, as an early and sensitive diagnostic indicator. This can support TST monitoring for the control of bovine tuberculosis, and improve detection of farms, in which routine monitoring should be intensified. The specific approach offers significant practical benefits that compensate for the additional cost of PCR.

Keywords: Bovine tuberculosis; zoonotic tuberculosis; control of tuberculosis; test-and-removal; tuberculin skin test; polymerase chain *reaction; early diagnostic indicator.*

Πίνακας περιεχομένων

1	Εισαγωγή	Σελ. 7
1.1.	Αιτιολογία της φυματίωσης	Σελ. 7
1.2	Ιστορικά στοιχεία για τη φυματίωση των βοοειδών	Σελ. 9
1.3	Παθογένεια της φυματίωσης των βοοειδών	Σελ. 11
1.4	Επιζωοτιολογία	Σελ. 12
1.4.1	Μετάδοση	Σελ. 12
1.4.2	Η διάδοση της νόσου διεθνώς	Σελ. 15
1.4.3	Η διάδοση της νόσου στην Ελλάδα	Σελ. 17
1.5	Κλινική εκδήλωση της Φυματίωσης των Βοοειδών	Σελ. 21
1.6	Σχέση με τη δημόσια υγεία	Σελ. 22
1.7	Μέτρα Πρόληψης - Ελέγχου	Σελ. 24
2	Σκοπός	Σελ. 27
3	Κυρίως μέρος	Σελ. 27
3.1	Υλικά και Μέθοδοι	Σελ. 27
3.1.1	Συλλογή βιολογικού υλικού	Σελ. 27
3.1.2	Απομόνωση DNA	Σελ. 33
3.1.3	Εκτίμηση της ποιότητας DNA	Σελ. 34
3.1.4	PCR	Σελ. 34
3.2	Αποτελέσματα	Σελ. 35
3.3	Συζήτηση	Σελ. 38
	Βιβλιογραφία	Σελ. 42

1. Εισαγωγή

1.1. Αιτιολογία της φυματίωσης

Η φυματίωση των βοοειδών είναι ένα χρόνιο λοιμώδες νόσημα που χαρακτηρίζεται από το σχηματισμό φυματίων σε όλα σχεδόν τα όργανα και τους ιστούς του σώματος και προκαλείται από το βακτήριο *Mycobacterium bovis*.

Τα μυκοβακτήρια ανήκουν στο φύλο *Actinobacteria*, τάξη *Actinomycetales*, οικογένεια *Mycobacteriaceae*, γένος *Mycobacterium*, και είναι αερόβια ή μικροαερόφιλα, μη-κινητά, μη-σπορογόνα βακτήρια με σχήμα κυλινδρικό ή ελαφρά κυρτό, οξεάντοχα, Gram-θετικά με υψηλή περιεκτικότητα σε γουανίνη και κυτοσίνη, και ευρέως διαδεδομένα στη φύση όπου ζουν ως σαπρόφυτα (Wei Yee Wee *et al* 2017).

Τα βακτήρια του γένους *Mycobacterium*, διακρίνονται από όλα σχεδόν τα άλλα γένη βακτηρίων, λόγω της οξεαντοχής τους, αλλά και της εξαιρετικά αργής ανάπτυξής τους *in vitro*.

Ως οξεοαντοχή περιγράφεται η ιδιότητα των μυκοβακτηρίων να κατακρατούν *in vitro* χρωστικές στο τοίχωμά τους, τις οποίες δεν αποβάλλουν όταν υποβληθούν σε επεξεργασία με οξέα. Η συγκεκριμένη ιδιότητα των μυκοβακτηρίων οφείλεται στο παχύ και κηρώδους σύστασης κυτταρικό τους τοίχωμα, το οποίο συμβάλλει επίσης στην επιβίωσή τους εντός των μακροφάγων των ξενιστών που προσβάλλουν.

Όσον αφορά τον ρυθμό ανάπτυξής τους *in vitro*, τα μυκοβακτήρια διακρίνονται σε δύο κατηγορίες, τα ταχέως και τα βραδέως αναπτυσσόμενα. Τα ταχέως αναπτυσσόμενα σχηματίζουν αποικίες σε χρονικό διάστημα 3-7 ημερών, ενώ τα βραδέως αναπτυσσόμενα χρειάζεται να επωαστούν σε κατάλληλα θρεπτικά υποστρώματα, για διάστημα που μπορεί να κυμαίνεται από 7 ημέρες έως και αρκετούς μήνες. Στα ταχέως αναπτυσσόμενα μυκοβακτήρια ανήκουν τα σαπρόφυτα του εδάφους τα οποία δεν είναι παθογόνα (Wei Yee Wee *et al* 2017).

Τα παθογόνα είδη του γένους *Mycobacterium* παρουσιάζουν σχετική ειδικότητα ξενιστή, βάσει της οποίας έχει γίνει η διάκρισή τους στους εξής τύπους (LPSN bacterio.net):

- Στον ανθρώπινο τύπο (*M. tuberculosis*), υποχρεωτικά παθογόνο του ανθρώπου ο οποίος προσβάλλει και πολλά άλλα είδη πρωτευόντων.

- Στον βόειο τύπο (*M. bovis*) που είναι ο πιο κοινός τύπος βακίλου φυματίωσης και προσβάλλει όλα σχεδόν τα θερμόαιμα σπονδυλωτά ζώα, και
- Στον ορνίθιο τύπο (*M. avium – intracellulare*), ο οποίος προσβάλλει κυρίως πτηνά.

Η γενετική ανάλυση των μυκοβακτηρίων επέβαλε σημαντικές αλλαγές στην ταξινόμησή τους. Έτσι σήμερα, τα μυκοβακτήρια κατατάσσονται στις δύο παρακάτω μεγάλες κατηγορίες (LPSN bacterio.net):

- ***Mycobacterium tuberculosis* complex:** Το τυπικό αίτιο της φυματίωσης των θηλαστικών. Στην κατηγορία αυτή περιλαμβάνονται τα είδη *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium canetti*, *Mycobacterium caprae*, *Mycobacterium microti* και *Mycobacterium pinnipedii.*
- ***Mycobacterium avium* complex:** Το τυπικό αίτιο της φυματίωσης των πτηνών στην οποία περιλαμβάνονται τα είδη *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium genovense* και *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis.*

Ανάλογα με την κλινική τους σημασία τα είδη του γένους *Mycobacterium* διακρίνονται σε τρεις ομάδες (Carmen Alicia *et al* 2013):

(1) Τα υποχρεωτικά παθογόνα για τον άνθρωπο και τα ζώα στα οποία περιλαμβάνονται είδη που ανήκουν στο *Mycobacterium tuberculosis* complex όπως το *Mycobacterium tuberculosis, το Mycobacterium bovis, το Mycobacterium africanum,* το *Mycobacterium caprae,* το *Mycobacterium microti,* το *Mycobacterium pinnipedii,* το *Mycobacterium leprae,* το *Mycobacterium canetti* και τα πρόσφατα περιγραφόμενα *Mycobacterium orygis, Mycobacterium mungi* και *Mycobacterium suricattae.*

(2) Τα δυνητικά (ή ευκαιριακά) παθογόνα για τον άνθρωπο και ζώα στα οποία περιλαμβάνονται είδη που ανήκουν στο *Mycobacterium avium complex* όπως *το Mycobacterium avium* υποείδος *avium, Mycobacterium avium paratuberculosis, Mycobacterium avium hominissuis, Mycobacterium avium silvaticum, Mycobacterium colombiense και Mycobacterium indicus pranii, Mycobacterium marinum, Mycobacterium fortuitum, Mycobacterium scrofulaceum, Mycobacterium kansasii, Mycobacterium xenopi.*

3) Τα σαπρόφυτα μυκοβακτήρια στα οποία ανήκουν το *Mycobacterium gordonae,* το *Mycobacterium terrae,* το *Mycobacterium smegmatis* και το *Mycobacterium phlei*.

Τα μυκοβακτήρια της ομάδας αυτής ονομάζονται επίσης άτυπα, «μη φυματιώδη» ή περιβαλλοντικά μυκοβακτήρια.

Μέχρι πρόσφατα η ταυτοποίηση των μυκοβακτηρίων βασιζόταν στα ειδικά καλλιεργητικά τους χαρακτηριστικά, σε βιοχημικές δοκιμές, όπως επίσης και στην ευαισθησία τους σε συγκεκριμένους αντιμικροβιακούς παράγοντες. Με την εξέλιξη της μοριακής βιολογίας η ταυτοποίηση του *Mycobacterium* sp. γίνεται πλέον βάσει συνδυασμού μοριακών και συμβατικών μεθόδων μικροβιολογικής ανάλυσης, τόσο στο επίπεδο είδους, όσο και στο επίπεδο στελέχους.

1.2. Ιστορικά στοιχεία για τη φυματίωση των βοοειδών.

Η φυματίωση μπορεί να θεωρηθεί ως μια αρχαία ασθένεια αφού το υπεύθυνο παθογόνο αίτιο έχει απομονωθεί από σκελετούς που ανακαλύφθηκαν στην Αίγυπτο, την Ινδία και την Κίνα οι οποίοι χρονολογούνται από την εποχή της αρχαιότητας. Ορισμένοι ερευνητές θεωρούν πιθανό ότι ένας πρώιμος πρόγονος του *Mycobacterium tuberculosis* προσέβαλε πριν από περίπου 3 εκατομμύρια χρόνια τον μεγάλο πίθηκο και αργότερα τον πρωτόγονο άνθρωπο στην Ανατολική Αφρική (Margaret Good *et al* 2018).

Με την εξέλιξη της γενετικής και την εφαρμογή μεθόδων ανάλυσης DNA, το προγονικό στέλεχος της φυματίωσης εκτιμάται ότι εμφανίστηκε περίπου 40.000 χρόνια πριν, γεγονός το οποίο συμπίπτει με την περίοδο κατά την οποία ο άνθρωπος ταξίδεψε από την Αφρική στην Ευρώπη και στην Ασία, ενώ περίπου 10.000 έως 20.000 χρόνια αργότερα, το συγκεκριμένο στέλεχος διασπάστηκε σε δύο φυλογενετικούς κλάδους και εξαπλώθηκε παγκοσμίως μέσω του ανθρώπου (Margaret Good *et al* 2018). Το γεγονός αυτό, εξελικτικά, μπορεί να σχετίζεται με την πρώιμη καλλιέργεια και την εξημέρωση των ζώων που χρονολογείται μεταξύ 10.000 με 15.000 χρόνια πριν.

Γενετικές μελέτες των σύγχρονων στελεχών του μυκοβακτηρίου που απομονώθηκαν από τα ζώα και τον άνθρωπο υποδηλώνουν ότι πριν από περίπου 6.000 χρόνια ένα προγονικό στέλεχος του *Mycobacterium tuberculosis*, προσαρμοσμένο στον άνθρωπο, υπέστη μεταβολή σε ορισμένες αλληλουχίες με αποτέλεσμα τη δημιουργία αυτού που σήμερα ονομάζουμε *Mycobacterium tuberculosis* complex *(MTBC),* από το οποίο προήλθε το *Mycobacterium bovis* (Margaret Good, *et al* 2018).

Πρόσφατα, DNA του *Mycobacterium tuberculosis* απομονώθηκε από αλλοιώσεις οστών ανθρώπου ηλικίας 1.400 ετών στην Ευρώπη και στο Βόρνεο. Επίσης πρόσφατα *Mycobacterium tuberculosis* εντοπίστηκε και σε ιστούς περουβιανής μούμιας ηλικίας 1.000 ετών, οπότε κατέστη προφανές ότι η ασθένεια είχε φτάσει στην Αμερική πολύ πριν από τους Ευρωπαίους αποίκους (Margaret Good *et al* 2018).

Μεταξύ του δέκατου όγδοου και του δέκατου ένατου αιώνα το ποσοστό θνησιμότητας από φυματίωση έφτασε σε πολύ υψηλό επίπεδο με τους θανάτους να φτάνουν στους 900 ανά 100.000 κατοίκους. Το γεγονός αποδόθηκε στο χαμηλό βιοτικό επίπεδο και στον συγχρωτισμό του ανθρώπου με τα ζώα (Margaret Good *et al* 2018).

Κατά το χρονικό αυτό διάστημα οι πληθυσμοί της υπαίθρου άρχισαν να μετακινούνται προς τις πόλεις. Εκεί τα ζώα εκτρέφονταν σε περιορισμένο χώρο με ανεπαρκή αερισμό και κακές συνθήκες υγιεινής, γεγονός που προκάλεσε την αύξηση της διάδοσης της φυματίωσης των βοοειδών. Ο συγχρωτισμός των ανθρώπων με τα ζώα αλλά και η κατανάλωση γάλακτος που προέρχονταν από μολυσμένα ζώα, το οποίο τότε καταναλώνονταν νωπό, συνέβαλε σημαντικά στην μετάδοση της νόσου.

Ο επιπολασμός της φυματίωσης στα βοοειδή αυξήθηκε τα επόμενα χρόνια και λόγω της ανάπτυξης της βοοτροφίας.

Κατά τα τέλη του 19ου και τις αρχές του εικοστού αιώνα, κατέστη σαφές ότι η φυματίωση μπορεί να μεταδοθεί μέσω της τροφής και ιδιαίτερα μέσω του γάλακτος. Μέχρι το 1914, οι επιστήμονες συμφώνησαν ότι τα περισσότερα κρούσματα φυματίωσης στους ανθρώπους, με εντοπισμό της νόσου στο πεπτικό σύστημα και στους επιχώριους λεμφαδένες οφείλονταν στο *Mycobacterium bovis* και είχαν προκληθεί από κατανάλωση γάλακτος που προέρχονταν από μολυσμένα βοοειδή. Εκτιμάται επίσης ότι το *Mycobacterium bovis* είναι υπεύθυνο για περίπου 15.000 θανάτους στις ΗΠΑ το 1917, αριθμός τρεις φορές μεγαλύτερος από τους θανάτους που προκαλούν όλα τα διατροφικά νοσήματα σήμερα (Margaret Good *et al* 2018).

Όμως παρά τη σημαντική επίπτωση του *Mycobacterium bovis* στη δημόσια υγεία φαίνεται ότι οι οικονομικές συνέπειες της νόσου ήταν αυτές που οδήγησαν σε

συντονισμένες προσπάθειες για την εξάλειψη της ασθένειας (Margaret Good *et al* 2018).

1.3. Παθογένεια της φυματίωσης των βοοειδών

Μετά από την είσοδο των μυκοβακτηρίων στον οργανισμό, αυτά φαγοκυτταρώνονται από τα μακροφάγα. Τα φαγοσωμάτια των μακροφάγων δεν μπορούν να καταστρέψουν τα μυκοβακτήρια λόγω των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών του κυτταρικού τους τοιχώματος, με αποτέλεσμα την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό τους, ο οποίος προκαλεί τελικά λύση των μακροφάγων. Στη συνέχεια τα μυκοβακτήρια μεταφέρονται μέσω της λέμφου και εγκαθίστανται στα επιχώρια λεμφογάγγλια οπότε αρχίζει η διέγερση των CD4+ λεμφοκυττάρων (6-8 εβδομάδες). Η φάση αυτή είναι πολύ σημαντική στη διάγνωση της νόσου επειδή η συγκεκριμένη κατηγορία λεμφοκυττάρων αντιδρά στη δοκιμή του φυματινισμού (Carmen Alicia Daza Bolaños *et al* 2013*).* Οι αλλοιώσεις της αρχικής εστίας και των επιχώριων λεμφογαγγλίων αποτελούν το «πρωτοπαθές σύμπλεγμα», το οποίο μπορεί να παραμείνει αδρανές, αν και συνήθως επεκτείνεται άλλοτε με αργό και άλλοτε με γρήγορο ρυθμό.

Στη συνέχεια τα μυκοβακτήρια, μέσω της λέμφου εγκαθίστανται σε διάφορα άλλα όργανα και ιστούς οπού σχηματίζονται νέα φυμάτια. Στην περίπτωση που μέσα ή πολύ κοντά από το φυμάτιο διέρχονται αιμοφόρα αγγεία τότε, η διασπορά των μυκοβακτηρίων στον οργανισμό μπορεί να γίνει και μέσω της κυκλοφορίας του αίματος.

Τα μυκοβακτήρια προκαλούν συνήθως τυπική κοκκιωματώδη φλεγμονή με νεκρωτικές εστίες. Οι τυπικές φυματιώδεις αλλοιώσεις παρουσιάζουν ιδιόμορφη σύσταση που οφείλεται στην συνάθροιση ελεύθερων και φαγοκυτταρωμένων μυκοβακτηρίων, καθώς επίσης και μακροφάγων, πολλά από τα οποία μεταπίπτουν σε επιθηλιοειδή κύτταρα και γιγαντοκύτταρα. Το σύνολο αυτών των κυττάρων περιβάλλεται συνήθως από ινώδη κάψα, που ολοκληρώνει την τυπική εμφάνιση του φυματίου και συμβάλλει στον περιορισμό της εξάπλωσής του. Η εξέλιξη της χρόνιας μορφής της νόσου χαρακτηρίζεται από τον σχηματισμό μεγάλων φυματίων σε σχήμα ανθοκράμβης, ιδιαίτερα στους πνεύμονες (όταν πρόκειται για αερογενή μόλυνση) και στον εντερικό σωλήνα (όταν πρόκειται για προσβολή μέσω της πεπτικής οδού).

Όταν στην κυκλοφορία του αίματος εισβάλουν πολυάριθμα μυκοβακτήρια, αναπτύσσονται ταυτόχρονα, σε διάφορα όργανα, πολλά φυμάτια. Σε αυτή την περίπτωση τα φυμάτια είναι μικρού μεγέθους και μοιάζουν με κόκκους κεχριού, γεγονός εξαιτίας του οποίου, η συγκεκριμένη μορφή φυματίωσης ονομάζεται «κεχροειδής». Η κεχροειδής φυματίωση έχει ταχεία εξέλιξη και είναι συνήθως θανατηφόρος.

Κεχροειδής φυματίωση εμφανίζεται συνήθως σε ανοσοκατεσταλμένα ή εξασθενημένα ζώα και χαρακτηρίζεται από εμφάνιση πρώιμης γενικευμένης νόσου και ανάπτυξη πολυάριθμων φυματίων σε διάφορα όργανα, συμπεριλαμβανομένου και του μαστικού αδένα *(*Carmen Alicia Daza Bolaños *et al* 2013)*.*

Στις περισσότερες περιπτώσεις, η διάδοση των μυκοβακτηρίων από το πρωτοπαθές σύμπλεγμα γίνεται με βραδύ ρυθμό, γεγονός που προκαλεί εντονότερη ανοσολογική αντίδραση και σχηματισμό μεγαλύτερου μεγέθους φυματίων, σε σύγκριση με την κεχροειδή φυματίωση. Τα φυμάτια αυτά μεγεθύνονται βαθμιαία ενώ το κέντρο τους νεκρώνεται (τυροειδοποίηση) με τάση εναπόθεσης αλάτων ασβεστίου (ασβεστοποίηση). Σε ορισμένες περιπτώσεις όταν υπάρξει κάμψη της ανοσοποιητικής επάρκειας, παρατηρείται ενεργοποίησή των μυκοβακτηρίων, με αποτέλεσμα την περαιτέρω διάδοση τους.

1.4. Επιζωοτιολογία

1.4.1. Μετάδοση

Το *Mycobacterium bovis*, ο αιτιολογικός παράγοντας της φυματίωσης των βοοειδών, προσβάλλει κυρίως τα βοοειδή και βαρύτερα το είδος *Bos taurus*, αλλά και ένα ευρύ φάσμα κατοικίδιων και άγριων θηλαστικών, συμπεριλαμβανομένων και πολλών πρωτευόντων, μεταξύ των οποίων και ο άνθρωπος *(*Carmen Alicia Daza Bolaños *et al* 2013).

Το *Mycobacterium bovis* απομονώθηκε επίσης από τα ακόλουθα είδη: ιπποειδή, καμήλα, αγριόχοιρο, αντιλόπη, αλεπού βιζόν, ελάφι, ελέφαντα, σιτατούγκα, όρυξ, άδακα, ρινόκερο, σκίουρο, ασβό, λαγό, ρακούν, κογιότ και αρκετά αιλουροειδή όπως

λιοντάρια, τίγρεις, λεοπαρδάλεις, λύγκες, καθώς επίσης και από πτηνά *(Zoonotic Tuberculosis: WHO, FAO and OIE, 2017).*

Από τα είδη των κατοικίδιων ζώων που προσβάλλονται από το *Mycobacterium bovis*, τα βοοειδή, η αίγα και ο χοίρος θεωρούνται ως τα πλέον ευπαθή, ενώ το πρόβατο και ο ίππος εμφανίζουν αυξημένη φυσική αντίσταση (O'Reilly LM, Daborn CJ. 1995*).*

Δεξαμενή του *Mycobacterium bovis* στη φύση είναι τα μολυσμένα βοοειδή.

Στα βοοειδή η νόσος εμφανίζεται ανεξαρτήτως ηλικίας και φύλου, αν και λόγω της χρόνιας εξέλιξης, τα ενήλικα ζώα διαγιγνώσκονται συχνότερα και είναι συνηθέστερα συμπτωματικά (Carmen Alicia Daza Bolaños *et al* 2013).

Η φυματίωση είναι κατά κύριο λόγο νόσος του αναπνευστικού συστήματος και η μετάδοση της μέσα και μεταξύ των ειδών γίνεται κυρίως αερογενώς. Βέβαια το βακτήριο αποβάλλεται όχι μόνο με τον εκπνεόμενο αέρα αλλά και με όλες τις εκκρίσεις και απεκκρίσεις του μολυσμένου ζώου όπως το ρινικό έκκριμα, το σίελο, τα ούρα, τα κόπρανα, το γάλα, τα εκκρίματα του κόλπου και της μήτρας και τα φλεγμονώδη εξιδρώματα.

Αν και η μετάδοση του *Mycobacterium bovis* μεταξύ βοοειδών συμβαίνει συνήθως άμεσα, μέσω εισπνοής του μυκοβακτηριδίου που απελευθερώνεται από τον εκπνεόμενο αέρα των μολυσμένων ζώων, η έμμεση μετάδοση μέσω μολυσμένης τροφής ή νερού είναι επίσης πιθανή. Σε πειραματικό επίπεδο έχει ήδη αποδειχθεί η έμμεση μετάδοση της νόσου μεταξύ ελαφιών, μεταξύ ελαφιού και βοοειδών και μεταξύ ασβού και βοοειδών, μέσω μολυσμένων ζωοτροφών ή νερού (Elodie Barbier *et al* 2017).

Οι βασικοί παράγοντες που καθορίζουν την έμμεση μετάδοση της νόσου είναι: i) η διάδοση του μυκοβακτηρίου στο περιβάλλον, ii) οι φυσικές συνθήκες που επικρατούν (σύσταση εδάφους, καιρικές συνθήκες), και τέλος iii) η αλληλεπίδραση μεταξύ ενός ευπαθούς ξενιστή και του μολυσμένου περιβάλλοντος (Elodie Barbier *et al* 2017).

Το μυκοβακτήριο δεν πολλαπλασιάζεται στο εξωτερικό περιβάλλον, είναι όμως ανθεκτικό και παραμένει ζωντανό για αρκετούς μήνες, σε πτύελα, κόπρανα και διάφορα άλλα εκκρίματα ιδίως όταν δεν βρίσκεται κάτω από την άμεση επίδραση του

ηλιακού φωτός. Επιπλέον το μυκοβακτήριο είναι ευαίσθητο σε αρκετά απολυμαντικά, στην άμεση ηλιακή ακτινοβολία και στη θέρμανση (θανατώνεται στους 60^0 C x 15').

Ορισμένοι ερευνητές αναφέρουν ότι τα μέτρα ελέγχου που πλέον επιβάλλονται στα βοοειδή και σε μικρότερο βαθμό σε άλλα είδη ζώων έχουν περιορίσει τη διάδοση της νόσου μέσω συγκεκριμένων οδών. Ως εκ τούτου θεωρούν ότι η μετάδοση της νόσου γίνεται κυρίως μέσω της αναπνευστικής οδού ενώ αναφέρουν ότι η μόλυνση των ζωοτροφών και των βοσκοτόπων δεν είναι πια σημαντική για τη μετάδοση της νόσου, επειδή τα ζώα δεν εκτίθενται συχνά σε δόση αρκετά υψηλή ώστε να είναι μολυσματική μέσω της πεπτικής οδού (Morris RS *et al* 1994).

Για τα ενσταβλισμένα βοοειδή σημαντικότερος τρόπος μόλυνσης θεωρείται η αναπνευστική οδός. Ο ενσταβλισμός προδιαθέτει στη διάδοση της νόσου ιδίως υπό συνθήκες υψηλής πυκνότητας ζωικού κεφαλαίου. Για το λόγο αυτό, παρόλο που η ευπάθεια των βοοειδών στη φυματίωση είναι ανεξάρτητη της φυλής, η συχνότητα εμφάνισης της νόσου είναι μεγαλύτερη σε ζώα γαλακτοπαραγωγικής κατεύθυνσης, δεδομένου ότι αυτά διατηρούνται στην εκτροφή για περισσότερα χρόνια σε σχέση με τα βοοειδή κρεοπαραγωγικής κατεύθυνσης.

Η είσοδος της νόσου σε γαλακτοπαραγωγικές εκτροφές βοοειδών γίνεται κυρίως κατά την ανανέωση του ζωικού κεφαλαίου, με ζώα που είναι ασυμπτωματικοί φορείς του *Mycobacterium bovis* (Carmen Alicia Daza Bolaños *et al* 2013), αν και μπορεί να γίνει επίσης και μέσω μολυσμένης τροφής ή αντικειμένων. Στα αγελαία βοοειδή κύρια οδός μόλυνσης είναι η πεπτική, και σχετίζεται με την κατανάλωση τροφής ή νερού που έχει μολυνθεί από κόπρανα ή άλλα εκκρίματα ασθενών ζώων.

Σπάνια, η μετάδοση της μόλυνσης στα βοοειδή οφείλεται σε προσβεβλημένες αίγες, γάτες ή ακόμη και σε ανθρώπους (π.χ. ζωοκόμους), αν και στην τελευταία περίπτωση το υπεύθυνο παθογόνο είναι συνήθως το *Mycobacterium tuberculosis* που προσβάλλει τα βοοειδή μόνο σποραδικά και δεν μεταδίδεται μεταξύ των ζώων, με αποτέλεσμα η νόσος να είναι αυτοπεριοριζόμενη. Η αίγα, ως είδος, θεωρείται ευπαθής στη φυματίωση και σε περιπτώσεις επαφής με μολυσμένα βοοειδή το ποσοστό προσβολής σε επίπεδο εκτροφής μπορεί να ανέλθει στο 70%.

Ο χοίρος είναι ευαίσθητος στη νόσο και η αυξημένη συχνότητα εμφάνισης της νόσου σε χοιροτροφικές μονάδες αντικατοπτρίζει την κατάσταση που επικρατεί στα βοοειδή της περιοχής, ειδικά σε περιοχές όπου τα υποπροϊόντα επεξεργασίας γάλακτος των βοοειδών (τυρόγαλα) χρησιμοποιούνται για τη διατροφή των χοίρων.

Αν και πολλά είδη ζώων μπορούν να μολυνθούν από το *Mycobacterium bovis*, μόνο λίγα από αυτά δρουν ως ξενιστές συντήρησης ενώ τα υπόλοιπα δρουν ως ξενιστές διαφυγής και ως εκ τούτου στις περιπτώσεις αυτές η λοίμωξη δεν είναι αυτοσυντηρούμενη. Με εξαίρεση τα βοοειδή και το ελάφι, κάποια είδη έχουν γίνει ξενιστές συντήρησης μόνο εντός των ορίων του οικοσυστήματος στο οποίο διαβιούν (Morris RS *et al* 1994).

Η παρουσία φυματίωσης σε άγρια ζώα έχει προσελκύσει την προσοχή των επιστημόνων κυρίως επειδή τα ζώα αυτά εμπλέκονται στη μετάδοση της νόσου σε παραγωγικά ζώα και στον άνθρωπο. Στην Ιρλανδία και στο Ηνωμένο Βασίλειο, ο ευρωπαϊκός ασβός θεωρείται υπεύθυνος για τη συντήρηση και τη διάδοση του *Mycobacterium bovis* στη φύση. Ανάλογη δράση αποδίδεται σε άλλες ευρωπαϊκές χώρες στον αγριόχοιρο, στην αίγα και σε διάφορα είδη ελαφιού, ιδίως στα είδη *Cervus elaphus* και *Capreolus capreolus*. Στη Νέα Ζηλανδία, το όρνεο του είδους *Trichosurus vulpecula* είναι το βασικό είδος που επηρεάζεται και αποτελεί δεξαμενή του μυκοβακτηρίου, ενώ στη Βόρειο Αμερική, ανάλογο ρόλο έχει το λευκό ελάφι του είδους *Odocoileus virginianus* και ο βίσωνας (Eamonn Gormley *et al* 2017).

Επιπλέον η μετάδοση της νόσου στα βοοειδή μπορεί να γίνει:

- Ενδομήτρια
- Κάθετα μέσω μολυσμένου γάλακτος.
- Μέσω μολυσμένου σπέρματος στο πλαίσιο φυσικής ή τεχνητής οχείας.
- Μέσω μολυσμένου εξοπλισμού άμελξης ή ιατρογενώς

1.4.2. Η διάδοση της νόσου διεθνώς

Το *Mycobacterium bovis* είναι παγκοσμίως το πιο διαδεδομένο είδος του γένους *Mycobacterium* και όπως αναφέρθηκε ήδη, προσβάλλει πολλά σπονδυλωτά ζώα όλων των ηλικιακών ομάδων, συμπεριλαμβανομένου του ανθρώπου (E. Shitaye *et al* 2007).

Παρά την πρόοδο που έχει επιτευχθεί στον έλεγχο της νόσου, η φυματίωση των βοοειδών παραμένει σημαντική απειλή για την υγεία ανθρώπων και ζώων, έχει παγκόσμια διασπορά και προκαλεί μεγάλες οικονομικές απώλειες στη ζωική παραγωγή που οφείλονται στην μείωση της παραγωγής γάλακτος και κρέατος από 10 έως 25%, στην υγειονομική σφαγή των θετικών ζώων, στους περιορισμούς στην εξαγωγή ζώων και προϊόντων με βάση το βόειο κρέας.

Αρκετές, αναπτυγμένες κυρίως, χώρες κατάφεραν να μειώσουν ή να περιορίσουν τη συχνότητα εμφάνισης της ασθένειας τόσο στα βοοειδή, με την εφαρμογή μια σειράς μέτρων πρόληψης και ελέγχου που στηρίζονται στην εφαρμογή προγραμμάτων φυματινισμού, στη θανάτωση των θετικών βοοειδών σε επίσημα επιθεωρούμενα σφαγεία, στον έλεγχο των μετακινήσεων των ζώων, στον έλεγχο των νεοεισερχόμενων στις εκτροφές ζώων, σε καραντίνα των ύποπτων ζώων όσο και στον άνθρωπο, μέσω της βελτίωσης των πρακτικών υγιεινής και της παστερίωσης του γάλακτος (Marie-France Humblet *et al* 2009). Έτσι, πολλές χώρες ή περιοχές της Ευρώπης και αρκετές χώρες της Καραϊβικής (συμπεριλαμβανομένης της Κούβας) είναι ουσιαστικά απαλλαγμένες από τον *Mycobacterium bovis*. Η Αυστραλία επίσης χαρακτηρίζεται επίσημα απαλλαγμένη από την ασθένεια παρόλο που υπάρχουν υπολειμματικές μολύνσεις σε άγρια ζώα τα οποία όμως έχουν περιοριστεί σε κάποιες περιοχές του βόρειου τμήματος της χώρας που έχουν τεθεί σε απομόνωση. Κάτι ανάλογο ισχύει και για τον Καναδά, ο οποίος διακρίνεται σε δύο ζώνες, μία απαλλαγμένη από τη φυματίωση, και μια άλλη, όχι (Marie-France Humblet *et al* 2009).

Σύμφωνα με τα στοιχεία της «*Τελικής έκθεσης της Ευρωπαϊκής Επιτροπής για τα νοσήματα των βοοειδών και των χοίρων για το 2012*» οι χώρες και οι περιοχές της Ευρωπαϊκής Ένωσης που χαρακτηρίζονται «επίσημα απαλλαγμένες» από τη φυματίωση των βοοειδών είναι οι εξής:

Χώρες			
Αυστρία	Ελβετία	Ολλανδία	Τσεχία
Βέλγιο	Εσθονία	Πολωνία	Φινλανδία
Γαλλία	Λετονία	Σλοβακία	
Γερμανία	Λουξεμβούργο	Σλοβενία	
Δανία	Νορβηγία	Σουηδία	
Περιοχές			
Ηνωμένο Βασίλειο	Σκωτία		
Ιταλία	Περιοχή Αμπρούτζο: Επαρχία Πεσκάρα, Επαρχία Μπολζάνο, Περιοχή Εμίλια Ρομάνια, Περιοχή Φριούλι-Βενετία Τζούλια, Περιοχή Λάτσιο:επαρχίες Ριέτι, Βιτέρμπο, Λομβαρδία, Περιοχή Μάρκε: επαρχίες Άσκολι Πιτσένο, Φέρμο, Περιοχή Πιεμόντε: επαρχίες Άστι, Μπιέλλα, Νοβάρα, Βερμπάνια, Βερτσέλλι, Περιοχή Σαρδηνίας: επαρχίες Κάγκλαρι, Μέντιο Καμπιντάνο, Ογκλιάστρα, Όλμπια-Τέμπιο, Οριστάνο,		

	Περιοχή της Τοσκάνης, επαρχία Τρέντο, Περιοχή Βένετο
Πορτογαλία	Περιφέρεια του Αλγκάρβε: όλες οι συνοικίες

Παρά τη βελτίωση που έχει καταγραφεί, η αύξηση του αριθμού των περιστατικών μόλυνσης του ανθρώπου από το *Mycobacterium bovis* τα τελευταία χρόνια, αποτελεί σημαντική ένδειξη της ενδημικής διάδοσης της νόσου (Carmen Alicia Daza Bolaños *et al* 2013).

Ωστόσο, τα προγράμματα εκρίζωσης (έλεγχος και σφαγή των θετικών ζώων) σε ορισμένες αναπτυγμένες χώρες δεν έχουν το επιθυμητό αποτέλεσμα λόγω της παρουσίας ενζωοτικής μόλυνσης στον ντόπιο πληθυσμό των άγριων ζώων (FAO 2015).

Στον αναπτυσσόμενο κόσμο, η ασθένεια εξακολουθεί να προκαλεί σημαντικές απώλειες στη βοοτροφία. Όμως τα στοιχεία επιπολασμού της νόσου είναι ελάχιστα και οι διαθέσιμες πληροφορίες ενδέχεται να μην αντιπροσωπεύουν την πραγματική επιδημιολογική κατάσταση της νόσου στις περιοχές αυτές (FAO 2015). Έτσι παρόλο που η επιδημιολογία της φυματίωσης των βοοειδών είναι ήδη γνωστή και οι στρατηγικές αποτελεσματικού ελέγχου και εξάλειψης εφαρμόζονται εδώ και χρόνια στις αναπτυγμένες χώρες, η ασθένεια εξακολουθεί να είναι ευρέως διαδεδομένη και συχνά παραμελημένη στις περισσότερες αναπτυσσόμενες χώρες. Επιπλέον παρόλο που και οι συνέπειές της νόσου στη δημόσια υγεία, έχουν πλέον τεκμηριωθεί, ελάχιστα έχουν ερευνηθεί και εξακολουθούν να αγνοούνται σε αυτές τις περιοχές.

Δεδομένης της διάδοσης της φυματίωσης των βοοειδών, είναι επιτακτική η ανάγκη να ενταθούν τα μέτρα ελέγχου και πρόληψης που αποσκοπούν στην εξάλειψή της. Η συχνότητα προσβολής του ανθρώπου από το *Mycobacterium bovis* έχει πιθανώς υποτιμηθεί, εξαιτίας της έλλειψης μέσων διάγνωσης και δεδομένων τακτικής παρακολούθησης από τις περισσότερες χώρες. (Marie-France Humblet *et al* 2009).

1.4.3. Η διάδοση της νόσου στην Ελλάδα

Στην Ελλάδα εφαρμόζεται πρόγραμμα εκρίζωσης της φυματίωσης των βοοειδών από το 1977. Σύμφωνα με την ισχύουσα σήμερα εθνική και κοινοτική νομοθεσία η εφαρμογή του προγράμματος είναι υποχρεωτική και αφορά όλα τα βοοειδή ηλικίας άνω των 6 εβδομάδων.

Το πρόγραμμα περιλαμβάνει:

α) την υποβολή όλων των βοοειδών ηλικίας άνω των 6 εβδομάδων στη δοκιμή του φυματινισμού και την υποχρεωτική σφαγή όσων αντιδρούν θετικά,

β) την ταξινόμηση των βοοτροφικών εκτροφών σε κατηγορίες υγειονομικού καθεστώτος βάσει εργαστηριακής διάγνωσης,

γ) τον έλεγχο μετακινήσεων των ζώων.

Σκοπός του προγράμματος είναι ο περιορισμός και σταδιακά η εξάλειψη της νόσου μέσω της έγκαιρης απομάκρυνσης από την εκτροφή, των θετικών βοοειδών.

Σύμφωνα με τα στοιχεία που αναφέρονται στο «Πολυετές Ολοκληρωμένο Εθνικό Σχέδιο Ελέγχου 2015-2019» (ΠΟΕΣΕ) του Υπουργείου Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων (ΥΠΑΑΤ), το 2016 εφαρμόστηκε ενιαίο πρόγραμμα εκρίζωσης της φυματίωσης των βοοειδών σε όλη την Ελληνική Επικράτεια (σε εφαρμογή της ΥΑ 30/3430, ΦΕΚ 171Β΄/23-01-2015).

Στον παρακάτω πίνακα περιλαμβάνονται συνοπτικά στοιχεία, από την εφαρμογή του Προγράμματος Εκρίζωσης της Φυματίωσης στην Ελλάδα το έτος 2016 *(Έκθεση ΠΟΕΣΕ 2016 Υπ. Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων http://www.minagric.gr/images/stories/docs/politis/Trofima_Ygeia/poese_2016.pdf)*.

Πίνακας 1. Στοιχεία Εκτροφών / Βοοειδών

Αριθμός **εκτροφών** βοοειδών στο πρόγραμμα επίσημου ελέγχου	**24.815**
Αριθμός **βοοειδών** στο πρόγραμμα επίσημου ελέγχου	**725.852**
Αριθμός **εκτροφών** που εξετάστηκαν	**3.841**
Αριθμός **θετικών εκτροφών**	**137**
Αριθμός **νέων θετικών εκτροφών**	**48**
Αριθμός **βοοειδών** που εξετάστηκαν ατομικά	**163.584**
Αριθμός **βοοειδών** που εξετάστηκαν συνολικά (+επαναλήψεις)	**175.332**
Αριθμός **θετικών βοοειδών**	**2.222**
Αριθμός θετικών **ζώων** που **σφάχτηκαν**	**2.203**
Συνολικός αριθμός ζώων που σφάχτηκαν στο πρόγραμμα	**2.439**

Πίνακας 2. Ετήσιος επιπολασμός & Επίπτωση

Ετήσιος **Επιπολασμός** Νοσήματος σε **επίπεδο εκτροφής**	**3,57 (%)**
Ετήσιος **Επιπολασμός** Νοσήματος σε **επίπεδο ζώων**	**1,27(%)**
Ετήσια **Επίπτωση** Νοσήματος σε **επίπεδο εκτροφής**	**1,25(%)**

Πίνακας 3. Η ταξινόμηση των εκτροφών βοοειδών στην Ελλάδα βάσει υγειονομικού καθεστώτος, το έτος 2016

T1		**T+**		**T2**		**T3 ΑΝΑΣΤΟΛΗ**		**T3**	
Εκτροφές	Ζώα	Εκτροφές	Ζώα	Εκτροφές	Ζώα	Εκτροφές	Ζώα	Εκτροφές	Ζώα
12.201	230.394	147	12.349	169	9.068	2.958	116.661	9.346	357.380

Επεξήγηση Συμβόλων

(T1) *Εκμετάλλευση άγνωστου υγειονομικού καθεστώτος*

(T+) *Εκμετάλλευση μολυσμένη από φυματίωση*

(T2) *Εκμετάλλευση αρνητική ως προς τη φυματίωση*

(T3 αναστολή) *Εκμετάλλευση επίσημα απαλλαγμένη φυματίωσης σε αναστολή*

(T3) *Εκμετάλλευση επίσημα απαλλαγμένη φυματίωσης*

Τα στοιχεία που καταγράφηκαν στο πλαίσιο της εφαρμογής του προγράμματος εκρίζωσης της φυματίωσης των βοοειδών ειδικά στην Περιφέρεια Δυτικής Αττικής, παρατίθενται ακολούθως:

(Πηγή: Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων, Γενική Δ/νση Βιώσιμης Ζωικής Παραγωγής και Κτηνιατρικής, Δ/νση Υγείας των ζώων Τμήμα Ζωοανθρωπονόσων)

Πίνακας 4. Συγκεντρωτικά στοιχεία Δυτικής Αττικής 2013-2016 - Εκτροφές & Ζώα στο Πρόγραμμα

Εκτροφές/ζώα	2013	2014	2015	2016
Συνολικός αριθμός εκτροφών	162	160	156	155
Αριθμός εκτροφών στο πρόγραμμα	24	22	28	30
Αριθμός εκτροφών που εξετάστηκαν	23	22	25	23
Αριθμός θετικών	7	7	3	4
Αριθμός Νέων θετικών	1	2	0	0
Αριθμός εκτροφών με καθολική σφαγή	0	0	0	0
Επιπολασμός (% ποσοστό θετικών εκτροφών Ετησίως)	30,43	31.82	12,00	17,39
Επίπτωση (% νέων θετικών εκτροφών ετησίως)	4,35	9,09	0,00	0,00
Συνολικός αριθμός ζώων	2645	1936	1999	1792
Συνολικός αριθμός ζώων στο πρόγραμμα	2309	1779	1939	1792
Αριθμός ζωών που εξετάστηκαν	1530	1779	1875	1792
Αριθμός ζωών που εξετάστηκαν ατομικά	2309	1779	1875	1792
Αριθμός θετικών ζωών	213	315	154	223
Αριθμός ζώων που σφάχθηκαν	213	315	154	223
Συνολικός Αριθμός ζώων που σφάχθηκαν	213	315	154	223
Επιπολασμός (% θετικών ζώων Ετησίως)	13,92	17,71	8,21	12,44

Πίνακας 5. Επιζωοτιολογική κατάσταση – Υγειονομικό Καθεστώς Εκτροφών 2013 - 2016

	2013	2014	2015	2016
Συνολικός αριθμός Εκτροφών στο Πρόγραμμα	**24**	**22**	**28**	**30**
Συνολικός Αριθμός Ζώων στο Πρόγραμμα	**2309**	**1779**	**1939**	**1792**
Άγνωστο Υγειονομικό Καθεστώς – Τ1	**0**	**0**	**3**	**7**
Τελευταίος έλεγχος με θετικό αποτέλεσμα Τ+	**7**	**6**	**4**	**4**
Τελευταίος έλεγχος με αρνητικό αποτέλεσμα Τ2	**1**	**0**	**0**	**0**
Τ3 Αναστολή	**0**	**0**	**0**	**0**
Επίσημα Απαλλαγμένη Τ3	**16**	**16**	**21**	**19**

Όπως προκύπτει από τα παραπάνω στοιχεία, παρόλο που το πρόγραμμα εκρίζωσης εφαρμόζεται από το 1977, η φυματίωση των βοοειδών παραμένει νόσημα ενζωοτικού χαρακτήρα στη χώρα μας.

1.5. Κλινική εκδήλωση της φυματίωσης των βοοειδών

Η φυματίωση των βοοειδών είναι χρόνιο νόσημα και στα αρχικά της στάδια έχει ήπια κλινική εκδήλωση που συχνά διαφεύγει της προσοχής. Τα ζώα παρουσιάζουν μη ειδικά συμπτώματα όπως ανορεξία και προοδευτική απώλεια βάρους, αδυναμία, χαμηλό πυρετό και διαλείπων βήχα. Επιπλέον ανάλογα με τον εντοπισμό της νόσου, παρατηρείται διόγκωση των προωμοπλατιαίων, των υπογνάθιων, των οπισθομαστικών (φυματιώδης μαστίτιδα), των πνευμονικών (φυματιώδης πνευμονία) ή και των μεσεντέριων (φυματιώδης εντερίτιδα) λεμφογαγγλίων. Σε ορισμένες περιπτώσεις η προκαλούμενη φλεγμονή οδηγεί σε μεγάλη διόγκωση των λεμφογαγγλίων τα οποία ενίοτε εμποδίζουν την κυκλοφορία του αίματος ή φράσουν τους αεραγωγούς και τον πεπτικό σωλήνα.

Σε περίπτωση προσβολής του πνεύμονα εκδηλώνεται χρόνιος βήχας λόγω βρογχοπνευμονίας. Εάν η βρογχοπνευμονία εξελιχθεί σε εκτεταμένη πνευμονία

εκδηλώνεται έντονη δύσπνοια και ταχύπνοια. Η συγκεκριμένη κατάσταση συχνά επιπλέκεται και με πλευρίτιδα (φυματιώδης πλευρίτιδα) η οποία συνοδεύεται από ήπια κλινικά συμπτώματα, όπως πλευροδυνία και δύσπνοια

Όταν η νόσος εντοπίζεται στην πεπτική οδό τότε μπορεί να παρατηρηθεί τυμπανισμός, διαλείπουσα διάρροια ή/και δυσκοιλιότητα.

Στο τελικό στάδιο της νόσου εκδηλώνεται βαριά καταβολή, καχεξία και οξεία αναπνευστική ανεπάρκεια, που οδηγούν σταδιακά στο θάνατο του ζώου.

Τα προσβεβλημένα ζώα εμφανίζουν επίσης μείωση της γαλακτοπαραγωγής κατά 10-20%, υπογονιμότητα, μειωμένη ανάπτυξη μυϊκών μαζών και μείωση της αξίας του σφάγιου με αρνητικές οικονομικές επιπτώσεις τόσο σε επίπεδο εκτροφής όσο και σε επίπεδο χώρας (Margaret Good *et al* 2018).

Η κλινική διάγνωση της φυματίωσης μπορεί να γίνει μόνο σε προχωρημένο στάδιο της νόσου, όταν τα συμπτώματα γίνονται αντιληπτά με την κλινική εξέταση. Έτσι κατά τα πρώτα στάδια της νόσου τα προσβεβλημένα ζώα αποτελούν κίνδυνο τόσο για τη μετάδοσή της νόσου σε άλλα ζώα της εκτροφής, όσο και για τη δημόσια υγεία.

1.6. Σχέση με τη Δημόσια Υγεία

Η έκθεση στου ανθρώπου στο *Mycobacterium bovis* οδηγεί συχνά στην εκδήλωση φυματίωσης. Η προσβολή του ανθρώπου γίνεται κυρίως τροφιμογενώς μέσω της κατανάλωσης μη-παστεριωμένου γάλακτος και γαλακτοκομικών προϊόντων. Σπανιότερα η προσβολή του ανθρώπου οφείλεται στην άμεση έκθεσή του σε ασθενή ζώα, κάτι που αναφέρεται κυρίως για ζωοκόμους, κτηνοτρόφους και κτηνιάτρους. Η βελτίωση των συνθηκών διαβίωσης και υγιεινής και η εφαρμογή της παστερίωσης έχει μειώσει τη διάδοση της νόσου στις αναπτυγμένες χώρες. Έτσι η φυματίωση των βοοειδών για τις χώρες αυτές φαίνεται να είναι ένα δευτερεύον θέμα όσον αφορά τη δημόσια υγεία, καθώς η μόλυνση των ανθρώπων από το *Mycobacterium bovis* αντιπροσωπεύει ένα μικρό ποσοστό (0,5-7,2%) του συνόλου των ασθενών με βακτηριολογικά επιβεβαιωμένη διάγνωση της φυματίωσης ενώ σε αναπτυσσόμενες χώρες, η μόλυνση από τον *Mycobacterium bovis* εξακολουθεί να αποτελεί σοβαρή απειλή για τη δημόσια υγεία (Flora Vayr *et al* 2018).

Η διεθνής κοινότητα δίνει μεγάλη έμφαση στην διαχείριση της φυματίωσης των βοοειδών ενώ ο Οργανισμός Τροφίμων και Γεωργίας των Ηνωμένων Εθνών (FAO)

αναγνώρισε τη ζωονοτική φυματίωση των βοοειδών ως μολυσματική ασθένεια προτεραιότητας, η οποία θα πρέπει να αντιμετωπιστεί ολιστικά με ορθή διαχείριση και διασύνδεση ζώων-ανθρώπου-οικοσυστήματος, μέσω εθνικών και περιφερειακών προσπαθειών (FAO 2015).

Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (WHO) θεωρεί ότι η φυματίωση είναι μια αναδυόμενη ασθένεια που συνιστά σημαντική απειλή για τη δημόσια υγεία λόγω του αυξημένου αριθμού αναφορών στον άνθρωπο, ιδιαίτερα στα άτομα που έχουν προσβληθεί με HIV/AIDS, καθώς και λόγω της αύξησης των ανθεκτικών στελεχών σε πολλά φάρμακα.

Στην ετήσια έκθεση του 2015 του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας γίνεται αναφορά για 9,6 εκατομμύρια νέες περιπτώσεις ανθρώπινης φυματίωσης και 1,5 εκατομμύρια θανάτους. Στην ίδια έκθεση αναφέρεται επίσης ότι το 2014 η φυματίωση κατατάχθηκε για πρώτη φορά ως κύρια μολυσματική ασθένεια ενώ εκτιμάται ότι το *Mycobacterium bovis* είναι η αιτία φυματίωσης για τον άνθρωπο σε περίπου 10-15% των περιπτώσεων στις αναπτυσσόμενες χώρες και σε περίπου 1-2% των περιπτώσεων στις ανεπτυγμένες χώρες.

Σύμφωνα επίσης με στοιχεία του WHO, το **2016** καταγράφηκαν 147.000 νέα κρούσματα **ζωονοτικής φυματίωσης** και προκλήθηκαν 12.500 θάνατοι, ενώ το **2015** καταγράφηκαν 149.000 κρούσματα **ζωονοτικής φυματίωσης** από τα οποία τα 13.400 είχαν θανατηφόρο κατάληξη. (WHO: Global tuberculosis report 2018).

ΑΡΙΘΜΟΣ ΝΕΩΝ ΠΕΡΙΠΤΩΣΕΩΝ ΤΟ 2016 ΑΝΑ ΠΕΡΙΟΧΗ

Αφρική: 72 700

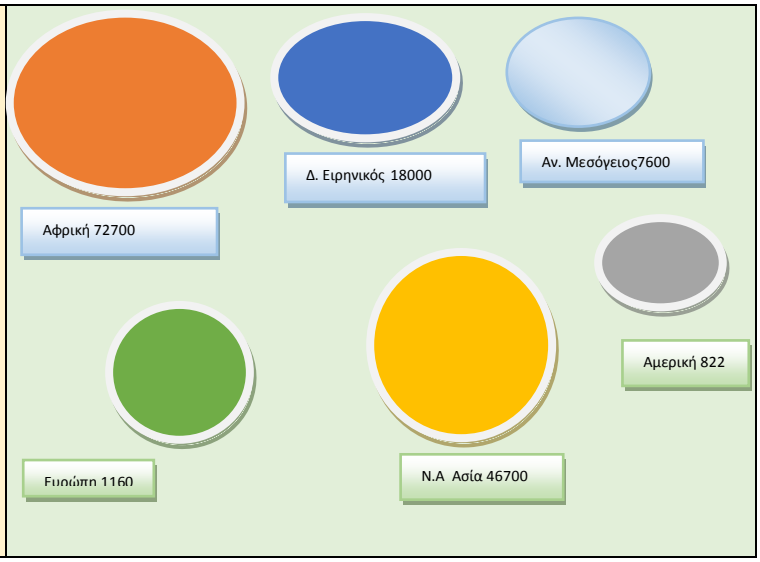
Νοτιοανατολική Ασία: 46 700

Δυτικό Ειρηνικό: 18 000

Ανατολική Μεσόγειος: 7.600

Αμερική: 822

Ευρώπη: 1 160



Στην Αφρική η φυματίωση βοοειδών είναι πολύ διαδεδομένη αφού δεν υπάρχει αποτελεσματικός έλεγχος της νόσου, ενώ η τακτική της παστερίωσης του γάλακτος και της επιθεώρησης του κρέατος στο σφαγείο, συνήθως δεν εφαρμόζονται. Η κατάσταση επιδεινώνεται από την παρουσία πολλαπλών πρόσθετων παραγόντων κινδύνου όπως οι ανθρώπινες συνήθειες (τρόπος ζωής) και ο υψηλός επιπολασμός των μολύνσεων από τον ιό HIV. (Borna Müller *et al* 2013)

Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας αναφέρει ότι οι εκτιμήσεις για το παγκόσμιο βάρος της ζωονοτικής φυματίωσης είναι ασαφείς εξαιτίας της απουσίας συστηματικής παρακολούθησης σε πληθυσμούς ανθρώπων και ζώων στις περισσότερες χώρες, ιδίως σε χώρες στις οποίες η φυματίωση βοοειδών είναι ενδημική και όπου η εργαστηριακή ικανότητα είναι περιορισμένη με αποτέλεσμα την έλλειψη στατιστικών δεδομένων.

Οι περιπτώσεις ζωονοτικής φυματίωσης στους ανθρώπους είναι σπάνιες σε χώρες όπου εφαρμόζονται προγράμματα ελέγχου της φυματίωσης των βοοειδών (Borna Müller *et al* 2013).

1.7. Μέτρα Πρόληψης και Ελέγχου

Το κύριο μέσο περιορισμού της διάδοσης της φυματίωσης των βοοειδών είναι η εφαρμογή προγράμματος ελέγχου, βάσει της δοκιμής του φυματινισμού και η απομάκρυνση των θετικών ζώων. Ο έλεγχος αυτός πρέπει να γίνεται τόσο σε επίπεδο εκμετάλλευσης, όσο και σε επίπεδο περιοχής.

Πιο αναλυτικά, ο έλεγχος της νόσου στη βοοτροφική εκμετάλλευση στηρίζεται στον έλεγχο και την απομάκρυνση των μολυσμένων ζώων, στην αποφυγή διάδοσης της νόσου και στην αποτροπή εισόδου της σε απαλλαγμένες εκτροφές.

Καθοριστικό παράγοντα για την επιτυχή έκβαση του προγράμματος αποτελεί η εκπαίδευση και η ενημέρωση των κτηνοτρόφων καθώς και η συνεργασία τους με τις αρμόδιες αρχές. Επιπλέον είναι απαραίτητο να υπάρχει πλήρης και ακριβής σήμανση των βοοειδών και έλεγχος των μετακινήσεων τους.

Τα στοιχεία των χωρών που εφάρμοσαν αποτελεσματικά το πρόγραμμα ελέγχου δείχνουν ότι η επιτυχία της εφαρμογής προγραμμάτων ελέγχου της φυματίωσης των βοοειδών, είναι αποτέλεσμα συνδυασμού πολλών παραγόντων όπως πλήρης στήριξη των παραγωγών, ύπαρξη κατάλληλου νομικού πλαισίου για την επιβολή μέτρων ελέγχου και ενεργό συμμετοχή όλων των ενδιαφερομένων για την εξεύρεση

πρακτικών και οικονομικά προσιτών επιλογών, αναλόγως του εκάστοτε επιζωοτιολογικού καθεστώτος. Η εκρίζωση της νόσου, και ακόμη περισσότερο η εξάλειψή της είναι ένας στόχος εξαιρετικά απαιτητικός, τόσο σε επίπεδο διοικητικής επάρκειας όσο και σε επίπεδο πόρων (FAO: Strengthening control of bovine tuberculosis at the animal–human–ecosystem interface 2015).

Ο έλεγχος και η εξάλειψη της φυματίωσης των βοοειδών απαιτούν την ανάπτυξη μιας στρατηγικής δημόσιας υγείας που να βασίζεται στην άμεση συνεργασία και διασύνδεση γιατρών, κτηνιάτρων και άλλων ειδικών επιστημόνων περιβαλλοντικής υγείας. Απαιτείται διεπιστημονική προσέγγιση, η οποία είναι και η μοναδική σωστή προσέγγιση, μιας και η υγεία των ανθρώπων επηρεάζεται από το περιβάλλον, αλλά και την υγεία των ζώων.

Σήμερα, η προσέγγιση που θεωρείται περισσότερο δόκιμη για τον έλεγχο της φυματίωσης των βοοειδών, αλλά και άλλων ζωονόσων σε παγκόσμιο επίπεδο είναι αυτή της **«Ενιαίας Υγείας» ή «One Health».**

Η έννοια της «Ενιαίας Υγείας» εισήχθη στις αρχές της δεκαετίας του 2000, και συνίσταται στην επίγνωση ότι η υγεία των ζώων και του ανθρώπου αλληλεξαρτώνται και συνδέονται με τα βιολογικά χαρακτηριστικά των οικοσυστημάτων στα οποία διαβιούν. Η έννοια αυτή προβλέπεται και εφαρμόζεται από τον *Παγκόσμιο Οργανισμό για την Υγεία των Ζώων* (World Organisation for Animal Health OIE) ως συνεργατική σφαιρική προσέγγιση για την κατανόηση των κινδύνων για την υγεία των ανθρώπων και των ζώων (συμπεριλαμβανομένων τόσο των κατοικίδιων ζώων όσο και της άγριας ζωής) και της υγείας του οικοσυστήματος στο σύνολό του. Ο *Παγκόσμιος Οργανισμός για την Υγεία των Ζώων* βασίζεται στα διακυβερνητικά πρότυπα που εκδίδει και στις πληροφορίες για την υγεία των ζώων που συλλέγονται σε παγκόσμιο επίπεδο, καθώς και στο δίκτυο διεθνών εμπειρογνωμόνων και προγραμμάτων για την ενίσχυση των εθνικών κτηνιατρικών υπηρεσιών. Επιπλέον, συνεργάζεται με περισσότερους από 70 διεθνείς οργανισμούς, ιδιαίτερα εκείνους που διαδραματίζουν βασικό ρόλο στη διασύνδεση ανθρώπων-ζώων-οικοσυστημάτων (World Organisation for Animal Health OIE: One Health "at a glance" 2018).

Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (WHO), ο Παγκόσμιος Οργανισμός για την Υγεία των Ζώων (OIE), ο Οργανισμός Τροφίμων και Γεωργίας (FAO) και η Διεθνής Ένωση κατά της Φυματίωσης και της Πνευμονοπάθειας (THE UNION) δημοσίευσαν τον

Οκτώβριο του 2017, τον πρώτο οδικό χάρτη για την αντιμετώπιση της ζωονοτικής φυματίωσης **(Roadmap for zoonotic tuberculosis)**.

Ο χάρτης επικεντρώνεται στην προσέγγιση One Health, αναγνωρίζοντας την αλληλεξάρτηση των τομέων της υγείας των ανθρώπων και των ζώων με σκοπό την αντιμετώπιση των σημαντικότερων επιπτώσεων της ασθένειας αυτής στην υγεία και την οικονομία. Ορίζει σαφείς άμεσες δράσεις που μπορούν να αναλάβουν όλοι οι ενδιαφερόμενοι για την αντιμετώπιση αυτού του ζητήματος σε διάφορους τομείς και κλάδους και ορίζει ορόσημα βραχυπρόθεσμα και μεσοπρόθεσμα. Ο χάρτης πορείας απαιτεί συντονισμένη δράση από κυβερνητικές υπηρεσίες, δωρητές, ακαδημαϊκούς κύκλους, μη κυβερνητικές οργανώσεις και ιδιωτικούς φορείς σε πολιτικό, οικονομικό και τεχνικό επίπεδο. Στον χάρτη προβλέπονται, **δέκα** προτεραιότητες δράσης, οι οποίες θα αποφέρουν επίσης σημαντικά οφέλη για τον έλεγχο ζωονοσογόνων και διατροφικών ασθενειών.

Οι δέκα δράσεις του χάρτη είναι:

1. Συστηματική έρευνα, συλλογή, ανάλυση και αναφορά αξιόπιστων επιδημιολογικών και επιζωοτιολογικών δεδομένων, συμπεριλαμβανομένης της άγριας πανίδας.
2. Διάδοση της χρήσης κατάλληλων εργαστηριακών μεθόδων διαγνωστικής διερεύνησης της φυματίωσης στον άνθρωπο και στα ζώα.
3. Βελτίωση των μέσων που είναι διαθέσιμα για τον έλεγχο και την πρόληψη κατά της φυματίωσης.
4. Ανάπτυξη στρατηγικών για τη βελτίωση της ασφάλειας των τροφίμων.
5. Ανάπτυξη της ικανότητας του κτηνοτροφικού κλάδου να επιτύχει τον περιορισμό της διάδοσης της φυματίωσης στα ζώα.
6. Προσδιορισμός των βασικών πληθυσμών και των διαδρομών μετάδοσης της ζωονοτικής φυματίωσης.
7. Αύξηση της ευαισθητοποίησης και της ενημέρωσης του κοινού, και των αρμόδιων φορέων.
8. Ανάπτυξη πολιτικής και εφαρμογή κατευθυντήριων γραμμών σύμφωνα με τα διακυβερνητικά πρότυπα, για την πρόληψη, την επιτήρηση, τη διάγνωση και τη θεραπεία της ζωονοσογόνου φυματίωσης.

9. Καθορισμός μέτρων για την ολιστική βελτίωση της υγείας του ανθρώπου και των ζώων.
10. Δημιουργία μιας επενδυτικής πλατφόρμας για υποστήριξη και χρηματοδότηση δράσεων για την αντιμετώπιση σε διάφορους τομείς, της ζωονοσογόνου φυματίωσης σε παγκόσμιο, περιφερειακό και εθνικό επίπεδο.

2. Σκοπός

Σκοπός αυτής της μελέτης ήταν να εκτιμηθεί κατά πόσο η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ένας πρώιμος διαγνωστικός δείκτης της μόλυνσης, βοοτροφικών μονάδων γαλακτοπαραγωγικής κατεύθυνσης, από Mycobacterium bovis.

3. Κυρίως μέρος

3.1 Υλικά και Μέθοδος

3.1.1. Συλλογή βιολογικού υλικού

Το σχέδιο δειγματοληψίας επικεντρώθηκε σε μια περιοχή της Περιφερειακής Ενότητας Δυτικής Αττικής, η οποία θεωρείται ενζωοτική για τη φυματίωση των βοοειδών. Εντός της συγκεκριμένης περιοχής δραστηριοποιούνται τέσσερις (4) γαλακτοπαραγωγικές εκμεταλλεύσεις στις οποίες δόθηκαν οι Κωδικοί A, B, C, D.

Η συνολική δυναμικότητα των τεσσάρων εκμεταλλεύσεων είναι **536** ζώα.

Τα δείγματα του γάλακτος συλλέχθηκαν με ασηπτικές διαδικασίες κατά την περίοδο Ιουλίου-Αυγούστου 2018, από ζώα ηλικίας άνω των 8 ετών.

Οι πληροφορίες που περιλαμβάνονται στον πίνακα 6 και αφορούν στις εκμεταλλεύσεις και τα ζώα συλλέχθηκαν με προσωπική συνέντευξη των ιδιοκτητών κατά τη διάρκεια της δειγματοληψίας:

Πίνακας 6. Στοιχεία Βοοτροφικών Μονάδων

Ιστορικό των βοοτροφικών μονάδων.	
ΕΚΤΡΟΦΗ Α	
Περιοχή	Ελευσίνα
Έτος ίδρυσης	01.01.1975
Αριθμός αρμεγόμενων	100

αγελάδων	
Ηλικίες αρμεγόμενων	3 – 10 ετών (μεγαλύτερος αριθμός ζώων ηλικίας 3-6 ετών)
Υγειονομικό Καθεστώς	Αρνητική στη φυματίωση. Αρνητική στη βρουκέλλωση.
Ιστορικό Φυματίωσης	Η εκμετάλλευση στο παρελθόν, ήταν θετική στη φυματίωση. Κάποια χρονική στιγμή προχώρησε σε καθολική σφαγή των ζώων, εξυγίανση των σταβλικών εγκαταστάσεων και του εξοπλισμού και σε αγορά νέων ζώων απαλλαγμένων από τη νόσο (ακριβή στοιχεία δεν υπάρχουν). Από το 2012 έως σήμερα η εκμετάλλευση χαρακτηρίζεται ως απαλλαγμένη από τη φυματίωση **(Τ3).**
Ιστορικό Μαστίτιδων	Περίπου 15 κρούσματα / έτος (δήλωση κτηνοτρόφου).
Αριθμός δειγμάτων	23 (Α1 – Α23)
ΕΚΤΡΟΦΗ Β	
Περιοχή	Ασπρόπυργος
Έτος ίδρυσης	11.04.2006
Αριθμός αρμεγόμενων αγελάδων	210
Ηλικίες αρμεγόμενων	3 – 10 ετών (μεγαλύτερος αριθμός ζώων ηλικίας 5-8 ετών)
Υγειονομικό Καθεστώς	Φυματίωση (+), Βρουκέλωση (+)
Ιστορικό Φυματίωσης	Η εκμετάλλευση βρέθηκε πρώτη φορά θετική στη φυματίωση στις 25.09.2012. Τη χρονιά αυτή οδηγήθηκαν στο σφαγείο 170 θετικά ζώα. Η εκμετάλλευση μπαίνει σε συστηματική παρακολούθηση και έτσι εφαρμόζεται πρόγραμμα φυματινισμού στις 19.02.13, 25.06.13 και 22.10.13 ενώ οδηγούνται στο σφαγείο 21, 26 και 9 θετικά ζώα αντίστοιχα. Από την εφαρμογή του προγράμματος στις 11.02.14 και 16.05.14 εντοπίζονται μόνο 2 θετικά ζώα τα οποία οδηγούνται στο σφαγείο. Το 2015 δεν εντοπίστηκε κανένα θετικό ζώο στο

	φυματινισμό που πραγματοποιήθηκε στις 17.02.2015. Στις 24.05.2016 ο φυματινισμός εντοπίζονται 66 ζώα θετικά στη φυματίωση τα οποία σφάζονται. Το πρόγραμμα εφαρμόστηκε και τα επόμενα έτη στις 06.06.17 και στις 22.05.18. βρέθηκαν 10 & 7 θετικά ζώα αντίστοιχα τα οποία σφάχθηκαν.
Ιστορικό Μαστίτιδων:	Όχι ιδιαίτερα (δήλωση κτηνοτρόφου)
Αριθμός δειγμάτων	27 (B1 – B27)
ΕΚΤΡΟΦΗ Γ	
Περιοχή	Ασπρόπυργος
Έτος ίδρυσης	15.01.2006
Αριθμός αρμεγόμενων αγελάδων	26
Ηλικίες αρμεγόμενων:	3 –10 ετών (οι περισσότερες αγελάδες είναι μεγάλες σε ηλικία. Μόνο το 20% των ζώων είναι κάτω από 2,5 ετών).
Υγειονομικό Καθεστώς	Φυματίωση (T3). Βρουκέλωση (B3).
Ιστορικό Φυματίωσης	Η εκμετάλλευση από την ίδρυση της έως σήμερα δεν έχει δώσει θετικά αποτελέσματα κατά την εφαρμογή του φυματινισμού και πλέον χαρακτηρίζεται ως επίσημα απαλλαγμένη από τη Φυματίωση (T3).
Ιστορικό Μαστίτιδων	Ποτέ (δήλωση κτηνοτρόφου)
Αριθμός δειγμάτων	10 (C1 – C10)
ΕΚΤΡΟΦΗ Δ	
Περιοχή	Ασπρόπυργος
Έτος ίδρυσης	**01.07.2004**
Αριθμός αρμεγόμενων αγελάδων	200
Ηλικίες αρμεγόμενων	3 – 10 ετών (περίπου το 60% των αρμεγόμενων είναι νεαρά)
Υγειονομικό Καθεστώς	Φυματίωση (+). Βρουκέλωση (+).
Ιστορικό Φυματίωσης	Η εκμετάλλευση βρέθηκε πρώτη φορά θετική στη φυματίωση στις 30.06.2005. Τη χρονιά αυτή οδηγήθηκαν στο σφαγείο 39 θετικά ζώα.

	Το πρόγραμμα εφαρμόζεται στις 07.09.07 όπου εντοπίζονται και σφάζονται 26 θετικά ζώα. Στις 22.06.09 εντοπίζονται και σφάζονται 49 θετικά ζώα. Στις 23.09.13 εντοπίζονται και σφάζονται 71 θετικά ζώα. Από την εφαρμογή του προγράμματος στις 25.02.14 και στις 29.09.14 εντοπίζονται 32 & 34 θετικά ζώα αντίστοιχα τα οποία οδηγούνται στο σφαγείο. Στις 09.06.2015 βρέθηκαν 36 ζώα θετικά ζώα τα οποία σφάζονται. Στις 15.03.16 εντοπίζονται και σφάζονται 16 θετικά ζώα. Το πρόγραμμα εφαρμόστηκε και τα επόμενα έτη στις 09.05.17, στις 20.11.17 και στις 15.05.18 οπού βρέθηκαν θετικά και σφάχθηκαν 17, 75 & 19 ζώα αντίστοιχα.
Ιστορικό Μαστίτιδων	Συχνά (δήλωση κτηνοτρόφου)
Αριθμός δειγμάτων	18 (D1 – D18)

Τα συνολικά 78 δείγματα γάλακτος (20 g/ δείγμα) συλλέχθηκαν και αποθηκεύτηκαν σε ψυχόμενους ισοθερμικούς περιέκτες οι οποίοι μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο σε λιγότερο από 2 ώρες και αποθηκεύτηκαν στους 4 - 6 °C. Στους περιέκτες είχαν προστεθεί παγοκύστεις εξαιτίας των υψηλών θερμοκρασιών που επικρατούσαν κατά την περίοδο της δειγματοληψίας. Η επεξεργασία των δειγμάτων για την απομόνωση DNA διενεργήθηκε εντός 2-4 ημερών από της συλλογής τους.

Η κωδικοποίηση των δειγμάτων γάλακτος που συλλέχθηκαν από τις εκτροφές που συμπεριλήφθηκαν στο σχέδιο δειγματοληψίας, και η ομαδοποίησή τους στο πλαίσιο της περαιτέρω επεξεργασίας τους παρατίθενται στον Πίνακα 7.

Πίνακας 7.. Κωδικοποίηση δειγμάτων - Αποτέλεσμα PCR

Εκτροφή	Εκτροφή / Ιστορικό TST	Αριθμός δειγμάτων που συλλέχθηκαν	Αριθμός δειγμάτων που εξετάσθηκαν	PCR		
				16Sr-RNA	**HSP65**	**Αποτέλεσμα**
A	Έτος ίδρυσης: 1975 Αριθμός αρμεγόμενων αγελάδων: 100 Ιστορικό Φυματίωσης: απαλλαγμένη από το 2012	23	11	5 of 11 45.5%	3 of 11 27.3%	5 of 11 45.5%
B	Έτος ίδρυσης: 2006 Αριθμός αρμεγόμενων αγελάδων: 210 Ιστορικό Φυματίωσης: θετική από το 2016	27	13	9 of 13 69.2%	7 of 13 53.8%	10 of 13 76.9%

c	Έτος ίδρυσης: 2006 Αριθμός αρμεγόμενων αγελάδων: 26 Ιστορικό Φυματίωσης: ποτέ	10	5	0 of 5 0%	0 of 5 0%	0 of 5 0%
D	Έτος ίδρυσης: 2004 Αριθμός αρμεγόμενων αγελάδων: 200 Ιστορικό Φυματίωσης: θετική από το 2014	18	9	3 of 9 33.3%	2 of 9 22.2%	3 of 9 33.3%
Σύνολο						
4	**-**	**78**	**38**	**17** **44.7%**	**12** **31.6%**	**18** **47.4%**

Πίνακας 8: Συνολικά αποτελέσματα ανά εκτροφή

Κωδικός Εκτροφής	16Sr-RNA	HSP65	Αποτέλεσμα
A	5 of 11 45.5%	3 of 11 27.3%	5 of 11 45.5%
B	9 από 13 69.2%	7 από 13 53.8%	10 από 13 76.9%
C	0 από 5 0%	0 από 5 0%	0 από 5 0%
D	3 από 9 33.3%	2 από 9 22.2%	3 από 9 33.3%

3.1.2 Απομόνωση DNA

Τα δείγματα γάλακτος (η = 78) επεξεργάστηκαν στο εργαστήριο ασηπτικά στους 37°C. Για την απομόνωση του DNA χρησιμοποιήθηκε έτοιμο κιτ με την εμπορική ονομασία Nucleospin® Tissue, Macheray - Nagel GmbH & Co. Τα δείγματα υποβλήθηκαν σε επεξεργασία σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Σε κάθε τεχνική απομόνωσης DNA συμπεριλαμβάνονται θετικός και αρνητικός μάρτυρας. Ο θετικός μάρτυρας (C+) αποτελείται από 200 μl εναιωρήματος Mycobacterium spp σε PBS και ο αρνητικός μάρτυρας (C-) αποτελείται από ddH_2O (double distilled).

Ο αριθμός των μαρτύρων DNA που χρησιμοποιήθηκε καθορίστηκε ως αναλογία επί του συνόλου των δειγμάτων που αναλύονταν κάθε φορά, ώστε να μην υπολείπεται του 10% αυτών. Η απομόνωση του DNA και η ανάλυση PCR διεξήχθησαν σύμφωνα με τις απαιτήσεις της προτύπου ποιότητας ISO17025.

3.1.3 Εκτίμηση της ποιότητας του DNA

Η ποιότητα του DNA που απομονώθηκε αξιολογήθηκε ως προς την καθαρότητα και την ακεραιότητα του με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης. Ακολούθησε ανάλυση εικόνας του DNA με τη χρήση του Bio-Rad ChemiDoc XRS + Molecular Imager (Bio-Rad Laboratories Inc., USA) και μέτρηση της οπτικής του πυκνότητας με τη χρήση φασματοφωτόμετρου NanoDrop 8000 (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) στα 260/280 nm.

Η παρουσία αναστολέων της PCR στο δείγμα εκτιμήθηκε μέσω μιας μεθόδου συμβατικής PCR, που εστιάζεται στην ενίσχυση τμήματος του ενδογενούς γονιδίου της ακτίνης (Dowling and Bienzle, 2005)

Για τον έλεγχο επιμολύνσεων των αντιδραστηρίων συμπεριλαμβάνεται κάθε φορά ένας αρνητικός μάρτυρας PCR ($C-_{PCR}$), που περιέχει όλα τα υλικά της μεθόδου, με αντικατάσταση του πρότυπου DNA από ddH_2O, καθώς και ο θετικός (C+) και ο αρνητικός (C-) μάρτυρας της απομόνωσης. Τα δείγματα, για τα οποία η αξιολόγηση της ποιότητας του DNA έδειξε κατακερματισμό, απορρίφθηκαν και η απομόνωση του DNA επαναλήφθηκε από το αρχικό δείγμα.

3.1.4 PCR

Η ανάλυση των προϊόντων DNA, τα οποία απομονώθηκαν από τα δείγματα γάλακτος που συλλέχθηκαν για την ανίχνευση βακτηρίων του γένους *Mycobacterium* έγινε με έναν συνδυασμό δύο μεθόδων PCR σχεδιασμένων για την ανίχνευση επιλεγμένων τμημάτων των γενωμικών περιοχών 16S-rRNA (Rogall et al., 1990), και 65-kDa heat shock protein (hsp65) (Telenti et al., 1993), (Πίνακας 7).

Ένας αριθμός τυχαία επιλεγμένων προϊόντων της PCR, που αντιστοιχούσαν στο 50% των θετικών δειγμάτων, υποβλήθηκε σε ανάλυση αλληλουχίας για την επιβεβαίωση της ειδικότητας της διαδικασίας ενίσχυσης. Διεξήχθη ανάλυση αλληλουχίας σε αμφότερους τους κλώνους χρησιμοποιώντας το BigDye® Cycle Sequencing kit και το ABI PRISM® 377 DNA Sequencer (Thermo Fisher Scientific Inc., U.S.A.). Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν και συγκρίθηκαν με κατατεθειμένες αλληλουχίες στη βάση δεδομένων GenBank χρησιμοποιώντας το Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) του National Center for Biotechnology Information (NCBI).

Πίνακας 8. Η κωδική ονομασία, η ολιγονουκλεοτιδική αλληλουχία των εκκινητών, η περιοχή στόχος, και το μέγεθος του προϊόντος ενίσχυσης των μεθόδων PCR που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση DNA του γένους *Mycobacterium,* σε δείγματα γάλακτος.

Εκκινητές	**Ολιγονουκλεοτιδική Αλληλουχία (5'-3')**	**Περιοχή στόχος**	***Μέγεθος (ζεύγη βάσεων)**	**Βιβλ/κή αναφορά**
MycGenF	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	*16S rRNA*	1500	Rogall *et al.*, 1990
MycGenR	TGCACACAGGCCACAAGGGA			
HspF	ACCAACGATGGTGTGTCCAT	*hsp65*	439	Telenti *et al.*, 1993
HspR	CTTGTCGAACCGCATACCCT			

*Μέγεθος του προϊόντος ενίσχυσης σε ζεύγη βάσεων

3.2 Αποτελέσματα

Το αποτέλεσμα της ανάλυσης των δειγμάτων γάλακτος με PCR αποτυπώνεται στον Πίνακα 7.

Κατά το στάδιο της απομόνωσης DNA και της εκτίμησης της ποιότητάς του, τέσσερα δείγματα για τα οποία προέκυψαν ενδείξεις κατακερματισμού, απορρίφθηκαν και η διαδικασία απομόνωσης επαναλήφθηκε από το αρχικό δείγμα (Εικόνα 1). Για κανένα από τα δείγματα DNA που αναλύθηκαν μέσω PCR για την ενίσχυση γονιδίου της ακτίνης, δεν προέκυψε ένδειξη παρουσίας αναστολέων (Εικόνα 2).

Το συνολικό ποσοστό θετικότητας του συνόλου των δειγμάτων που αναλύθηκαν μέσω PCR για την ανίχνευση βακτηρίων του γένους *Mycobacterium* ήταν 47.7%, και κυμάνθηκε μεταξύ 0% (Εκτροφή Γ) και 76,9% (Εκτροφή Β). Η χαρτογράφηση των προϊόντων ενίσχυσης της PCR,

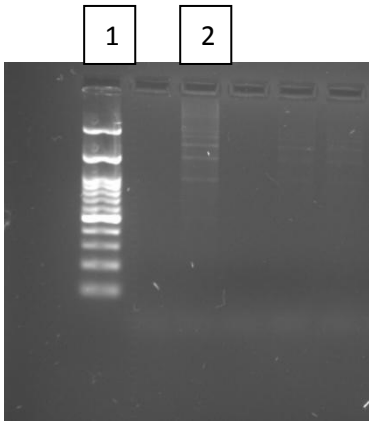
επιβεβαίωσε το αποτέλεσμά της σε όλες τις περιπτώσεις, με ποσοστό ταύτισης άνω του 95% (BLAST, Basic Local Alignment Search Tool).

Η σύγκριση του επιπέδου θετικότητας σε σχέση με κάθε μία από τις δύο PCR αυτής τη μελέτης, υποδεικνύει υψηλότερες αναλογίες για εκείνη τη μέθοδο που στοχεύει στο 16S-rRNA (Rogall et al., 1990), σε σύγκριση με εκείνη που στοχεύει στο hsp65 (Telenti et al., 1993), σε σχέση με τις τρεις εκτροφές για τις οποίες καταγράφηκαν θετικά αποτελέσματα (Εκτροφές Α, Β και Δ).

Εικόνα 1. Ηλεκτροφόρηση προϊόντος απομόνωσης DNA από δείγματα γάλακτος για τον έλεγχο της ποιότητάς του.

Στήλη 1: Δείκτης μοριακών βαρών DNA 100 ζβ.

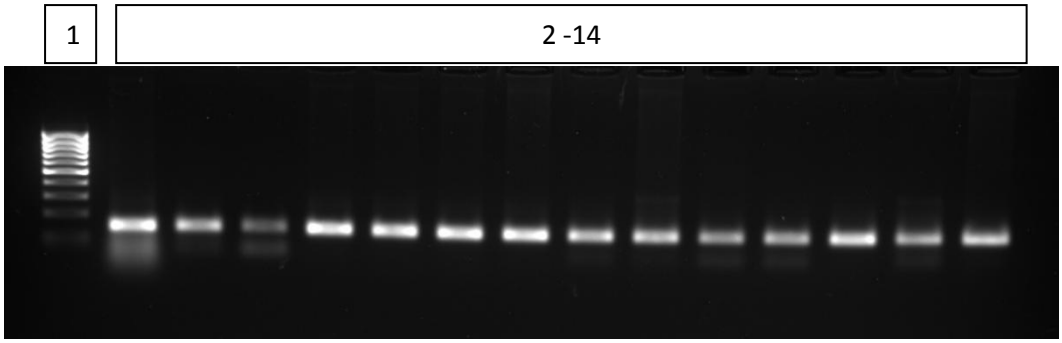
Στήλη 2: Προϊόν DNA στο οποίο διακρίνεται κατακερματισμός (το δείγμα απορρίφθηκε).



Εικόνα 2. Το αποτέλεσμα της ανάλυσης επιλεγμένων δειγμάτων γάλακτος με PCR για την ενίσχυση του γονιδίου της ακτίνης (έλεγχος ύπαρξης αναστολέων PCR).

Στήλη 1: Δείκτης μοριακών βαρών DNA 100 ζβ.

Στήλες 2 -14: Προϊόν DNA μεγέθους 190 ζ.β.



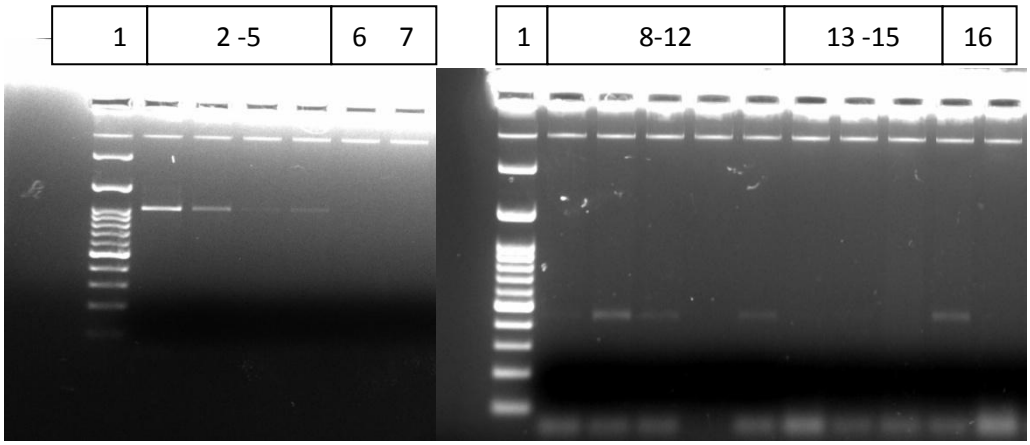
Εικόνα 3. Το αποτέλεσμα της ανάλυσης επιλεγμένων δειγμάτων γάλακτος με PCR (MycGen και Hsp).

Στήλη 1: Δείκτης μοριακών βαρών DNA 100 ζβ.

Στήλες 2 - 5: Προϊόν ενίσχυσης τμήματος του γονιδίου *16Sr-RNA* μεγέθους 1500 ζ.β., (MycGen).

Στήλες 8 - 12: Προϊόν ενίσχυσης τμήματος του γονιδίου *hsp65* μεγέθους 439 ζ.β., (Hsp).

Στήλες 6,7,11,13-15: Δείγματα γάλακτος που αντέδρασαν αρνητικά.



3.3 Συζήτηση

Η δοκιμή του φυματινισμού έχει χρησιμοποιηθεί για δεκαετίες στο πλαίσιο προγραμμάτων ελέγχου της φυματίωσης και θεωρείται επαρκής για τον τακτικό έλεγχο του ζωικού κεφαλαίου, ακόμη και σε περιοχές όπου τα διαθέσιμα μέσα είναι ελάχιστα (Seva et al., 2014; OIE, 2015). Σε πολλές χώρες επιβάλλεται περαιτέρω έλεγχος με συγκεκριμένες εργαστηριακές μεθόδους, σε όλα τα περιστατικά για τα οποία καταγράφεται θετική αντίδραση βάσει της δοκιμής του φυματινισμού. Οι μέθοδοι που συνήθως επιλέγονται για αυτό τον σκοπό, βάσει του εκάστοτε προγράμματος ελέγχου, περιλαμβάνουν συνήθως ορολογικές δοκιμές, χρώση Zhiel-Neelsen σε δείγματα ιστού ή σε επιχρίσματα υλικού που συλλέγεται από υγρές συλλογές, απομόνωση *in vitro* και PCR. Η τελευταία επιλέχτηκε για την παρούσα ερευνητική μελέτη επειδή η αξιολόγηση του αποτελέσματος της PCR δεν επηρεάζεται από την επίκτητη ανοσία, και η ανάλυση των δειγμάτων μπορεί να ολοκληρωθεί εντός μόλις λίγων ορών, ενώ αντιθέτως, για την απομόνωση των μυκοβακτηρίων απαιτείται καλλιέργεια ειδικών θρεπτικών υποστρωμάτων για πολλές εβδομάδες (CLSI, 2008; OIE, 2015).

Το θέμα της επίκτητης ανοσίας, και πιο συγκεκριμένα το διαγνωστικό πρόβλημα της οροθετικότητας ζώων λόγω προηγούμενης έκθεσης τους σε μυκοβακτήρια, θα πρέπει να θεωρείται αναμενόμενο ειδικά σε περιοχές όπου ο επιπολασμός της φυματίωσης είναι υψηλός. Αυτό το πρόβλημα μπορεί να περιπλέξει την αξιολόγηση του αποτελέσματος ορολογικών διαγνωστικών μεθόδων, ακόμη και αναφορικά με είδη μυκοβακτηρίων που είναι ευρέως διαδεδομένα στο περιβάλλον, ιδίως εάν ο σχετικός τίτλος αντισωμάτων δεν παρακολουθείται τακτικά σε βάθος χρόνου (Mugisha et al., 2009; Barry et al., 2011; OIE, 2015). Σε αυτό το πλαίσιο είναι σκόπιμο να αναφερθεί ότι η παραφυματίωση των μηρυκαστικών είναι νόσημα που ενζωοτεί στην Ελλάδα, και προκαλείται από το *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis,* το οποίο αναγνωρίζεται ως αίτιο ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων βάσει της δοκιμής του φυματινισμού (Buddle et al., 2003; Bastida & Juste, 2011).

Αναφορικά με την εργαστηριακή προσέγγιση του θέματος της παρούσας ερευνητικής μελέτης, θα πρέπει να αναφερθεί ότι η διερεύνηση βασίστηκε σε έναν συνδυασμό δύο καλά στοιχειοθετημένων μεθόδων PCR, ειδικά σχεδιασμένων για την ανίχνευση βραδέως αναπτυσσόμενων μυκοβακτηρίων (Rogall et al., 1990; Telenti et al., 1993). Η διαγνωστική επικάλυψη μεταξύ των επιλεγμένων μεθόδων χρησιμοποιήθηκε ως μέσο αύξησης της αξιοπιστίας και της ευαισθησίας της μεθόδου ανίχνευσης,

δεδομένου ότι οι γενωμικές περιοχές που ενισχύονται από αυτές, είναι διαφορετικές. Το τελευταίο θεωρήθηκε ασφαλώς και ως πιθανή αιτία ασυμφωνίας του αποτελέσματος καθεμίας από τις δύο μεθόδους PCR, κάτι που επαληθεύτηκε από την έκβαση της έρευνας. Πιο συγκεκριμένα, αμφότερες μέθοδοι αντέδρασαν θετικά σε 61.1% (11 από 18) του συνόλου των θετικών δειγμάτων. Τα σχετικά αποτελέσματα που καταγράφηκαν για τις εκτροφές Α, Β και Δ ήταν αντίστοιχα 60% (3 από 5), 60% (6 από 10) και 66.7% (2 από 3). Τα δείγματα που αντέδρασαν αρνητικά με αμφότερες μεθόδους PCR αντιστοιχούν στο 73.1% (19 από 26) του συνόλου των αρνητικών δειγμάτων, ενώ τα σχετικά ποσοστά για τις εκτροφές Α, Β, Γ και Δ ήταν αντίστοιχα 75% (6 από 8), 33.3% (2 από 6), 100% (5 από 5) και 85.7% (6 από 7) (Πίνακας 7).

Το σχετικά υψηλότερο ποσοστό θετικότητα μεταξύ των εκτροφών που εντάχθηκαν στην παρούσα μελέτη καταγράφηκε για την Εκτροφή Β (76,9%), ενώ το χαμηλότερο για την Εκτροφή Γ (0%). Θα πρέπει να επισημανθεί ότι το υψηλό ποσοστό θετικότητας που καταγράφηκε σε όλες τις θετικές εκτροφές σχετίζεται άμεσα και με τη διαγνωστική προσέγγιση που ακολουθήθηκε, και πιο συγκεκριμένα με την ηλικία των ζώων που εξετάστηκαν και την τακτική ανάλυσης των δειγμάτων. Αναφορικά με τον πρώτο από αυτούς τους παράγοντες, το γεγονός ότι η δειγματοληψία έγινε επιλεκτικά από τα γηραιότερα ζώα της κάθε εκτροφής, αυξάνει ασφαλώς την πιθανότητα θετικότητας. Η ανάλυση συγχωνευμένων, και όχι μεμονωμένων δειγμάτων, συνεισφέρει επίσης στην υπερεκτίμηση της θετικότητας σε σχέση με την πραγματική, για δύο λόγους. Ο πρώτος είναι ότι ένα δείγμα που προκύπτει από τη συγχώνευση ενός θετικού και ενός αρνητικού, θα αντιδράσει θετικά, ενώ για να χαρακτηριστεί ένα δείγμα ως αρνητικό, θα πρέπει αμφότερα τα συστατικά του μέρη να είναι αρνητικά. Ο δεύτερος λόγος είναι το ελάχιστο όριο ανίχνευσης (ΕΟΑ) της PCR σε σχέση με την ποσότητα του DNA που περιέχεται στα δείγματα που αναλύθηκαν, δεδομένου ότι αυτά στα οποία ο στοχευόμενος αναλύτης περιέχεται σε συγκέντρωση χαμηλότερη του ΕΟΑ θα αντιδράσουν αρνητικά, εάν αναλυθούν μεμονωμένα, ενώ πιθανώς θα αντιδράσουν θετικά εάν συγχωνευτούν (Schisterman & Vexler, 2008; Wang et al., 2014; Ureña-Peralta et al., 2018).

Η ανάλυση συγχωνευμένων δειγμάτων γάλακτος που έχουν συλλεχθεί από τα γηραιότερα ζώα, ασφαλώς δεν είναι δόκιμη για την εκτίμηση του πραγματικού επιπέδου θετικότητας σε επίπεδο εκτροφής. Ωστόσο αυτή η προσέγγιση επελέγη ως πρώιμος διαγνωστικός δείκτης με σκοπό την αύξηση της πιθανότητας ανίχνευσης των

PCR-θετικών ζώων, και συνεπώς των εκτροφών στις οποίες το πρόγραμμα ελέγχου της φυματίωσης θα πρέπει να ενταθεί. Πράγματι, η εκτίμηση του αποτελέσματος της παρούσας μελέτης σε σχέση με το ιστορικό φυματινισμού των εκτροφών που εξετάστηκαν υποδηλώνει την καταλληλόλητα της προτεινόμενης προσέγγισης. Πιο συγκεκριμένα, σε αμφότερες τις εκτροφές που κατά τη διάρκεια του ελέγχου ήταν θετικές στη δοκιμή του φυματινισμού, δηλ. οι Εκτροφές Β και Γ, βρέθηκαν ζώα που αντέδρασαν θετικά στην PCR, ενώ η μόνη εκτροφή με αρνητικό ιστορικό φυματινισμού, δηλ. η Εκτροφή Γ, ήταν αρνητική. Είναι ενδιαφέρον ότι η Εκτροφή Α που ήταν αρνητική βάσει της δοκιμής του φυματινισμού από το 2012, βρέθηκε θετική βάσει της PCR, κάτι που υποδηλώνει ότι η τελευταία αποτελεί έναν διαγνωστικό δείκτη που τουλάχιστον αναφορικά με τη συγκεκριμένη εκτροφή, αποδεικνύεται πιο ευαίσθητος από ότι η δοκιμή του φυματινισμού. Επισημαίνεται ότι πριν το 2012, στη συγκεκριμένη εκτροφή επιβλήθηκε, σε εφαρμογή των σχετικών μέτρων ελέγχου της φυματίωσης των βοοειδών, ολική εκκαθάριση, λόγω του πολύ υψηλού επιπέδου θετικότητας στη δοκιμή του φυματινισμού.

Αν και αυτή η μελέτη δεν σχεδιάστηκε για την ανάδειξη παραγόντων επικινδυνότητας που να σχετίζονται με τη θετικότητα μίας εκτροφής στην PCR, το αποτέλεσμα της διερεύνησης που έγινε υποδηλώνει ότι η θετικότητα βάσει PCR σχετίζεται με το ιστορικό, αλλά όχι με το τρέχον καθεστώς φυματινισμού. Σε ότι αφορά την πρακτικότητα της προτεινόμενης προσέγγισης είναι ίσως σκόπιμο να αναφερθεί ότι η τακτική συλλογή δειγμάτων γάλακτος μπορεί να διενεργηθεί ευκολότερα συγκριτικά με τη δοκιμή του φυματινισμού, δεδομένου ότι δεν είναι επεμβατική και ελαχιστοποιεί την έκθεση του χειριστή σε επικίνδυνους βιολογικούς παράγοντες, όπως είναι τα προσβεβλημένα ζώα ή η PPD. Η ανάλυση συγχωνευμένων δειγμάτων, αντί μεμονωμένων, μειώνει σημαντικά το συνολικό κόστος επιτήρησης, γεγονός που συνάδει με τους οικονομικούς περιορισμούς που αποτελούν τον συνήθη περιοριστικό παράγοντα στην εφαρμογή προγραμμάτων τακτικού ελέγχου του ζωικού κεφαλαίου για λοιμώδη νοσήματα. Επιπλέον, η συλλογή δειγμάτων γάλακτος μπορεί να διενεργηθεί στις τοπικές γαλακτοβιομηχανίες, κάτι που απλοποιεί περαιτέρω τη διαδικασία και μειώνει το κόστος προσωπικού και διακίνησης δειγμάτων, δεδομένου ότι αντιθέτως προς τις εκτροφές, οι γαλακτοβιομηχανίες εδρεύουν συνήθως σε περιοχές στις οποίες η πρόσβαση είναι εύκολη.

Συμπερασματικά μπορεί να υποστηριχθεί ότι η PCR μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση μυκοβακτηρίων σε αναμιγμένα δείγματα γάλακτος που έχουν συλλεχθεί

από τα γηραιότερα ζώα μίας γαλακτοπαραγωγικής μονάδας βοοειδών, ως πρώιμος και ευαίσθητος διαγνωστικός δείκτης. Κάτι τέτοιο θα μπορούσε να λειτουργήσει συμπληρωματικά της TST, και να βελτιώσει την ανίχνευση εκτροφών, στις οποίες ο έλεγχος της βοείου φυματίωση θα πρέπει να εντατικοποιηθεί. Η συγκεκριμένη προσέγγιση έχει και σημαντικά πρακτικά πλεονεκτήματα που αντισταθμίζουν την πρόσθετη οικονομική επιβάρυνση που συνεπάγεται η χρήση της PCR.

Βιβλιογραφία

Barry C, Corbett D, Bakker D, Andersen P, McNair J (2011) The Effect of Mycobacterium avium Complex Infections on Routine Mycobacterium bovis Diagnostic Tests. Vet Med Int 145092. .doi: 10.4061/2011/145092.

Bastida F, Juste RA (2011) Paratuberculosis control: a review with a focus on vaccination. J Immune Based Ther Vaccines 9: 8. doi: 10.1186/1476-8518-9-8.

Borna Müller et al. (2013) Zoonotic *Mycobacterium bovis*–induced Tuberculosis in Humans. Emerg Infect Dis. 2013 Jun; 19(6): 899–908. doi: [10.3201/eid1906.120543]

Buddle BM, McCarthy AR, Ryan TJ, Pollock JM, Vordermeier HM (2003). Use of Mycobacterial peptides and recombinant proteins for the diagnosis of bovine tuberculosis in skin test-positive cattle. Vet Rec 153: 615-620.

Carmen Alicia Daza Bolaños Carolina Lechinski de Paula, Simony Trevizan Guerra, Marília Masello Junqueira Franco, and Márcio Garcia Ribeiro (2013) Diagnosis of mycobacteria in bovine milk Published online 2013 Jan 21. doi: 10.1371/journal.pone.0054253.

Clinical and Laboratory Standards Institute (2008) Laboratory detection and identification of mycobacteria; approved standard—first edition. CLSI document M48-A. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.

Dowling RJO, Bienzle D (2005) Gene-expression changes induced by feline immunodeficiency virus infection differ in epithelial cells and lymphocytes. J Gen Virol 86: 2239–2248. doi: 10.1099/vir.0.80735-0.

Eamonn Gormley and Leigh A. L. Corner, Pathogenesis of *Mycobacterium bovis* Infection: the Badger Model As a Paradigm for Understanding Tuberculosis in Animals

Front Vet Sci. 2017; 4: 247. doi: 10.3389/fvets.2017.00247.

Elodie Barbier, Murielle Rochelet, Laurent Gal, Maria Laura Boschiroli, and Alain Hartmann 2017 PMID: 28448585 doi: [10.1371/journal.pone.0176315].

EFSA, ECDC (2018) The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2017. EFSA Journal 16(12): 5500. doi: 10.2903/j.efsa.2018.5500.

FAO (2015) Strengthening control of bovine tuberculosis at the animal–human–ecosystem interface (available online at: http://www.fao.org/ag/againfo/programmes/en/empres/news_240315.html)

FAO: Strengthening control of bovine tuberculosis at the animal–human–ecosystem interface 2015.

Flora Vayr *(2018)* Occupational exposure to human *Mycobacterium bovis* infection: A systematic review Published: January 16, 2018 https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006208.

J.E. Shitaye, W. Tsegaye, I. Pavlik. Bovine tuberculosis infection in animal and human populations in Ethiopia. Veterinarni Medicina, 52, 2007 (8): 317–332.

List of prokaryotic names with standing in nomenclature, (LPSN bacterio.net).

Margaret Good, Douwe Bakker, Anthony Duignan, and Daniel M. Collins (2018) The History of *In Vivo* Tuberculin Testing in Bovines: Tuberculosis, a "One Health" Issue Front Vet Sci. 2018; 5: 59. doi: 10.3389 / fvets.2018.00059.

Marie-France Humblet, Maria Laura Boschiroli, and Claude Saegerman Classification of worldwide bovine tuberculosis risk factors in cattle: a stratified approach Vet Res. 2009 Sep-Oct; 40(5): 50. doi: 10.1051/vetres/2009033.

Morris RS, Pfeiffer DU, Jackson R. The epidemiology of Mycobacterium bovis infections. Vet Microbiol. 1994 May;40(1-2):153-77.

Mugisha L, Unwin S, van Zijll Langhout M. (2009) Tuberculosis and its control. PASA Primate Veterinary Healthcare Manual, 2nd ed., chapter 4.3.

OIE (2015) Terrestrial Manual: Chapter 2.4.6.-Bovine Tuberculosis (available online at: http://www.oie.int/standard-setting/terrestrial-manual/access-online/).

O'Reilly LM[1], Daborn CJ. The epidemiology of Mycobacterium bovis infections in animals and man. Tuber Lung Dis. 1995 Aug;76 Suppl 1:1-46.

Pérez-Lago L, Navarro Y, Garcia-de-Viedma D (2014) Current knowledge and pending challenges in zoonosis caused by Mycobacterium bovis: a review. Res Vet Sci 97 Suppl: S94-S100. doi: 10.1016/j.rvsc.2013.11.008.

Pesciaroli M, Alvarez J, Boniotti MB, Cagiola M, Di Marco V (2014) Tuberculosis in domestic animal species. Res Vet Sci 97 Suppl: S78-S85. doi: 10.1016/j.rvsc.2014.05.015.

Riojas MA, McGough KJ, Rider-Riojas CJ, Rastogi N, Hazbón MH (2018) Phylogenomic analysis of the species of the Mycobacterium tuberculosis complex demonstrates that Mycobacterium africanum, Mycobacterium bovis, Mycobacterium caprae, Mycobacterium microti and Mycobacterium pinnipedii are later heterotypic synonyms of Mycobacterium tuberculosis. Int J Syst Evol Microbiol 68(1): 324-332. doi: 10.1099/ijsem.0.002507.

Rogall T, Wolters J, Flohr T, Böttger EC (1990) Towards a phylogeny and definition of species at the molecular level within the genus Mycobacterium. Int J Syst Bacteriol 40(4): 323-330. doi: 10.1099/00207713-40-4-323.

Schisterman EF, Vexler A (2008) To pool or not to pool, from whether to when: applications of pooling to biospecimens subject to a limit of detection. Paediatr Perinat Epidemiol 22(5): 486–496. doi: 10.1111/j.1365-3016.2008.00956.x.

Seva J, Sanes JM, Ramis G, Mas A, Quereda JJ (2014) Evaluation of the single cervical skin test and interferon gamma responses to detect Mycobacterium bovis infected cattle in a herd co-infected with Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis. Vet Microbiol 171(1-2): 139-146. doi: 10.1016/j.vetmic.2014.03.035.

Telenti A, Marchesi F, Balz M, Bally F, Böttger EC (1993) Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. J Clin Microbiol 31(2): 175-178.

Ureña-Peralta JR, Alfonso-Loeches S, Cuesta-Diaz CM, García-García F, Guerri C (2018) Deep sequencing and miRNA profiles in alcohol-induced neuroinflammation and the TLR4 response in mice cerebral cortex. Sci Rep 8: 15913. doi: 10.1038/s41598-018-34277-y.

Wang B, Han S-S, Cho C, Han J-H, Cheng Y (2014) Comparison of Microscopy, Nested-PCR, and Real-Time-PCR Assays Using High-Throughput Screening of Pooled Samples for Diagnosis of Malaria in Asymptomatic Carriers from Areas of Endemicity in Myanmar. J Clin Microbiol 52(6): 1838-1845. doi:10.1128/JCM.03615-13.

Wei Yee Wee, Avirup Dutta, and Siew Woh Choo (2017) Comparative genome analyses of mycobacteria give better insights into their evolution,. PLoS One. 2017; 12(3): e0172831. doi: [10.1371/journal.pone.0172831].

WHO, FAO, OIE (2017) Roadmap for zoonotic tuberculosis (available online at: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/259229/9789241513043-eng.pdf?sequence=1).

WHO (2018) The challenges of preventing bovine tuberculosis. Bull World Health Organ 96(2): 82-83. doi: 10.2471/BLT.18.020218.

World Organisation for Animal Health OIE: One Health "at a glance" 2018.

Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων Ελλάδας, Έκθεση ΠΟΕΣΕ 2016 (available online at: *http://www.minagric.gr/images/stories/docs/politis/Trofima_Ygeia/poese_2016.pdf.*