

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΙΑΤΡΙΚΟ ΤΜΗΜΑ**

ΤΟΜΕΑΣ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΑΚΤΗΡΙΟΛΟΓΙΑΣ ΠΑΡΑΣΙΤΟΛΟΓΙΑΣ ΖΩΟΝΟΣΩΝ ΚΑΙ
ΓΕΩΓΡΑΦΙΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

Διευθυντής Καθηγητής Ιωάννης Τσελέντης

**ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΗ ΕΡΕΥΝΑ ΤΟΥ ΠΥΡΕΤΟΥ Q (C.BURNETTI) ΣΤΟΝ ΖΩΙΚΟ
ΚΑΙ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟ ΠΛΗΘΥΣΜΟ ΤΗΣ ΚΥΠΡΟΥ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΤΟΥ
ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΜΗΧΑΝΟΓΡΑΦΗΜΕΝΗΣ ΧΑΡΤΟΓΡΑΦΗΣΗΣ**

ΦΕΙΔΙΑ ΛΟΥΚΑΪΔΗ

Κτηνίατρος

Διδακτορική Διατριβή

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Ιατρικό Τμήμα της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Κρήτης δε σημαίνει και αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η μελέτη αυτή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βακτηριολογίας, Παρασιτολογίας και Ζωονόσων του Ιατρικού Τμήματος του Πανεπιστημίου Κρήτης σε συνεργασία με τα Κτηνιατρικά Εργαστήρια του Τμήματος Κτηνιατρικών Υπηρεσιών της Κύπρου από το 1994 μέχρι το 1999 με την καθοδήγηση του Καθηγητή κ. Τσελέντη Ιωάννη.

Στην πραγματοποίηση της διατριβής αυτής έχουν βοηθήσει οι παρακάτω τους οποίους θερμότατα ευχαριστώ:

Τον Πανεπιστημιακό Δάσκαλο Καθηγητή κ. Τσελέντη Ιωάννη για το σχεδιασμό και την οργάνωση της παρούσας μελέτης, για την απεριόριστη προσφορά του στην επιστημονική μου κατάρτιση, το αμέριστο ενδιαφέρον και τη συνεχή παρακολούθηση της προσπάθειάς μου, τις πολύτιμες συμβουλές του και γενικά την πολύπλευρη βοήθειά του κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της διδακτορικής μου διατριβής.

Το φίλο μου Χατζηχριστοδούλου Χρήστο για την ουσιαστική συμβολή του στον τομέα της επιδημιολογίας και της μηχανογραφημένης χαρτογράφησης καθώς επίσης και την ηθική συμπαράσταση που μου παρείχε.

Τον κ. Οικονομίδη Παύλο, Διευθυντή των Κτηνιατρικών Υπηρεσιών, που αφενός με την παρότρυνσή του αφετέρου με την αποδοχή του μέρους της εργασίας να διεξαχθεί στα εργαστήρια του Τμήματος που προΐσταται με έχει ενισχύσει σημαντικά.

Τη στενή συνεργάτιδα κ. Ψαρουλάκη Άννα για τη συνεργασία στον εργαστηριακό τομέα.

Τη σύζυγό μου Κίκα και τα παιδιά μου Μαρίνα και Χρήστο για την πολλαπλή προσφορά και συμπαράστασή τους.

ΣΥΝΤΟΜΟ ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

Γεννήθηκα στο Φτερικόδι της Επαρχίας Λευκωσίας της Κύπρου την 1^η Ιουνίου 1945. Το Δεκέμβριο του 1970 αποφοίτησα από την Κτηνιατρική Σχολή του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης. Μετεκπαιδεύτηκα στο Μαξιμιλιανό Πανεπιστήμιο του Μονάχου Γερμανίας για περίοδο 10 μηνών στο θέμα των Ασθενειών των Νεογέννητων Ζώων. Για το ίδιο θέμα μετεκπαιδεύτηκα για περίοδο ενός μηνός στο Istituto Zooprofylattico Sperimentale στην Πρέσια της Ιταλίας και επίσης για περίοδο ενός μηνός στο Royal Veterinary School του Πανεπιστημίου του Λονδίνου της Αγγλίας.

Από το 1971 μέχρι σήμερα εργάζομαι στις Κτηνιατρικές Υπηρεσίες του Υπουργείου Γεωργίας Φυσικών Πόρων και Περιβάλλοντος της Κυπριακής Δημοκρατίας. Κατά τη διάρκεια της υπηρεσίας μου αυτής έχω εργαστεί σαν κλινικός Κτηνίατρος, σαν υπεύθυνος

λειτουργός της Χοιροπαθολογίας και σαν Υπεύθυνος Εργαστηρίων των Κτηνιατρικών Υπηρεσιών.

Υπήρξα εθνικός συντονιστής του δικαιοτικού προγράμματος του UNDP-FAO για τη διερεύνηση των ασθενειών των νεογέννητων ζώων και υπό το συντονισμό του Καθηγητή κ. Ιωάννη Τσελέντη εθνικός συντονιστής του Ευρωπαϊκού Προγράμματος για τη διερεύνηση των Ρικετσιώσεων στην Κύπρο. Στο πρόγραμμα αυτό έγινε συνεργασία με την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Κρήτης και την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Μασσαλίας.

Ανακοινώσεις

1. Οικονομίδης Π, Λουκαΐδης Φ, Χατζηχριστοδούλου Χ, Γιαννάκης Α, Κουρουκλάρη Μ, Μούστρος Γ, Λοϊζίδης Ε, Περικλέους Π, Παπασάββα-Στυλιανού Π, Χατζησάββας Θ, Τσελέντης Ι. Επιδημιολογική διερεύνηση του Μεσογειακού Κηλιδοβλατιδώδους πυρετού στην Κύπρο: 22^ο Ετήσιο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο. Μάιος 1996
2. Loukaides F, Hadjichristodoulou Ch, Maniatis Y, Psaroulaki A, Babalis T, Spyridaki I, Economides P, Tselentis Y. Serological and Molecular Epidemiology of Mediterranean Spotted Fever in Cyprus. 4th Scientific Meeting of the European Society of Chemotherapy. May 1996
3. Ψαρουλάκη Α, Λουκαΐδης Φ, Μανιατάς Ι, Σπυριδάκη Ι, Χατζηχριστοδούλου Χ, Ζερβός Ε, Χατζηπαναγής Α, Τσελέντης Ι. Ανίχνευση και τυποποίηση Ρικετσιακών Στελεχών. 22^ο Ετήσιο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο. Μάιος 1996
4. Psaroulaki A., Hadjichristodoulou Ch., Loukaides F., Spyridaki I., Tselentis Y. Seroepidemiological survey of Murine typhus in the island of Cyprus. FEMS' 98 Supported Meeting 16-18 September 1998. Athens, Greece
5. Psaroulaki A., Spyridaki I., Hadjichristodoulou Ch., Loukaides F., Tselentis Y. Identification of rickettsiae from 1888 ticks collected from 50 regions of FEMS'98 Supported Meeting 16-18 September 1998. Athens, Greece
6. Loukaides F., Psaroulaki A., Spyridaki I., Hadjichristodoulou Ch., Tselentis Y. Coxiella burnetii in ticks, goats, sheep and humans in Cyprus. Detection isolations and molecular identification of six strains. EUWOG-ASR (American Society for Rickettsiology) Joint Meeting. Marseilles France, 14-16 June, 1999

Άρθρα

1. Detection and Identification of the etiological agent of Mediterranean Spotted Fever (MSF) in two genera of ticks in Cyprus. Psaroulaki A., Loukaides F., Hadjichristodoulou Ch., Tselentis Y. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene (1999)**93**:597-598

2. Isolation of *Coxiella burnetii* by a configuration shell-vial Assay from ticks, collected in Cyprus: Detection by “nested” PCR and Identification by PCR-RFLP. Spyridaki I., Psaroulaki A., Loukaides F., Hadjichristodoulou Ch., Tselentis Y. Amer. J. Trop. Med and Hygiene (submitted)

Βραβευμένες εργασίες

Απονομή επαίνου καλύτερης εργασίας του Συνεδρίου από την Ιατρική Εταιρεία Αθηνών στη θεματική ενότητα Εφαρμοσμένη Έρευνα για την ερευνητική εργασία «Ανίχνευση και Τυποποίηση Ρικετσιακών Στελεχών σε κρότωναes από την Κύπρο με την Τεχνική PCR-RFLP». 22^ο Ετήσιο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο. Μάιος 1996.

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

Ευχαριστίες	2
Σύντομο βιογραφικό σημείωμα	3
Ανακοινώσεις	3
Άρθρα	4
Βραβευμένες εργασίες	5
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	
Εισαγωγή	10
Ιστορική αναδρομή	12
Κατάταξη	13
Ταξινόμηση και φυλογενετική της <i>Coxiella burnettii</i>	15
<u>Φαινοτυπική ταξινόμηση</u>	15
Οικολογικοί χαρακτήρες	15
Μορφολογικοί και καλλιεργητικοί χαρακτήρες	15
Αντιγονικοί χαρακτήρες	15
<u>Μοριακή ταξινόμηση</u>	16
Ανάλυση των αλληλουχιών της υπομονάδας 16S του ριβοσωμικού RNA (16S r RNA)	17
Ανάλυση στο σύνολο γονιδιώματος με την επίδραση περιοριστικών ενζύμων	18
Μορφολογία	20
Φυσικά χαρακτηριστικά	20
Πολλαπλασιασμός και ενδοκυττάρια αύξηση	21
Ο λιποπολυσακχαρίτης (ΛΠΣ)	22
Μεταβολή φάσης του ΛΠΣ	22
Γενετική	23
Πλασμιδιακό DNA	23
Οικολογία	26
Επιδημιολογία	26
Τρόποι μετάδοσης της νόσου	
Μετάδοση δια μέσου της αναπνευστικής οδού (εισπνοή μολυσμένων κόνεων – μικροσταγονιδίων)	30
Μετάδοση δια μέσου της γαστρεντερικής οδού	31
Μετάδοση της νόσου στο εργαστήριο	31
Διαδερμική αιματογενής μετάδοση	32
Μετάδοση της νόσου από άνθρωπο σε άνθρωπο	32
Γεωγραφική κατανομή του πυρετού Q	33
ΕΥΡΩΠΗ	33
Ελλάδα	33
Μεγάλη Βρετανία	33
Βόρειος Ιρλανδία	34
Ισπανία	34
Γαλλία	37
Ιταλία	38
Γερμανία	38
Ελβετία	39
Άλλες Ευρωπαϊκές χώρες	39
ΒΟΡΕΙΟΣ ΑΜΕΡΙΚΗ	
Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής	39
Καναδάς	40
ΚΕΝΤΡΙΚΗ ΑΜΕΡΙΚΗ	40

ΝΟΤΙΟΣ ΑΜΕΡΙΚΗ	40
ΑΦΡΙΚΗ	40
ΑΣΙΑ	41
ΩΚΕΑΝΙΑ	
Αυστραλία	42
Παθογένεια και λοιμογόνος δράση	
Λοιμογόνος ικανότητα στον άνθρωπο	43
Λοιμογόνος ικανότητα στα ζώα	43
Σε κυτταρική καλλιέργεια	44
Αντίσταση στη φαγοκυττάρωση	44
Μορφολογική μελέτη και το κυτταροπαθογενετικό φαινόμενο	44
Παθογόνοι βακτηριακοί παράγοντες	47
Ο λιποπολυσακχαρίτης επιφανείας (ΛΠΣ)	47
Το πλασμιδιακό DNA	48
Ανοσία και λοιμογόνος δύναμη	49
Ενδαγγειακό έδαφος και λοιμογόνος ισχύς	51
Ανοσία	51
Κυτταρική ανοσία	51
Χυμική ανοσία	51
Κλινικά σημεία	52
Βιολογικά σημεία	52
Παθολογοανατομικά ευρήματα	53
Διάγνωση	53
Ορολογική διάγνωση	54
Απομόνωση και καλλιέργεια των στελεχών της <i>C.burnettii</i>	55
Ανίχνευση και ταυτοποίηση των στελεχών της <i>C.burnettii</i>	
Άμεση ανίχνευση	57
Μοριακή ανίχνευση και ταυτοποίηση της <i>coxiella burnettii</i>	57
Γονιδιακή ανίχνευση με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)	58
Θεραπεία	59
Ευαισθησία στα αντιβιοτικά	60
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	
Εισαγωγή	62
Ιστορικό του πυρετού Q στην Κύπρο	63
Μεθοδολογία	72
Μέθοδος της μηχανογραφημένης χαρτογράφησης	76
Μεθοδολογία χαρτογράφησης	78
Γλώσσα προγραμματισμού – μηχανογραφικό υλικό	78
Μηχανογραφημένη χαρτογράφηση της Κύπρου σε επίπεδο επαρχίας (Master.exe)	80
ΠΡΩΤΗ ΦΑΣΗ	88
Οροεπιδημιολογική μελέτη ανθρώπινου πληθυσμού	
Δειγματοληψία από ανθρώπινο πληθυσμό	89
Οροεπιδημιολογική μελέτη ζωικού πληθυσμού	
Δειγματοληψία από ζώα	94
Ανίχνευση της <i>C.burnettii</i> σε κρότωνα	97
Εργαστηριακές εξετάσεις πρώτης φάσης	98
Εργαστηριακά πρωτόκολλα	
Έμμεσος ανοσοφθορισμός (Indirect immunofluorescence)	98
Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) και nested PCR στην ανίχνευση της <i>C.burnettii</i> σε buffy coat και κρότωνα	100
Εφαρμογή της shell-vial technique στην απομόνωση της <i>C.burnettii</i> από buffy coat από αίμα και από κρότωνα	102
Buffy coat	102

Αιμόλεμπος	102
Σώμα κρότωνα	103
Θριψινοποίηση των θετικών shell-vials	103
Επιβεβαίωση της ύπαρξης της <i>C.burnettii</i> σε κυτταρικές σειρές με τη χρώση Gimenez	104
ΔΕΥΤΕΡΗ ΦΑΣΗ	106
Οροεπιδημιολογική μελέτη σε ανθρώπους και ζώα σε περιοχές υψηλού κινδύνου	106
Μηχανογραφημένη χαρτογράφηση μικρής περιοχής (Analysis.exe)	109
ΤΡΙΤΗ ΦΑΣΗ	113
Καταχώρηση και ανάλυση των αποτελεσμάτων	113
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	115
<u>Φάση πρώτη</u>	
Οροεπιδημιολογική μελέτη ανθρώπινου πληθυσμού	116
Παράγοντες κινδύνου	118
Οροεπιδημιολογική μελέτη ζωικού πληθυσμού	129
Παράγοντες κινδύνου για ορροθετικότητα	130
Ανίχνευση <i>C.burnettii</i> σε κρότωνα	137
Εφαρμογή μηχανογραφημένης χαρτογράφησης σε επίπεδο χώρας	
<u>Φάση δεύτερη</u>	
Οροεπιδημιολογική μελέτη σε ανθρώπους και ζώα σε περιοχές υψηλού κινδύνου	140
Παράγοντες κινδύνου ορροθετικότητας στον ανθρώπινο πληθυσμό των περιοχών υψηλού κινδύνου	143
Συμπτώματα	145
Παράγοντες κινδύνου ορροθετικότητας στον ζωικό πληθυσμό των περιοχών υψηλού κινδύνου	146
Ενισχυμένη επιτήρηση πυρετού Q στις περιοχές υψηλού κινδύνου	147
<u>Φάση Τρίτη</u>	
Ενισχυμένη επιτήρηση πυρετού Q σε όλη την Κύπρο	149
Συζήτηση	151
Περίληψη	163
Βιβλιογραφία	166

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο πυρετός Q οφείλεται στην *Coxiella burnettii*, ένα υποχρεωτικά ενδοκυττάριο, Gram αρνητικό παθογόνο βακτήριο που ζει στα φαγολυσσοσώματα των κυττάρων του ξενιστή. Είναι μία ζωνοσός διαδεδομένη σε όλο τον κόσμο (108). Ο άνθρωπος μολύνεται με την εισπνοή μολυσμένης σκόνης, με τη βρώση μη παστεριωμένου γάλακτος και τυριών καθώς και με το χειρισμό μολυσμένων υλικών (103).

Η πρώτη περιγραφή της νόσου έγινε από τον Derrick (40). Η *Coxiella burnettii* παρουσιάζει μεγάλη φαινοτυπική και κλινική πολυμορφία. Η νόσος μπορεί να εμφανιστεί με οξεία ή χρόνια μορφή. Η οξεία μορφή εκδηλώνεται ως ψευδογριπώδης συνδρομή, αυτοπεριοριζόμενο εμπύρετο άγνωστης αιτιολογίας, πνευμονία, κοκκιωματώδης ηπατίτιδα ή ως λοίμωξη του ΚΝΣ. Η χρόνια μορφή της νόσου μπορεί να εκδηλωθεί ως ενδοκαρδίτιδα (σε έδαφος βαλβιδοπάθειας, προσθετική βαλβίδα κλπ.) ή ως οστεομυελίτιδα (116,181,164,129).

Οι ξενιστές της *Coxiella burnettii* στη φύση είναι τα αιγοπρόβατα, τα βοοειδή αλλά και οι γάτες, τα τσιμπούρια, τα τρωκτικά κ.α. (15,96).

Η *Coxiella burnettii* βρίσκεται στο γάλα, στα ούρα, στα κόπρανα και στα λόχεια των μολυσμένων ζώων χωρίς να υπάρχει κλινικά εμφανής λοίμωξη σε αυτά (14).

Ο μικροοργανισμός είναι εξαιρετικά ανθεκτικός στους φυσικούς και χημικούς παράγοντες και μπορεί να επιζήσει για πολλά χρόνια διατηρώντας αναλλοίωτη τη λοιμογόνο του δράση, ένας μόνο μικροοργανισμός μπορεί να προκαλέσει λοίμωξη (148).

Η εργαστηριακή διάγνωση της *Coxiella burnettii* γίνεται με ορολογικές μεθόδους. Αντισώματα εναντίον της φάσης I και εναντίον της φάσης II μπορούν να ανιχνευτούν με διάφορες μεθόδους. Τις δύο προηγούμενες δεκαετίες η μέθοδος εκλογής ήταν αυτή της συγκόλλησης του συμπληρώματος (CF). Σήμερα οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται περισσότερο είναι ο έμμεσος ανοσοφθορισμός (IFAT) και η μέθοδος ELISA (44,138,203).

Η *Coxiella burnettii* μπορεί να καλλιεργηθεί σε αυγά εμβρύου κότας, σε ινοβλάστες εμβρύου ποντικού, σε μακροφάγα like καρκινικές σειρές κυττάρων κ.α. (164,129).

ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ

Το 1937, ο DERRICK (40) διερευνά μια άγνωστη πυρετική λοίμωξη που προσέβαλε 20 εργάτες από τους 800 των σφαγείων της Brisbane, στο Queensland της Αυστραλίας. Λόγω της απουσίας προφανούς αιτιολογίας και συνήθους λοιμογόνου παράγοντα, ονομάζει την ασθένεια “πυρετό Q” που σημαίνει Query Fever (query = να αναζητηθεί). Τον ίδιο χρόνο οι BURNET και FREEMAN (29) απομονώνουν, από ένα δείγμα που τους έστειλε ο DERRICK, τον υπεύθυνο παράγοντα που ταυτοποιείται σαν ρικέτσια και την ονομάζουν *Rickettsia burnettii*. Η τελευταία θα απομονωθεί επίσης από τους κρότωνες *Haemophysalis humerosa* από τους SMITH & DERRICK (40). Σχεδόν ταυτόχρονα, το 1938, οι DAVIES και COX (37) ενώ ερευνούν επιδημιολογικά τον κηλιδώδη πυρετό των Βραχωδών Ορέων, απομονώνουν από έναν κρότωνα στην Montana, τον *Dermacentor andersoni*, ένα λοιμογόνο παράγοντα που ονομάζουν *Rickettsia diaporica*, λόγω της ικανότητάς του να διαπερνά τους πόρους των βακτηριακών φίλτρων. Η συσχέτιση ανάμεσα σε αυτή τη ρικέτσια και τον πυρετό Q έγινε κατά τη διάρκεια μιας έξαρσης κρουσμάτων στο προσωπικό του εργαστηρίου που ερχόταν σε επαφή με το μικροοργανισμό (47). Αυτή η λοίμωξη παρουσίαζε μεγάλη κλινική ομοιότητα με τον πυρετό Q που είχε περιγράψει ο DERRICK.

Η παγκοσμιότητα της κατανομής της ασθένειας αποδείχθηκε κατά τη διάρκεια του Β΄ Παγκοσμίου Πολέμου, όταν πολλές επιδημίες προσέβαλαν το συμμαχικό στρατό στην Ιταλία (31) και το γερμανικό στην Ελλάδα (32,33). Από τις πρώτες επιδημιολογικές μελέτες γίνονται αντιληπτές οι ιδιότητες του μικροοργανισμού. Οι κρότωνες δεν παίζουν τον κύριο ρόλο στη μετάδοση, η οποία γίνεται είτε αερογενώς ή τροφογενώς (γάλα), γεγονός που υποδηλώνει τη μεγάλη αντοχή του μικροοργανισμού στο εξωτερικό περιβάλλον. Το 1948, αποσαφηνίζονται κλινικές, επιδημιολογικές και βακτηριολογικές ιδιαιτερότητες, και οδηγούν τον PHILIP (125) να προτείνει τη δημιουργία ενός νέου βακτηριακού γένους, της *Coxiella*, που περιλαμβάνει μόνο ένα είδος, την *Coxiella burnettii*.

Η ασθένεια Q Fever έχει αναφερθεί για πρώτη φορά στην Κύπρο το 1951 από τους Kalrpan και Bertagna (1955) όταν ανακάλυψαν αντισώματα στην εκτροπή συμπληρώματος της *Coxiella burnettii* σε 24 από τα 60 πρόβατα (40%) και σε 11 από τις 31 αίγες (35%). Ταυτόχρονα, ύποπτα περιστατικά Q Fever στους ανθρώπους αναφέρθηκαν από το Τμήμα Ιατρικών Υπηρεσιών. Το αναλυτικό ιστορικό του πυρετού Q στην Κύπρο αναλύεται στο ειδικό μέρος της παρούσας εργασίας.

ΚΑΤΑΤΑΞΗ

Η διάκριση της *Coxiella burnettii* από το γένος *Rickettsia*, έγινε από τον PHILIP το 1948, και έχει σήμερα επιβεβαιωθεί από τη διαφορά G+C% του DNA και από την ανάλυση της

υπομονάδας 16S του ριβοσωματικού RNA (194). Η οικογένεια των *Rickettsiaceae* χωρίζεται σε 3 ομάδες:

- *Rickettsiaceae*
- *Ehrlichia*
- *Wolbachia*

Η ομάδα των *Rickettsiaceae* περιλαμβάνει 3 ξεχωριστά γένη:

- *Rickettsiaceae*
- *Rochalimaea*
- *Coxiella*

Το γένος *Coxiella* αντιπροσωπεύεται από ένα μόνο είδος:

- *Coxiella burnettii*

Πίνακας 1. ΘΕΣΗ ΤΗΣ *COXIELLA BURNETTII* ΣΤΗΝ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΤΩΝ RICKETTSIACEAE

Οικογένεια	Φυλή	Γένος	Ομάδα	Είδος
Rickettsiaceae	Rickettsiae	Rickettsia	Typhus	R.prowazekii R.typhi R.canada
			Boutonneux	R.bellii R.rickettsii R.siberica R.conorii R.parkeri R.australis R.akari R.montana R.rhipicephali R.slovaca R.helvetica
			Scrub-typhus	R.tsutsugamushi
		Rochalimaea	R.quintana R.vinsoni	
	Coxiella		C.burnetti	
	Ehrlichiae	Ehrlichia		E.canis E.phagocytophilia E.sennetsu
			Cowdria Neorickettsia	C.ruminantum
	Wolbachiae	Wolbachia		W.pipientis W.melophagi W.persica
			Rickettsiella	R.popilliae R.grylli R.chironomi

ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΚΑΙ ΦΥΛΟΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΗΣ *COXIELLA BURNETTII*

Ταξινόμηση και φυλογενετική της *Coxiella burnettii*

Φαινοτυπική ταξινόμηση

Η αρχική ταξινόμηση έγινε κυρίως φαινοτυπικά, με βάση μορφολογικούς, καλλιεργητικούς, οικολογικούς, αντιγονικούς χαρακτήρες .

Η σημερινή ταξινόμηση των Ρικετσιών, όπως παρουσιάζεται στο εγχειρίδιο Συστηματικής Βακτηριολογίας του Bergey (πίνακας 1), βασίζεται αποκλειστικά σε φαινοτυπικούς χαρακτήρες. Παρόλα αυτά, η αυστηρά ενδοκυττάρια θέση τους έχει σαν αποτέλεσμα οι ρικέτσιες να εκφράζουν πολύ λίγους αναγνωρίσιμους φαινοτυπικούς χαρακτήρες και επομένως αυτή η ταξινόμηση είναι πολύ περιληπτική, και δεν είναι σήμερα ακριβής.

Οικολογικοί χαρακτήρες

Η *Coxiella* διακρίνεται από τα βακτήρια του γένους *Rickettsia* από την απουσία αρθροπόδων -μεταβιβαστών (124).

Μορφολογικοί και καλλιεργητικοί χαρακτήρες

Η *Coxiella burnettii* έχει μία μοναδική θέση ανάμεσα στις ρικέτσιες καθώς είναι η μόνη που πολλαπλασιάζεται στο εσωτερικό του φαγολυσοσώματος.

Αντιγονικοί χαρακτήρες

Η ανάλυση των πρωτεϊνικών προφίλ επιτρέπει να επαναταξινομήσουμε κάποια στελέχη της *Coxiella burnettii* (67).

Μοριακή ταξινόμηση

Αρχικά, η βακτηριακή ταξινόμηση βασιζόταν σε ομοιότητες ή διαφορές των φαινοτυπικών χαρακτηριστικών. Τα μεγαλύτερα μειονεκτήματα αυτού του ταξινομικού συστήματος ήταν το ότι δεν μπορούσε κανείς να διακρίνει δύο επιφανειακά ίδιους οργανισμούς, ούτε να

καθορίσει τις φυλογενετικές σχέσεις ανάμεσα στα διαφορετικά βακτήρια (186). Το 1965, ο Zuckerklandl και ο Pauling χρησιμοποιούν στην ταξινόμηση μόρια (τα πιο χρήσιμα από αυτά ονομάζονται “semantides”) τα οποία φέρουν πληροφορίες γονιδίων ή των προϊόντων μεταγραφής (DNA, RNA ή πολυπεπίδια) (204). Στη συνέχεια, οι τεχνικές καθορισμού της αλληλουχίας των νουκλεϊκών οξέων (144,145) επέτρεψαν την εκτεταμένη χρήση των μοριακών αλληλουχιών παράλληλα με εκείνες της υβριδοποίησης DNA-DNA στις φυλογενετικές και ταξινομικές μελέτες.

Αναπτύχθηκαν επίσης τεχνικές εκτίμησης γενετικών αποστάσεων και σχηματισμοί φυλογενετικών δένδρων (56,59). Έτσι, κατά τη διάρκεια των 10 τελευταίων χρόνων, η συσσώρευση και η διαθεσιμότητα των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών σε τράπεζες δεδομένων φαίνεται να είναι μία πραγματική επανάσταση στη φυλογενετική και τη μοριακή ταξινόμηση. Σήμερα είναι παραδεκτό ότι η βάση της βακτηριακής φυλογενετικής πρέπει να είναι μια συγκριτική ανάλυση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών, γεγονός που αποδεικνύεται αποδοτικότερο από την απλή συστηματική ανάλυση που βασίζεται στους μορφολογικούς, βιοχημικούς και ανοσολογικούς χαρακτήρες (197,199).

Η δυνατότητα μίας τέτοιας συγκριτικής ανάλυσης των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών βασίζεται σε δύο βασικές παραμέτρους:

- ♦ Η έκταση των αλληλουχιών είναι τεράστια, πράγμα που δίνει τη δυνατότητα (με προϋπόθεση να διαλέγει κανείς μία αλληλουχία αρκετά εκτεταμένη) της εξελικτικής σύγκρισης στη διαμόρφωση μίας δεδομένης αλληλουχίας.
- ♦ Οι αλλαγές που συμβαίνουν σε μία γενετική αλληλουχία έχουν τάση να γίνονται τυχαία μέσα στο χρόνο. Έτσι, κάποια γονίδια είναι πραγματικά “χρονόμετρα” της εξέλιξης. Οι πληροφορίες που περιέχονται σε αυτό το “εξελικτικό ρολόι” μπορούν να εξαχθούν με συγκριτική ανάλυση των αλληλουχιών των νουκλεϊνικών οξέων.

Στη μοριακή φυλογένεση έχουν χρησιμοποιηθεί τα τελευταία χρόνια τα μόρια του ριβοσωμικού RNA τα οποία όπως έχει αποδειχθεί είναι πραγματικά τα πιο ισχυρά “χρονόμετρα” και αυτό γιατί:

- Το μόριο του ριβοσωμικού RNA ανήκει σε ένα μεγάλο μοριακό σύμπλεγμα που είναι κεφαλαιώδες για τις λειτουργίες του κυττάρου, πράγμα που σημαίνει ότι δεν μπορεί να μεταφερθεί ανάμεσα σε είδη (149) και έτσι η φυλογενετική του μορίου του ριβοσωμικού RNA είναι αντιπροσωπευτική της φυλογενετικής του συνόλου του οργανισμού.

- Το μόριο του ριβοσωμικού RNA έχει πολύ σταθερή λειτουργία σε σχέση με άλλα μακρομόρια. Κατά συνέπεια, οι “μη χρονομετρικές” αλλαγές της αλληλουχίας (για παράδειγμα αυτές που θα ήταν επιλεκτικές και που θα διατάρασσαν τη φυλογενετική ανάλυση) είναι ανύπαρκτες. Αυτό το χαρακτηριστικό κάνει το ριβοσωμικό RNA ένα, ιδιαίτερα ακριβές, εξελικτικό “χρονόμετρο” (200,202).

Ανάλυση των αλληλουχιών της υπομονάδας 16S του ριβοσωμικού RNA (16S r RNA)

Αρχικά, η φυλογενετική ανάλυση των αλληλουχιών του ριβοσωμικού RNA ήταν περιορισμένη σε μια μερική προσέγγισή τους (μέθοδος της σειράς των ολιγονουκλεοτιδίων) (60) και είχαν περιγραφεί αποτυπώματα ολιγονουκλεοτιδίων ικανά να καθορίσουν το μεγαλύτερο μέρος των υποδιαιρέσεων ανάμεσα στα βακτήρια (200,202). Το 1985 ο WOESE επιδεικνύει ενδιαφέρον να αναλύσει το σύνολο του ριβοσωμικού DNA προκειμένου να κατατάξει αυτές τις υποδιαιρέσεις, γεγονός που επιτρέπει να τεθεί σε λειτουργία ένα πολύ ακριβές και αποτελεσματικό χρονομετρικό μοντέλο (199)

Αυτές οι μοριακές εργασίες σχετικά με τη φυλογενετική και τη μοριακή ταξινόμηση των ρικετσιών περιλαμβάνουν μία αρχική ταξινόμηση των στελεχών σε γονότυπους και την ανάλυση ενός μόνο στελέχους της *Coxiella burnettii* με τη μέθοδο ανίχνευσης της αλληλουχίας της υπομονάδας 16S του ριβοσωμικού RNA.

Στη διεθνή αλληλογραφία μόνο μία δημοσίευση θέτει τη φυλογενετική θέση της *Coxiella burnettii* σε σχέση με τις άλλες ρικέτσιες. Οι συγγραφείς καθορίζουν την αλληλουχία του 16S rRNA από 6 στελέχη *Rickettsia*, όπου κάθε στέλεχος είναι αντιπροσωπευτικό ενός είδους της οικογένειας των *Rickettsiaceae*: *Rickettsia Rickettsii*, *Rickettsia prowazekii*, *Rickettsia typhi*, *Ehrlichia risticii*, *Wolbachia persica* και *Coxiella burnettii*. Παρατηρούμε λοιπόν μία φυλογενετική ποικιλία των *Rickettsiaceae*. Στην πραγματικότητα, οι τρεις αντιπρόσωποι του γένους *Rickettsia* ομαδοποιούνται εκ νέου στην υποδιαίρεση Α των αμιγών βακτηρίων. Η *Ehrlichia risticii* ανήκει επίσης στην υποδιαίρεση Α αλλά παρουσιάζει μία σχετική απόσταση σε σχέση με τους αντιπροσώπους του γένους *Rickettsia*. Σε αντίθεση, η *Wolbachia persica* και η *Coxiella burnettii* ανήκουν στην υποδιαίρεση Γ στην οποία η *Coxiella burnettii* βρίσκεται ομαδοποιημένη, με τρόπο τελείως απρόσμενο, με το είδος *Legionella* (192).

Ανάλυση στο σύνολο γονιδιώματος με την επίδραση περιοριστικών ενζύμων

Η ανάλυση των προφίλ κατατομής των τμημάτων του DNA, ύστερα από επίδραση με μία ενδονουκλεάση υψηλής συχνότητας κατάτμησης επιτρέπει να ταξινομήσουμε τα στελέχη της *Coxiella burnettii* από ακάρεα, ζώα και ανθρώπους σε 6 γονοτύπους (76). Η παραπάνω ταξινόμηση συμφωνεί με την ταξινόμηση απομονωθέντων στελεχών με βάση την ανάλυση με ηλεκτροφόρηση σε παλμικό πεδίο (74). Τα στελέχη που συνήθως απομονώνονται στο χρόνιο πυρετό Q ανήκουν στους δύο από τους έξι γονότυπους. Είναι σημαντικό να υπενθυμίσουμε ότι η συλλογή των στελεχών που αναλύθηκε είναι μικρή και ότι τα αποτελέσματα αυτά είναι πολύ προκαταρκτικά για να μπορέσουν να επεκταθούν στο σύνολο των στελεχών της *Coxiella burnettii*.

ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ

- Η *Coxiella burnettii* είναι ένας υποχρεωτικά ενδοκυττάριος μικρός βάκιλλος πλάτους 0,2-0,4 μm και μήκους 0,4-1 μm, εξαιρετικά πολύμορφος, που παρουσιάζει δομή ανάλογη με τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια και ο οποίος αναπτύσσεται αποκλειστικά μέσα στο φαγολυσόσωμα του κυττάρου-ξενιστή.

ΦΥΣΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

Η *Coxiella burnettii* παρουσιάζει πολύ μεγάλη θερμοανθεκτικότητα. Αντέχει 1 ώρα στους 60° C και 30 λεπτά στους 70° C και παραμένει ζωντανή σε καλλιέργειες για δύο χρόνια μετά από κατάψυξη στους -20° C. Η αντοχή της σε χημικούς παράγοντες είναι εξίσου αξιοσημείωτη και συγκρίνεται με εκείνη των σπορογόνων βακτηρίων. Η *Coxiella burnettii* είναι ανθεκτική σε πολλά αντισηπτικά (φορμόλη 15%, φαινόλη, υποχλωριώδες Na 0,5%). Αντίθετα στον αέρα, το χλωροφόρμιο 5% και την αλκοόλη 70° είναι ευαίσθητη (152).

Πάντα σε σχέση με τη σπορογονία, η αντίσταση του μικροοργανισμού στο εξωτερικό περιβάλλον του επιτρέπει να επιβιώνει 7 με 10 μήνες στο μαλλί, σε θερμοκρασία 15° με 20° C, περισσότερο από ένα μήνα στο κατεψυγμένο κρέας και πάνω από 40 μήνες στο άπαχο γάλα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (34).

Το βακτήριο παρουσιάζει ιδιαίτερα αυξημένο μεταβολισμό σε χαμηλό pH, φτάνοντας το μέγιστο μεταβολισμό του σε pH 4,5 γεγονός το οποίο εξηγεί την προσαρμογή του στο φαγολυσόσωμα (68).

ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ ΚΑΙ ΕΝΔΟΚΥΤΤΑΡΙΑ ΑΥΞΗΣΗ

Ο πολλαπλασιασμός της *C. burnettii* είναι αυστηρά ενδοκυττάριος και για αυτό δεν κατέστη δυνατή η καλλιέργειά της σε θρεπτικά υλικά ελεύθερα κυττάρων.

Η *Coxiella burnettii* διεισδύει μέσω της φαγοκυττάρωσης, στη συνέχεια τα φαγολυσοσώματα συντήκονται με τα λυσοσώματα και σχηματίζουν τα φαγολυσοσώματα και τα κενοτόπια στο εσωτερικό των οποίων αναπτύσσεται ο παθογόνος μικροοργανισμός. Στη συνέχεια, όλα τα φαγολυσοσώματα συντήκονται για να σχηματίσουν ένα και μοναδικό φαγολυσόσωμα, το οποίο καταλαμβάνει πρακτικά όλο το κυτταρόπλασμα. Η *Coxiella burnettii* πολλαπλασιάζεται μέσα στο φαγολυσόσωμα χωρίς να επιδρά στην ανάπτυξη του κυττάρου ξενιστή.

Η *C. burnettii* μπορεί να καλλιεργηθεί:

- **με ενοφθαλμισμό σε πειραματόζωα.** Έχουν χρησιμοποιηθεί ινδικά χοιρίδια και ποντίκια. Ο ενοφθαλμισμός γίνεται συνήθως ενδοπεριτοναϊκά
- **σε εμβρυοφόρα αυγά όρνιθας** με ενοφθαλμισμό του παθολογικού υλικού στη μεμβράνη του εμβρυοφόρου σάκου,
- **σε κυτταρικές σειρές.** Χρησιμοποιούμενες κυτταρικές σειρές είναι τα:
 1. He1 (Human embryonic lung) που είναι διπλοειδή κύτταρα μορφής ινοβλαστών, (164,129)
 2. L929 ακτινοβολημένα κύτταρα του ποντικού
 3. Vero επιθηλιακά νεφρικά κύτταρα πιθήκου

Ο ΛΙΠΟΠΟΛΥΣΑΚΧΑΡΙΤΗΣ (ΛΠΣ)

Η αντιγονική μεταβολή του ΛΠΣ διαφοροποιεί την *Coxiella burnettii* από τις άλλες ρικέτσιες.

Στη φύση, η *Coxiella burnettii* εκφράζει αποκλειστικά τα αντιγόνα της φάσης I (αντισώματα της φάσης Smooth), τα οποία οφείλονται στο λιποσακχαρίτη (ΛΠΣ) της μεμβράνης και καλύπτουν τα αντιγόνα της φάσης II. Η φάση I είναι μολυσματική, καθώς τα αντιγόνα της έχουν αντιφαγοκυτταρικές ιδιότητες. Η φάση II (αντίστοιχη με τη φάση Rough) αποκτάται μετά από ανακαλλιέργειες σε εμβρυοφόρα αυγά (10 με 100 ανακαλλιέργειες). Η αντιστροφή προς τη φάση I είναι δυνατή με ενοφθαλμισμό σε ινδικά χοιρίδια (25,168).

Ο λιποπολυσακχαρίτης (ΛΠΣ) των δύο αυτών φάσεων δεν είναι ο ίδιος και φαίνεται να εμπλέκεται στη λοιμογόνο ισχύ της *Coxiella burnettii*. Ο ΛΠΣ της φάσης I δεν επιτρέπει τη σύνδεση του κλάσματος C3 του συμπληρώματος σε αντίθεση με τον ΛΠΣ της φάσης II. Λιποπολυσακχαρίτες με διαφορετική δομή έχουν συσχετιστεί με τις κλινικές μορφές του πυρετού Q (101).

Μεταβολή φάσης του ΛΠΣ

Έχει αποδειχθεί ότι η αλλαγή φάσης της *Coxiella burnettii*, είναι μία αντιγονική τροποποίηση στη σύνθεση του ΛΠΣ παρόμοια με τις αλλαγές στο “smooth - rough” που παρατηρούνται στα Εντεροβακτηριοειδή (7). Έχει παρατηρηθεί μια απλή ποσοτική τροποποίηση (η φάση I περιείχε περισσότερους λιποπολυσακχαρίτες από τη φάση II), που δεν φαίνεται να είναι η μοναδική αιτία της αλλαγής φάσης. Στην πραγματικότητα, η δομή του ΛΠΣ στα βακτήρια της φάσης II είναι παρόμοια με εκείνη των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων του τύπου “rough”. Αντίθετα, ο ΛΠΣ της φάσης I αποτελείται από σπάνια σάκχαρα (150). Οι μελέτες του ΛΠΣ με ηλεκτροφόρηση φαίνεται να επιβεβαιώνουν τα παραπάνω δεδομένα. Η μετανάστευση του ΛΠΣ της φάσης II είναι ομοιογενής και παρόμοια με εκείνη του ΛΠΣ “rough” των εντεροβακτηριοειδών. Αντίθετα, η μετανάστευση του ΛΠΣ της φάσης I περιλαμβάνει το λιγότερο έξι ευδιάκριτες ζώνες του ΛΠΣ “smooth” της σαλμονέλλας (45).

ΓΕΝΕΤΙΚΗ

Η γονιδιακή ανάλυση της *Coxiella burnettii* έχει περιοριστεί σε λίγα στελέχη (Nine Mile φάση I, Nine Mile φάση II, Priscilla, Dugwaynd Q212) προερχόμενα κυρίως από χρόνιες μορφές της νόσου.

Μέχρι σήμερα, έχουν κλωνοποιηθεί τα παρακάτω γονίδια της *Coxiella burnettii*:

- ◆ το γονίδιο που κωδικοποιεί την κιτρική συνθεάση (73)
- ◆ τρία γονίδια που κωδικοποιούν τα αντιγόνα επιφάνειας (71,114)
- ◆ ένα γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη του shock στη ζέστη (115)

ένα γονίδιο που κωδικοποιεί τη δισμουτάση του υπεροξειδίου της *Coxiella burnettii*

Πλασμιδιακό DNA

Μερικά στελέχη *Coxiella burnettii* φέρουν πλασμίδια

Το πρώτο πλασμίδιο που βρέθηκε στο στέλεχος Nine Mile φάση I (αρθρόποδα, Montana, USA) ονομάστηκε **QpH₁** και έχει μέγεθος 36 kb, πυκνότητα 1,61 g/mm³ σε διάλυμα χλωριούχου καισίου και σε 1 έως 3 αντίγραφα ανά βακτήριο (142). Το δεύτερο πλασμίδιο ονομάστηκε **QpRS** (99,113), και βρέθηκε σε ζωικό υλικό (πλακούντα αποβολής προβάτου) επονομαζόμενο Priscilla αλλά και από 4 ασθενείς με χρόνια ενδοκαρδίτιδα. Διαθέτει σημαντικές ομοιότητες με το QpH₁ αλλά έχει μέγεθος 39 kb. Το τρίτο πλασμίδιο που βρέθηκε σε στελέχη απομονωθέντα από άγρια τρωκτικά (Dunway in Utah, USA) (169) έχει μέγεθος περίπου 51 kb και ονομάζεται **QpDG** (από το στέλεχος Dugway). Όπως αναλύεται σε επόμενο κεφάλαιο, από κάποιους ερευνητές υποστηρίζεται ότι υπάρχει συσχέτιση ανάμεσα στον τύπο του πλασμιδίου με την οξεία ή χρόνια νόσο (53).

Σε τέσσερα ανθρώπινα στελέχη αποδείχθηκε ότι η πλασμιδιακή ακολουθία QpRS ήταν ενσωματωμένη στο χρωμοσωμιακό DNA (147).

Ξεκινώντας από την υπόθεση ότι υπάρχει σχέση ανάμεσα στον τύπο της νόσου στον άνθρωπο (πυρετός Q οξείας ή χρόνιας μορφής) και στον πλασμιδιακό τύπο (143), αμερικανοί συγγραφείς περιέγραψαν ειδικά γονίδια για κάθε πλασμίδιο. Στη συνέχεια, προτάθηκε ότι αυτές οι ειδικές αλληλουχίες κωδικοποιούν ειδικές λειτουργίες οι οποίες είναι υπεύθυνες για ειδικούς λοιμογόνους παράγοντες που καθορίζουν την εξέλιξη προς οξεία ή προς χρόνια μορφή της νόσου. Έτσι ο MINNICK και οι συνεργάτες του κλωνοποίησαν και καθόρισαν την αλληλουχία του γονιδίου CbbE ειδικό για το πλασμίδιο QpRS. Αυτό το γονίδιο έχει 1485 ζεύγη βάσεων και κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη επιφάνειας περίπου 55 KDa, η οποία ονομάζεται E'. Αυτοί οι συγγραφείς προτείνουν επίσης τη χρησιμοποίηση είτε της αλληλουχίας του ειδικού DNA, είτε της αντίστοιχης πρωτεΐνης σε διαγνωστικές δοκιμασίες, ώστε να ανιχνευθούν τα στελέχη της *Coxiella burnettii* που είναι υπεύθυνα για τις χρόνιες μορφές του πυρετού Q (114). Ένα χρόνο αργότερα, ο ίδιος συγγραφέας περιγράφει το ειδικό γονίδιο CbhE του πλασμιδίου QpH₁. Αυτό το γονίδιο έχει 1022 ζευγάρια βάσεων και κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη περίπου 42 KDa της οποίας οι λειτουργίες δεν είναι γνωστές. Υβριδισμοί με το συνολικό DNA 6 στελεχών της *Coxiella burnettii* δείχνουν ότι αυτό το γονίδιο δε βρίσκεται σε στελέχη υπεύθυνα για τον οξύ πυρετό Q (115).

Η σύγχρονη γονοτυπική κατάταξη της *Coxiella burnettii* σε έξι στελέχη βασίστηκε από τη μία μεριά στη γονιδιακή ομάδα (ανάλυση των περιοριστικών πολυμορφισμών με ηλεκτροφόρηση σε παλμικό πεδίο) και από την άλλη μεριά στον πλασμιδιακό τύπο (94).

Καθορίστηκε έτσι μία συσχέτιση ανάμεσα στον τύπο της νόσου στον άνθρωπο (οξεία η χρόνια μορφή) και στον πλασμιδιακό τύπο (143).

ΟΙΚΟΛΟΓΙΑ

Η *Coxiella burnettii* είναι ένας μικροοργανισμός που ενδημεί σε όλες τις χώρες του κόσμου (193). Τα αρθρόποδα που προσβάλλονται συχνότερα είναι οι κρότωνες (*Amblyoma*, *Dermacentor*, *Ornithodoros*, *Rhipicephalus*).

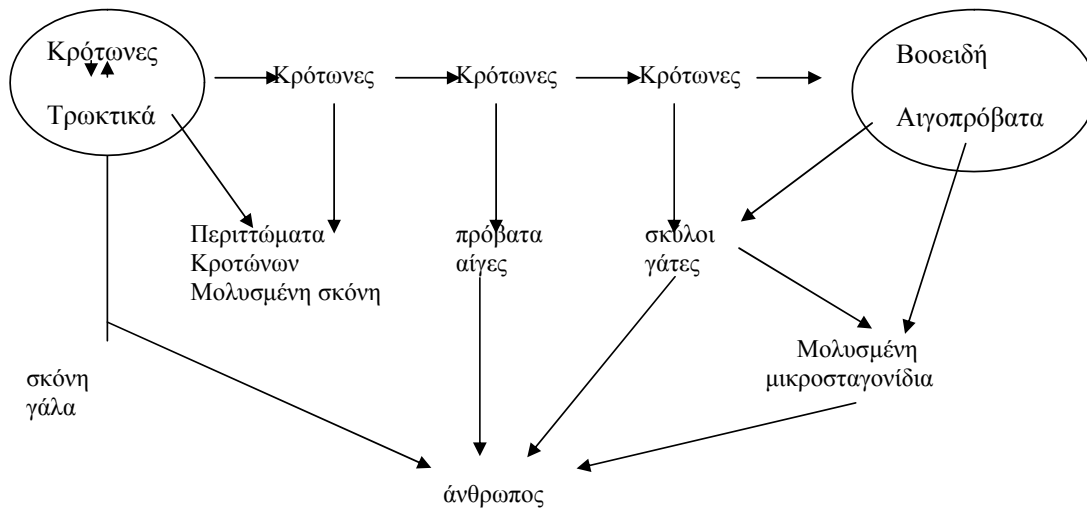
Το βακτήριο μπορεί να απομονωθεί από τα κατοικίδια ζώα και ιδιαίτερα από τα αιγοπρόβατα και τα βοοειδή, αλλά επίσης από τη γάτα και το σκύλο. Στα ζώα η νόσος είναι ασυμπτωματική και επιφέρει στο θηλυκό το οποίο μολύνεται, πρόωρο τοκετό και μικρό βάρος γέννησης. Τα ζώα αποβάλλουν το βακτηρίδιο στο περιβάλλον τους με τα κόπρανα, τα ούρα, το γάλα αλλά κυρίως με τα προϊόντα του τοκετού.

ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

Η *Coxiella burnettii* είναι ένα μικρόβιο που ανευρίσκεται σε ολόκληρο τον κόσμο και η επίπτωση της νόσου διαφέρει στις διάφορες γεωγραφικές περιοχές.

Οι ξενιστές της *Coxiella burnettii* στη φύση είναι οι κρότωνες, τα τρωκτικά, τα άγρια και κατοικίδια ζώα και ο άνθρωπος.

ΣΧΗΜΑΤΙΚΗ ΑΛΥΣΙΔΑ ΛΟΙΜΩΞΗΣ ΑΠΟ *COXIELLA BURNETTII* (D.ΑΙΤΚΕΝ et al: Review of Q fever)



Οι κύκλοι συμβολίζουν τις φυσικές δεξαμενές του μικροοργανισμού (μεταφορά της νόσου από τους κρότωνες και ανεξάρτητα από αυτούς μέσω των βοοειδών). Με τις πράσινες γραμμές σημειώνεται ο κύριος τρόπος μετάδοσης με μολυσμένη σκόνη ή με μικροσταγονίδια.

Οι κρότωνες - κοινώς τσιμπούρια (*Dermacentor marginatus*) - παραμένουν μολυσμένοι σε ολόκληρη τη διάρκεια της ζωής τους και μεταφέρουν τον μικροοργανισμό στα ζώα και στον άνθρωπο. Μέσα στον κρότωνα η *Coxiella burnetii* πολλαπλασιάζεται σε πολύ υψηλούς τίτλους και περισσότεροι από 10^{10} μικροοργανισμοί ανευρίσκονται στα κόπρανα πειραματικά μολυσμένων τσιμπουριών. Σε αποξηραμένα κόπρανα κροτώνων, ο μικροοργανισμός παραμένει ζωντανός σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για τουλάχιστον ένα έτος. Φαίνεται ότι οι κρότωνες αποτελούν τη φυσική δεξαμενή της νόσου, την οποία μεταδίδουν στη συνέχεια σε κατοικίδια ζώα, κυρίως αιγοπρόβατα, βοοειδή, σκύλους, γάτες κ.α., τα οποία μολύνονται είτε με δείγμα από τσιμπούρι, είτε άμεσα από επαφή με μολυσμένα περιττώματα.

Φαίνεται ότι υπάρχει και ένας κύκλος, ο οποίος είναι ανεξάρτητος από τσιμπούρια σε κατοικίδια ζώα και αφορά κυρίως αιγοπρόβατα και βοοειδή.

Σε μερικές χώρες της Ευρώπης, εκτός από τα αιγοπρόβατα, υπάρχει αυξημένη επίπτωση της νόσου κατά τα τελευταία χρόνια και στα βοοειδή. Περισσότερο από το 80% των βοοειδών και αιγοπροβάτων με προβλήματα γονιμοποίησης βρέθηκαν μολυσμένα από το μικροοργανισμό.

Η *Coxiella burnetii* πολλαπλασιάζεται ταχέως στον πλακούντα και το αμνιακό υγρό των ζώων και κατά τη διάρκεια του τοκετού μολύνει το έδαφος με μεγάλες ποσότητες του

μικροβίου. Λόγω δε της μεγάλης του ανθεκτικότητας σε φυσικούς και χημικούς παράγοντες δημιουργείται μια πολύ μολυσματική σκόνη, η οποία μεταφερόμενη μπορεί να μολύνει ανθρώπους και ζώα.

Η *Coxiella burnettii* ανευρίσκεται επίσης στο γάλα, σε υψηλούς τίτλους μεγαλύτερους από 10^5 /ml. Σε γαλακτοκομικά προϊόντα από μη παστεριωμένο γάλα η *Coxiella* παραμένει ζωντανή για περισσότερο από 2 μήνες.

Αδέσποτα σκυλιά και γάτες μπορεί να μολυνθούν από κρότωναes ή από βρώση μολυσμένου πλακουντιακού υλικού. Στη συνέχεια ο μικροοργανισμός περνά από τον πεπτικό τους σωλήνα και με τα περιττώματα μολύνεται το έδαφος, με αποτέλεσμα να συντηρείται ένας κύκλος ανεξάρτητος από τους κρότωναes, με μεγαλύτερη επίπτωση της νόσου την εποχή της γέννας των ζώων (2).

Άλλος τρόπος μόλυνσης στα ζώα είναι η σεξουαλική μετάδοση της νόσου, η οποία έχει επιβεβαιωθεί σε ποντίκια (94).

Υπάρχουν πολλές οροεπιδημιολογικές μελέτες οι οποίες δείχνουν την αυξημένη επίπτωση της νόσου, κυρίως σε κατοικίδια ζώα. Σε δύο οροεπιδημιολογικές μελέτες στην Ελβετία το 29% των γατιών και το 45% των σκύλων βρέθηκαν φορείς της *Coxiella burnettii*, ενώ σε μία άλλη μελέτη στη Γερμανία βρέθηκαν φορείς το 13% των σκύλων και το 26% των γατιών. Πουλιά, κυρίως σπουργίτια, έχουν βρεθεί μολυσμένα ενώ έχει αναφερθεί επίσης η μόλυνση και σε ψάρια (2).

Ο άνθρωπος μολύνεται με μικροσταγονίδια ή μολυσμένη σκόνη, που εισέρχονται από την αναπνευστική οδό ή ακόμη και με τη βρώση μολυσμένη γάλακτος και γαλακτοκομικών προϊόντων (17). Έχει επίσης αναφερθεί μετάδοση της νόσου από άνθρωπο σε άνθρωπο, όπως η περίπτωση γυναίκας με οξεία νόσο η οποία μετέδωσε τη νόσο κατά τη διάρκεια του τοκετού στο μαιευτήρα, πιθανόν με μικροσταγονίδια δια μέσου της αναπνευστικής οδού, καθώς επίσης και η μετάδοση της νόσου με μετάγγιση αίματος (66).

Η κλινική εικόνα της νόσου στον άνθρωπο, διαφέρει στα διάφορα μέρη του κόσμου με αποτέλεσμα αλλού να είναι επικρατέστερη η ηπατίτιδα, σε άλλη περιοχή ο πυρετός αγνώστου αιτιολογίας και αλλού η πνευμονία (143), γεγονός που μπορεί να οφείλεται:

- στη διαφορετική οδό μόλυνσης
- στην ποσότητα του μικροοργανισμού που ενέχεται στη λοίμωξη
- στην πλασμιδιακή διαφορά των στελεχών
- στο αμυντικό σύστημα του ξενιστή

Στην Αυστραλία για παράδειγμα, η συχνότερη μορφή της νόσου είναι ένα αυτοπεριοριζόμενο εμπύρετο (59), στη Γαλλία και τον Καναδά η ηπατική νόσος (180), ενώ στη Σκωτία και Ελβετία η πνευμονική μορφή της νόσου (44,110).

ΤΡΟΠΟΙ ΜΕΤΑΔΟΣΗΣ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ

Μετάδοση δια μέσου της αναπνευστικής οδού (εισπνοή μολυσμένων κόνεων-μικροσταγονιδίων)

Ο συχνότερος τρόπος μετάδοσης της νόσου είναι η εισπνοή από το αναπνευστικό μολυσμένων μικροσταγονιδίων (Aerosols). Η σχέση ποσότητας των εισπνεομένων μικροοργανισμών προς το χρόνο επώασης έχει αποδειχθεί σε πειραματόζωα και σε ανθρώπους (εθελοντές) (174).

Στα πειραματόζωα η έκθεση σε 10^5 μολυσματικούς μικροοργανισμούς ακολουθείται από χρόνο επώασης 7 ημερών, σε αντίθεση με τις 13 ημέρες μετά από έκθεση σε 10 μικροοργανισμούς (174).

Τα ίδια αποτελέσματα έχουν επιβεβαιωθεί σε ασθενείς που απέκτησαν τη νόσο μετά από έκθεση σε πλακουντιακό υλικό γάτας κατά τη διάρκεια του τοκετού. Η περίοδος επώασης διήρκησε 7-30 ημέρες και σχετίζεται με τη μικρότερη ή μεγαλύτερη επαφή με το πλακουντιακό υλικό (111).

Ο πυρετός Q είναι επαγγελματική νόσος και προσβάλλει κυρίως αγρότες, κτηνοτρόφους και κτηνιάτρους σε άμεση επαφή με μολυσμένα ζώα, κυρίως κατά τη διάρκεια του τοκετού. Υποκλινική νόσος μπορεί να ενεργοποιηθεί σε κυοφορούντα αιγοπρόβατα, τα οποία αποβάλλουν την *C. burnettii* με τα ούρα και τα κόπρανα. Ανιχνεύεται επίσης στο αίμα και το αμνιακό υγρό. Ο πλακούντας μπορεί να περιέχει περισσότερους από 10^{12} μικροοργανισμούς/g. Η μεταφορά της μολυσμένης σκόνης με σταγονίδια μεταδίδει τη νόσο, ενώ δείγματα μολυσμένου αέρα βρέθηκαν σε μεγάλες αποστάσεις από τον τόπο όπου γεννούν τα ποίμνια (77) με αποτέλεσμα την πρόκληση επιδημιών. Στην Ελβετία περισσότεροι από 350 άνθρωποι προσβλήθηκαν από τη νόσο, με κύριο κοινό χαρακτηριστικό ότι διέμεναν σε ένα δρόμο που χρησιμοποιούσαν οι κτηνοτρόφοι για τη μεταφορά των ποιμνίων προς τα βουνά.

Η μεταφορά μολυσμένης σκόνης από κτηνοτροφικές περιοχές μπορεί να προκαλέσει τη νόσο σε πολύ μεγάλες αποστάσεις, ακόμα και σε πόλεις (141). Αλλά η νόσος μπορεί να μεταδοθεί και από γάτες προσβεβλημένες κατά τη διάρκεια του τοκετού, όπου αποβάλλουν μεγάλο αριθμό μικροοργανισμών (123).

Η έκθεση μπορεί να συμβεί ακόμη και με μολυσμένα ρούχα όπως σε εργάτες πλυντηρίου που εμφάνισαν πυρετό Q (119).

Μετάδοση δια μέσου της γαστρεντερικής οδού

Πολλές μελέτες συνηγορούν για προσβολή δια μέσου του γαστρεντερικού συστήματος με τη βρώση μολυσμένων τροφών, κυρίως μη παστεριωμένου γάλακτος και γαλακτοκομικών προϊόντων.

Σήμερα, η μετάδοση της νόσου δια μέσου του γαστρεντερικού έχει γίνει σπάνια εξαιτίας της παστερίωσης των γαλακτοκομικών προϊόντων (81,98,104).

Μετάδοση της νόσου στο εργαστήριο

Υπάρχουν αρκετές βιβλιογραφικές αναφορές μετάδοσης της νόσου σε ερευνητές στο εργαστήριο από μολυσμένα υλικά, προερχόμενα κυρίως από πρόβατα.

Ανάμεσα στα έτη 1938-1955, 226 ερευνητές ανέπτυξαν λοίμωξη από *Coxiella burnettii* (30,158), ενώ μεταξύ 1950-1965 οι Jonson and Kardull (85) περιέγραψαν 50 περιπτώσεις πυρετού Q σε εργαστήριο. Ο Christopher Hall και συν. το 1981, περιγράφουν μία επιδημία Q fever σε εργαστήριο με προσβολή 28 ατόμων, η οποία αποδόθηκε σε κυοφορούν πρόβατο, το οποίο χρησιμοποιείτο για αναπνευστικές μελέτες των νεογνών. Το μεγαλύτερο ποσοστό των νοσούντων είχε έρθει σε επαφή άμεση ή έμμεση με τον τοκετό, αλλά υπήρξαν και περιπτώσεις λοίμωξης σε άτομα που είχαν έρθει σε επαφή με το πρόβατο σε άλλα τμήματα του εργαστηρίου, εκτός από την αίθουσα όπου επήλθε ο τοκετός (69).

Διαδερμική αιματογενής μετάδοση

Η διαδερμική μετάδοση της νόσου αποδείχθηκε σε 29 εθελοντές Πορτογάλους, οι οποίοι ανέπτυξαν τη νόσο μετά από ενδοδερμική ένεση μολυσματικού υλικού (49). Η μετάδοση της νόσου δια μέσου του δέρματος οφείλεται κυρίως στους κρότωνα (τσιμπούρια) (52).

Έχει αναφερθεί επίσης μετάδοση της νόσου με μετάγγιση αίματος.

Μετάδοση της νόσου από άνθρωπο σε άνθρωπο

Η μετάδοση της νόσου από άνθρωπο σε άνθρωπο είναι πολύ σπάνια, και κατά συνέπεια δεν κρίνεται απαραίτητο να λαμβάνονται μέτρα προφύλαξης κατά την επαφή με άτομα που νοσούν. Στη βιβλιογραφία αναφέρονται όμως μερικές περιπτώσεις μετάδοσης της νόσου, είτε με ενδοοικογενειακή διασπορά είτε μετά από επαφή με άτομα που νοσούν (50,70).

Η άμεση μετάδοση της νόσου από άνθρωπο που νοσεί στον οικογενειακό του κύκλο, στηρίζεται κυρίως σε υποθέσεις με βάση την ορομετατροπή που παρατηρείται στο οικογενειακό περιβάλλον. Σε μία μελέτη εννέα Πολωνοί βοσκοί που εργάζονταν στην Ισπανία μετέδωσαν τη νόσο στις συζύγους των μετά την επιστροφή τους στη χώρα τους, ενώ όλα τα άλλα μέλη της οικογένειας παρέμειναν οροαρνητικοί. Το βακτήριο απομονώθηκε στα ούρα και στο προστατικό έκκριμα των νοσούντων, ενώ ανιχνεύθηκε επίσης κολλημένο και στα σπερματοζωάρια, γεγονός που συνηγορεί υπέρ της σεξουαλικής μετάδοσης της νόσου (95).

ΓΕΩΓΡΑΦΙΚΗ ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΤΟΥ ΠΥΡΕΤΟΥ Q

Από τις αναφορές εξάγεται το συμπέρασμα ότι η νόσος έχει εντοπιστεί σε ολόκληρο τον κόσμο. Οι Karlan και Betragua (81) έχουν περιγράψει το 1955 για πρώτη φορά την γεωγραφική κατανομή της *C. burnettii* το 1988.

Ευρώπη

Η επίπτωση της νόσου στην Ευρώπη είναι υψηλή, κυρίως στις Μεσογειακές χώρες. Στη Γαλλία, ο οροεπιπολασμός νόσου είναι υψηλότερος σε ορισμένες περιοχές όπως η Μασσαλία 4,03%, ενώ σε ένα χωριό στις Άλπεις βρέθηκε στο 30%. Στην Ιταλία, σε ορισμένες περιοχές η επίπτωση φθάνει στο 6,1%, ενώ ακόμη υψηλότερη είναι η επίπτωση στην Ισπανία όπου σε ορισμένες αγροτικές περιοχές πλησιάζει το 15,4%, ενώ στις αστικές το 8,8% και στη χώρα των Βάσκων κυμαίνεται από 5,4-30,2%. Τέλος, στην Ελβετία σε ορισμένες αστικές περιοχές η επίπτωση προσεγγίζει το 11% και η κλινική μορφή της νόσου που επικρατεί είναι της άτυπης πνευμονίας.

Ελλάδα

Είναι γνωστή η ύπαρξη της νόσου στον Ελλαδικό χώρο από τον δεύτερο παγκόσμιο πόλεμο, κατά τη διάρκεια του οποίου είχαν ξεσπάσει επιδημίες πυρετού Q σε στρατιώτες στην Ελλάδα και την Ιταλία. Την ίδια εποχή, ο Καμμινόπετρος μελέτησε και απομόνωσε την *Coxiella burnettii* (180), αλλά έκτοτε δεν υπάρχουν αναφορές της νόσου στον Ελλαδικό χώρο, εκτός από την οροεπιδημιολογική μελέτη των Τσελέντη και συν (1995) (181).

Μεγάλη Βρετανία

Η νόσος είναι ενδημική σε ολόκληρη την Αγγλία και Ουαλία. Από το 1967 έως το 1974, περίπου 59 περιπτώσεις πυρετού Q καταγράφηκαν ανά έτος. Το 1975 παρουσιάστηκε έξαρση κρουσμάτων με 104 περιπτώσεις, καθώς επίσης και το 1976 με 114 κρούσματα και το 1977 με 98 περιπτώσεις.

Στη μελέτη του Plymouth μεταξύ 1972-1988 (από τις περιοχές στο νοτιοδυτικό Devon με πληθυσμό 425.000 κατοίκους και το ανατολικό Cornwall με 91.000 κατοίκους αντίστοιχα) γίνεται αναφορά σε 103 ορολογικά επιβεβαιωμένες περιπτώσεις, εκ των οποίων 46 ήταν οξείες, 5 χρόνιες ενώ 52 είχαν παλιά λοίμωξη. Λεπτομερής αναφορά γίνεται σε 61 περιπτώσεις, εκ των οποίων οι 46 ήταν οξείες μορφές της νόσου, οι 5 χρόνιες ενώ στους υπόλοιπους 10 δεν ήταν δυνατό να διακριθεί εάν είχαν οξεία ή παλαιά λοίμωξη. Από τις οξείες περιπτώσεις, το 80% είχε προσβολή του αναπνευστικού ενώ πνευμονία είχε το 63% των ασθενών. Υψηλό εμφανίζεται το ποσοστό των νευρολογικών επιπλοκών 22%, ενώ 40% εξ αυτών είχαν υπολειπόμενη νόσο. Ένας ασθενής κατέληξε με οξεία ηπατίτιδα (137).

Οι αναφορές στα έτη 1984 έως 1994, από το PHLS Communicable Disease Surveillance Centre εμφανίζουν μία τάση σταθεροποίησης πάνω από 100 κρούσματα ανά έτος, συνολικά

έχουν καταγραφεί 1117 περιπτώσεις, το 1/3 των οποίων προέρχεται από τις νότιο-δυτικές περιοχές της χώρας.

Η μέση ηλικία των ασθενών ήταν 45 έτη και το 74% ήταν άνδρες, ενώ η μεγαλύτερη επίπτωση της νόσου παρατηρήθηκε κατά το μήνα Μάιο. Επαφή με ζώα βρέθηκε σε 60 ασθενείς, ενώ επαγγελματική έκθεση σε 24. Η αναπνευστική οδός παρατηρήθηκε στο 74% των περιπτώσεων, 7% των ασθενών είχε καρδιακή νόσο ενώ 5% ηπατική. Το 7% είχε ταξιδέψει στο εξωτερικό πριν νοσήσει (122).

Βόρειος Ιρλανδία

Ο πυρετός Q είναι ενδημική νόσος στη Βόρειο Ιρλανδία. Από το 1962 έως το 1989 έχουν διαγνωστεί 443 ασθενείς. Αύξηση της επίπτωσης της νόσου παρατηρήθηκε το 1987 με 107 περιπτώσεις εκ των οποίων οι 47 στην Ballycastle, Co Antrim. Οι περισσότερες περιπτώσεις εμφανίστηκαν τους μήνες Απρίλιο και Μάιο, εποχή που γεννούν τα πρόβατα ενώ η μέση ηλικία των ασθενών ήταν 40-49 έτη και οι περισσότεροι άνδρες. Η περιοχή του Antrim έχει πολλά πρόβατα και ο πληθυσμός τους διπλασιάστηκε την τελευταία δεκαετία, γεγονός που εξηγεί την αυξημένη επίπτωση της νόσου στην άνω περιοχή. Η συχνότερη κλινική εκδήλωση της νόσου προέρχεται από το κατώτερο αναπνευστικό με 63% των περιπτώσεων, όπου το 25% είχε συνδρομή που θύμιζε λοίμωξη ανώτερου αναπνευστικού, το 7,2% ενδοκαρδίτιδα και το 1,6% ηπατίτιδα. Από τους 32 ασθενείς με ενδοκαρδίτιδα οι 20 είχαν προσθετική βαλβίδα ενώ η *Coxiella burnettii* απομονώθηκε σε 7 ασθενείς, από βαλβίδες που αντικαταστάθηκαν χειρουργικά (35).

Ανάμεσα στα έτη 1971-1974 εξετάστηκαν 1587 οροί ασθενών με πυρετική νόσο και με την τεχνική της δέσμευσης του συμπληρώματος βρέθηκαν 86 ασθενείς με αντισώματα έναντι της φάσης II της *Coxiella burnettii*, ενώ σε μία άλλη οροεπιδημιολογική μελέτη, βρέθηκε ότι το 28% των εξετασθέντων είχαν αντισώματα (78,162).

Ισπανία

Οι περισσότεροι ασθενείς προέρχονταν από τις βόρειες περιοχές της χώρας, κυρίως από την περιοχή των Βάσκων και την περιοχή της Navarra, περιοχές με αυξανόμενη κτηνοτροφία, κυρίως βοοειδών. Η νόσος υπερέχει στους άνδρες 77% στις ηλικίες 15-45, που παρουσιάζουν παράγοντες κινδύνου στην επαγγελματική έκθεση στη νόσο.

Μία οροεπιδημιολογική μελέτη από την περιοχή της Μαδρίτης έδειξε ότι το 15,4% στις αγροτικές περιοχές και το 8,8% στις αστικές είχαν αντισώματα έναντι της *Coxiella burnettii*, ενώ στις ίδιες περιοχές το 76,6% των αιγοπροβάτων και το 17,7% των βοοειδών ήταν οροθετικά (177). Μία δεύτερη μελέτη στην πόλη της Μαδρίτης έδειξε οροεπιπολασμό της νόσου 27,5%. Έγινε προσπάθεια συσχέτισης με την κοινωνικοοικονομική κατάσταση του πληθυσμού, εξαιτίας της υψηλής επίπτωσης 32,3% σε χαμηλά κοινωνικοοικονομικά στρώματα και 18% σε υψηλά (36).

Μία άλλη οροεπιδημιολογική μελέτη στη χώρα των Βάσκων έδειξε ότι οι κάτοικοι αραιοκατοικημένων περιοχών είχαν μεγαλύτερη επίπτωση 38,5% από τους κατοίκους περιοχών πυκνοκατοικημένων. Η νόσος υπερέχει στους άνδρες 36,3% έναντι 29% στις γυναίκες, ενώ η ενασχόληση με αγροτικές εργασίες και την κτηνοτροφία ανήκουν στους παράγοντες κινδύνου για τη νόσο (146).

Το 1993 έγινε μία ανάλογη μελέτη στην επαρχία της Soria, η οποία έδειξε ότι σε 298 εξετασθέντες ορούς (150 άνδρες και 148 γυναίκες) αντισώματα έναντι της *Coxiella burnettii* σε τίτλους μεγαλύτερους 1/40 με IFAT βρέθηκαν στο 20,8% (32,7% άνδρες και 8,8% γυναίκες) σε όλες τις περιοχές υπήρχαν οροθετικοί και σε μερικές η επίπτωση ήταν υψηλή 38% (149).

Τέλος, σε μία ορολογική μελέτη στη βορειοδυτική Ισπανία, σε 406 ορούς ασθενών από αγροτικές περιοχές κατά τη διάρκεια του χειμώνα και της άνοιξης του 1994 έδειξε μία επίπτωση της νόσου 40,6% με τιμές ορολογικών τίτλων από 1/80 έως 1/640, με τίτλους 1/80 στο 60,6% των οροθετικών ασθενών. Ψάρχει και σε αυτή τη μελέτη υπεροχή των ανδρών και οι ηλικίες που παρουσίαζαν τη μεγαλύτερη επίπτωση ήταν 15-44 και 45-64 έτη. Μεγαλύτερη επίπτωση παρατηρήθηκε επίσης σε αγρότες, καθώς και σε άτομα που ασχολούνται με την κτηνοτροφία ή έχουν στενή επαφή με ζώα.

Η εποχιακή επίπτωση των περιπτώσεων το 1983 έδειξε ότι οι περισσότερες περιπτώσεις επισυνέβησαν την άνοιξη, το 1984 κατά τους χειμερινούς μήνες, ενώ το 1985 από τον Ιανουάριο έως το Σεπτέμβριο. Οι σποραδικές περιπτώσεις ήταν καταναμημένες σε όλη τη διάρκεια του χρόνου χωρίς συγκεκριμένη εποχιακή αύξηση (176).

Η πιο συχνή κλινική εμφάνιση της νόσου ήταν η άτυπη πνευμονία 75%, λιγότερο συχνά η νόσος εκδηλώθηκε σαν εμπύρετο 18%, και σε μερικές περιπτώσεις σαν πυρετός αγνώστου αιτιολογίας, ενώ η ηπατική νόσος συνυπήρχε με τις προαναφερόμενες δύο μορφές σε ποσοστό 7,4% και 19% αντίστοιχα. Οι χρόνιες μορφές ήταν 15, εκ των οποίων 13 είχαν ενδοκαρδίτιδα, με συχνότερη την προσβολή της μιτροειδούς και με τους περισσότερους ασθενείς να μην έχουν εκδηλώσει τις περιφερικές εκδηλώσεις της ενδοκαρδίτιδας (176).

Γαλλία

Οροεπιδημιολογικές μελέτες επιβεβαιώνουν ότι η νόσος είναι ενδημική και στη Γαλλία. Από διάφορες μελέτες φαίνεται ότι σε ορισμένες περιοχές υπάρχει υψηλή επίπτωση αντισωμάτων έναντι της νόσου στο γενικό πληθυσμό (σε ένα χωριό στις Γαλλικές Άλπεις ανέρχεται στο 30%) (184), ενώ σε άλλες περιοχές η επίπτωση είναι μικρότερη (στην Cote d'Or είναι 4,4% και στη Μασσαλία 5%) (35,130).

Ορολογικές μελέτες στα βοοειδή έδειξαν επίσης υψηλή επίπτωση της νόσου στα ποίμνια με μεγάλες όμως διακυμάνσεις στις διάφορες μελέτες από 15-70% (28,38).

Το 1996 έγινε στην κεντρική Γαλλία μια οροεπιδημιολογική μελέτη και εξετάστηκαν 208 οροί για ύπαρξη αντισωμάτων έναντι της *C.burnettii*, με σκοπό να εκτιμηθεί η επίπτωση της

νόσου σε άτομα που έχουν επαφή με αιγοπρόβατα. Οι οροί ελήφθησαν από 168 κτηνοτρόφους και από 40 κτηνιάτρους και παραϊατρικό προσωπικό. Αντισώματα έναντι της φάσης II ανιχνεύθηκαν σε τίτλους $>1/40$ στο 78% των κτηνοτρόφων και των οικογενειών τους, ενώ όταν αυξήθηκαν οι τίτλοι στο $1/320$ μόνο το 37% ήταν θετικοί, από την άλλη μεριά αντισώματα έναντι της φάσης I, σε τίτλους $>1/40$ ανιχνεύθηκαν στο 15% των κτηνοτρόφων και των οικογενειών τους. Όσον αφορά τους κτηνιάτρους και το παραϊατρικό προσωπικό των εργαστηρίων, μόνο 3 στους 12 κτηνιάτρους είχαν υψηλούς τίτλους αντισωμάτων έναντι της φάσης I και II ενώ σε κανένα από τα 28 άτομα των εργαστηρίων δεν ανιχνεύθηκαν σημαντικοί τίτλοι έναντι των δύο φάσεων. Τα αποτελέσματα της μελέτης δείχνουν την ανάγκη για στενή παρακολούθηση των πληθυσμών υψηλού κινδύνου, για την πρόληψη της νόσου και τον κίνδυνο να εξελιχθεί στις χρόνιες μορφές (178). Η συχνότερη κλινική μορφή είναι η ηπατίτιδα.

Ιταλία

Αναφορές της νόσου υπάρχουν από το δεύτερο παγκόσμιο πόλεμο από επιδημίες σε στρατιώτες αλλά και αργότερα από το 1949-1955 από ολόκληρη την Ιταλία (182).

Έκτοτε, η νόσος είναι ενδημική με συνηθέστερη κλινική εκδήλωση την άτυπη πνευμονία και κυριότερο τρόπο μετάδοσης την αναπνευστική οδό με την εισπνοή μολυσμένων κόνεων, κυρίως σε περιοχές από τις οποίες περνούν κοπάδια αιγοπροβάτων (151).

Γερμανία

Οι πρώτες αναφορές της νόσου αφορούν το δεύτερο παγκόσμιο πόλεμο. Γερμανοί στρατιώτες προσβλήθηκαν κατά την παραμονή τους σε Ελλάδα και Ιταλία. Έκτοτε υπάρχουν αναφορές για 31 επιδημίες με προσβολή περισσότερων από 5000 ατόμων από τη νόσο στη Δυτική τότε Γερμανία (93).

Τα τελευταία χρόνια έχουν περιγραφεί τρεις επιδημίες στο Βερολίνο το 1992, στο Ντόρντμουντ το 1993 και στο Ντύσελντορφ το 1996. Πηγή μόλυνσης θεωρούνται τα κοπάδια των αιγοπροβάτων κοντά στον ποταμό Ρήνο. Η άτυπη πνευμονία είναι η συχνότερη κλινική εκδήλωση της νόσου και η εισπνοή μολυσμένων κόνεων από το αναπνευστικό η συνηθέστερη οδός μετάδοσης (155).

Ελβετία

Η επίπτωση της νόσου είναι υψηλή στην Ελβετία, γύρω στο 11% σε αστικές περιοχές (45). Έχουν αναφερθεί επιδημίες όπου περισσότεροι από 350 άνθρωποι προσβλήθηκαν από τη νόσο, με κύριο κοινό χαρακτηριστικό ότι διέμεναν σε ένα δρόμο που χρησιμοποιούσαν οι κτηνοτρόφοι για τη μεταφορά των ποιμνίων τους προς τα βουνά, καθώς επίσης και το 1983 που 415 άνθρωποι προσβλήθηκαν από τη νόσο με κύριο παράγοντα κινδύνου τη διέλευση ποιμνίων βοοειδών από την περιοχή τους. Η αναπνευστική οδός ενοχοποιήθηκε σαν οδός μετάδοσης (46).

Άλλες Ευρωπαϊκές χώρες

Η νόσος έχει αναφερθεί σε όλες σχεδόν τις Ευρωπαϊκές χώρες, αλλά με μικρότερη επίπτωση ή ίσως είναι λιγότερο διαγνωσμένη στις βόρειες χώρες. Υπάρχουν αναφορές από Σουηδία, Φιλανδία, Ουγγαρία, Πολωνία, Τσεχία, Σλοβακία, Ρουμανία και την πρώην Σοβιετική Ένωση. Αξίζει να αναφερθεί ότι στην Ουγγαρία η κύρια κλινική μορφή της νόσου είναι η κοκκιωματώδης ηπατίτιδα ενώ στις άλλες προαναφερόμενες χώρες επικρατεί η άτυπη πνευμονική μορφή (46,136).

Βόρειος Αμερική

Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής

Η πρώτη επιδημία στις Ηνωμένες Πολιτείες εμφανίστηκε το 1940, 3 χρόνια μετά την πρώτη καταγραφή της νόσου από τον Derrick στην Αυστραλία. Ανάμεσα στα έτη 1948-1977 αναφορές της νόσου σε ανθρώπους υπάρχουν από 31 κράτη των Ηνωμένων Πολιτειών, ενώ σε ζώα από 5 κράτη. Το 65% όλων των περιστατικών προέρχονται από την Καλιφόρνια (79,48).

Καναδάς

Στον Καναδά, στην περιοχή Nova Scotia, υπάρχει η μεγαλύτερη επίπτωση της νόσου, σε άτομα κυρίως που ασχολούνται με την κτηνοτροφία, 38% σε εργάτες σφαγείων και 49% σε κτηνιάτρους από ότι στο γενικό πληθυσμό.

Σε οροεπιδημιολογική μελέτη σε δωρητές αίματος στην περιοχή Nova Scotia και τη νήσο Prince Edouard, το 11,8% των εξετασθέντων ορών είχε αντισώματα έναντι της *C. burnettii* (214). Οροεπιδημιολογικές μελέτες σε ζώα στην ίδια περιοχή έδειξαν αυξημένη επίπτωση σε γάτες 24,1%, σε πρόβατα 6,7%, σε βοοειδή 23,8%, σε αίγες 7%, ενώ κανένας από τους κύωνες (από τους 447 που εξετάστηκαν) δεν είχε αντισώματα έναντι της *C. burnettii* (106).

Οι συχνότερες κλινικές εκδηλώσεις της νόσου είναι η άτυπη πνευμονία, παρατεινόμενο εμπύρετο καθώς και η κοκκιωματώδης ηπατίτιδα (187,107).

Κεντρική Αμερική

Από την ορολογική μελέτη του Peacock et al σε 6 χώρες της Κεντρικής Αμερικής, φαίνεται ότι η νόσος είναι ενδημική στην Κόστα Ρίκα, Ελ Σαλβαδόρ, Γουατεμάλα, Ονδούρα, Νικαράγουα και στον Παναμά (121).

Νότιος Αμερική

Η νόσος είναι ενδημική στη Βραζιλία, Κολομβία και Ουρουγουάη (21,39,170).

Αφρική

Η νόσος είναι ενδημική με αναφορές από διάφορες χώρες, αλλά κυρίως στην βορειοανατολική, δυτική και κεντρική Αφρική.

Στη βορειοανατολική Αφρική η επίπτωση της νόσου στην Αίγυπτο σε αιμοδοτές βρέθηκε: 20% στη διώρυγα του Σουέζ, 16% στην κοιλάδα του Νείλου και 10% στο δέλτα του Νείλου. Όταν εξετάστηκαν ενήλικες με εμπύρετο νόσημα, ο επιπολασμός των αντισωμάτων έναντι της *C. burnettii* ήταν 28%, ενώ ο επιπολασμός σε εργαζόμενους με βοοειδή στην Αίγυπτο 10%, στο Σουδάν 10% και στη Σομαλία 37%.

Η μεγαλύτερη επίπτωση της νόσου βρέθηκε στο Σουδάν, όπου το 54% των ασθενών που εξετάστηκαν με εμπύρετο νόσημα και το 53% χωρίς εμπύρετο είχαν IgG αντισώματα, ενώ IgM αντισώματα βρέθηκαν στο 29% και 15% αντίστοιχα (19,41).

Οι αναφορές από τη δυτική και κεντρική Αφρική αφορούν κυρίως τη Νιγηρία και τη Δημοκρατία της Κεντρικής Αφρικής. Στη Νιγηρία οι μελέτες σε 16 άγγελλες βοοειδών βρέθηκε ότι το 16,8% αποβάλλει τον μικροοργανισμό στο γάλα, ενώ σε 88 αγελάδες που εξετάστηκαν το 54,5% ήταν οροθετικές και από αυτές μόνο το 22,9% απέβαλε το μικροοργανισμό στο γάλα. Τα ανωτέρω υποδηλώνουν ότι η κύριο δεξαμενή της νόσου είναι τα κατοικίδια ζώα (1).

Στη Δημοκρατία της Κεντρικής Αφρικής έχει βρεθεί επίσης ότι η επίπτωση των οροθετικών ατόμων (ύπαρξης αντισωμάτων τύπου IgG) σε ασθενείς με HIV λοίμωξη είναι 16,7%, ίδια περίπου με εκείνου του γενικού πληθυσμού 16,3 (16).

Ασία

Οι περισσότερες αναφορές της νόσου προέρχονται από την Κίνα, την Ινδία, το Ισραήλ, το Ιράν, τη Σαουδική Αραβία και την Ιαπωνία.

Στην Κίνα οροεπιδημιολογικές μελέτες σε 10 επαρχίες έδειξαν οροεπιπολασμό από 1,6 έως 28,7% με κύρια δεξαμενή τα μολυσμένα αιγοπρόβατα και βοοειδή (55).

Στο Ισραήλ η νόσος είναι ενδημική. Σε μία μελέτη το 4,3% των εξετασθέντων παρουσίαζαν αντισώματα έναντι της νόσου (3), ενώ όσον αφορά τις χρόνιες μορφές της νόσου, σε μία αναδρομική μελέτη ανάμεσα στα έτη 1983-1992 βρέθηκαν 35 περιπτώσεις. Η επίπτωση ήταν 0,75 περιπτώσεις ανά 1.000.000 κατοίκους (161).

Στην Ιαπωνία φαίνεται ότι η κύρια δεξαμενή σε αστικές περιοχές είναι οι γάτες με οροθετικότητα σε μία μελέτη 16% ενώ σε αγροτικές περιοχές τα βοοειδή και οι κρότνες. Η *C. burnettii* βρέθηκε σε γάλα στο 16,8% και σε πλακουντιακό υλικό στο 21,3% αγελάδων με προβλήματα αναπαραγωγής και αποβολών, καθώς και στο 8% σε υγιή ζώα.

Τέλος, οροεπιδημιολογικές μελέτες σε ανθρώπους έδειξαν ότι το 8,6% των εξετασθέντων ορρών για αντισώματα έναντι της φάσης I και το 16,5% έναντι της φάσης II, βρέθηκαν θετικοί (80).

Μια μελέτη σε διάφορους κρότωνες στην Ινδία έδειξε ότι η νόσος είναι ενδημική και τα τσιμπούρια αποτελούν μία από τις δεξαμενές του μικροοργανισμού στη φύση.

Ωκεανία

Αυστραλία

Η πρώτη περιγραφή της νόσου χρονολογείται το 1937 και ανήκει στον Derrick. Αρχικά ο μικροοργανισμός ονομάστηκε *Rickettsia burnettii* και στη συνέχεια *Coxiella burnettii*.

Διάφορες μελέτες αναφέρουν επιπολασμό από 1% έως 13,3% ανά 100.000 κατοίκους (1). Όσον αφορά τις κλινικές εκδηλώσεις, η πνευμονία δεν είναι συχνή, μόλις 3/72 περιπτώσεις που έχουν περιγραφεί από τον Powell, και 8/111 από τον Spelman. Η συχνότερη κλινική εκδήλωση είναι μία αυτοπεριοριζόμενη εμπύρετη νόσος. Λιγότερο συχνά η νόσος εκδηλώνεται σαν ηπατίτιδα (124).

ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΚΑΙ ΛΟΙΜΟΓΟΝΟΣ ΔΡΑΣΗ

Λοιμογόνος ικανότητα στον άνθρωπο

Η *Coxiella burnettii* είναι εξαιρετικά λοιμογόνος για τον άνθρωπο. Έχει αποδειχθεί ότι και ένα μόνο βακτήριο είναι μολυσματικό (34). Στον άνθρωπο μπορεί να εμφανιστεί και ως χρόνια μόλυνση, συχνότερα ενδοκαρδίτιδα. Δύο υποθέσεις αντιτίθενται η μία στην άλλη για να εξηγήσουν την εμφάνιση αυτών των χρόνιων λοιμώξεων. Η πρώτη υπόθεση υπαινίσσεται παράγοντες που σχετίζονται με τον ξενιστή (ανοσοκαταστολή, βλάβη των καρδιακών βαλβίδων ή προϋπάρχουσα ενδαγγειακή βλάβη). Ενώ η δεύτερη θεωρεί ότι υπάρχουν τύποι διαφορετικών στελεχών του βακτηρίου. Οι διαφορές αυτές εντοπίζονται στο επίπεδο του λιποπολυσακχαρίτη επιφανείας και στο επίπεδο του τύπου του πλασμιδίου. Έτσι, κάποια στελέχη προκαλούν οξείες μορφές και κάποια άλλα, πιο μολυσματικά, χρόνιες μορφές της νόσου. Οι φυσιοπαθολογικές διαστάσεις του πυρετού Q απασχόλησαν ένα μεγάλο μέρος των εργασιών μας και θα αναπτυχθούν αργότερα.

Λοιμογόνος ικανότητα στα ζώα

Στο ινδικό χοιρίδιο η ενδοπεριτοναϊκή ένεση επιφέρει πυρετό με ηπατομεγαλία, μυοκαρδίτιδα και προσβολή των σπειραμάτων. Με αερόλυμα είναι δυνατό να προκαλέσουμε διάμεση πνευμονοπάθεια (14).

Σε αντίθεση, μπορούν να πραγματοποιηθούν μαζικοί ενδοτραχειακοί ενοφθαλμισμοί της *Coxiella burnettii* στα πρόβατα χωρίς να αναπτυχθεί ασθένεια. Στην αρχή παρατηρείται παροδική ρικετσιαϊμία, κατόπιν ο μικροοργανισμός παραμένει αδρανής έως ότου καταφέρει να αναπτυχθεί εκτεταμένα στον πλακούντα κατά την κυοφορία (195).

Σε κυτταρική καλλιέργεια

Οι ινοβλάστες L929 είναι πολύ δεκτικοί και η *Coxiella* πολλαπλασιάζεται σε αυτούς σε ένα φαγολυσοσωμικό κενοτόπιο. Η *Coxiella* μπορεί να προκαλέσει χρόνια μόλυνση, η οποία έχει γίνει ένα από τα πλέον χρήσιμα πειραματικά μοντέλα προκειμένου να ελέγξουμε την ευαισθησία στα αντιβιοτικά και να κατανοήσουμε την παθοφυσιολογία των ενδοκαρδίτιδων (139). Σε αυτό το πειραματικό μοντέλο η *Coxiella* πολλαπλασιάζεται στα κύτταρα, χωρίς να επηρεάζει την ανάπτυξη και την κυτταρική διαίρεση, η οποία καταλήγει στο σχηματισμό ενός θυγατρικού κυττάρου μολυσμένου και ενός κυττάρου που δεν μολύνθηκε. Τα κύτταρα που μολύνθηκαν διατηρούνται σε συνεχή καλλιέργεια για περισσότερο από δύο χρόνια, χωρίς αυτό να μπορέσει να εξηγήσει την επιμονή της μόλυνσης. Εκτός από το βακτηριολογικό ενδιαφέρον, η περιγραφή αυτού του μοντέλου επιτρέπει να καταλάβουμε ότι ο οργανισμός μπορεί να παραμείνει μολυσμένος για χρόνια.

Αντίσταση στη φαγοκυττάρωση

Η *Coxiella burnettii* δεν καταστρέφεται από τις εκκρίσεις των λυσοσωμάτων, αλλά αντίθετα η οξύτητα ενισχύει τον μεταβολισμό της, γεγονός που εξηγεί τον πολλαπλασιασμό της μέσα στα κενοτόπια. Σε αντίθεση, η φαγοκυττάρωση είναι παθητική και δεν απαιτείται διαμεμβρανική διόδος.

Μορφολογική μελέτη και το κυτταροπαθογενετικό φαινόμενο

Φαίνεται ότι κανένα “in vivo” μοντέλο δεν επιτρέπει τη μορφολογική και κινητική μελέτη της ανάπτυξης της *Coxiella burnettii*. Ο BACA είναι ο πρώτος που περιέγραψε την κυτταρική καλλιέργεια ως μοντέλο μελέτης “in vivo” της λοίμωξης από την *Coxiella burnettii* (12). Στην πραγματικότητα, οι ινοβλάστες murins L929 όπως επίσης και οι μακροφαγικές γενεές (P388 D1, j774) είναι πολύ δεκτικοί στην *Coxiella burnettii*. Όποιος και αν είναι ο κυτταρικός τύπος, η *Coxiella burnettii* διεισδύει μέσω της φαγοκυττάρωσης, στη συνέχεια τα φαγολυσοσώματα συντήκονται με τα λυσοσώματα και σχηματίζουν τα φαγολυσοσώματα και τα κενοτόπια στο εσωτερικό των οποίων αναπτύσσεται ο παθογόνος μικροοργανισμός. Στη συνέχεια, όλα τα φαγολυσοσώματα συντήκονται για να σχηματίσουν ένα και μοναδικό φαγολυσόσωμα, το οποίο καταλαμβάνει πρακτικά όλο το κυτταρόπλασμα. Η *Coxiella burnettii* πολλαπλασιάζεται μέσα στο φαγολυσόσωμα χωρίς να επιδρά στην ανάπτυξη του κυττάρου ξενιστή. Το βακτήριο προκαλεί λοιπόν μία πραγματικά χρόνια λοίμωξη, χωρίς να επιφέρει κυτταρικό θάνατο, καθώς η κυτταρική διαίρεση καταλήγει στο σχηματισμό ενός μολυσμένου θυγατρικού κυττάρου και ενός υγιούς κυττάρου. Αποδείχθηκε ότι μολυσμένα κύτταρα μπορούν να διατηρηθούν σε συνεχείς καλλιέργειες για περισσότερο από δύο χρόνια χωρίς να αλλοιωθεί η ζωτικότητα τους (102).

Αυτός ο πολλαπλασιασμός μέσα στο φαγολυσόσωμα φαίνεται να είναι μοναδικός στην οικογένεια των Rickettsiaceae, και αντανακλά την αντίσταση του βακτηρίου στη φαγοκυττάρωση και την επιμονή του μεταβολισμού του παρόλη την οξύτητα του περιβάλλοντος (68). Εκτός από το βακτηριολογικό του ενδιαφέρον, η περιγραφή αυτού του μοντέλου επιτρέπει να καταλάβουμε πως ο οργανισμός μπορεί να παραμείνει μολυσμένος για χρόνια και να εξηγήσουμε την παθοφυσιολογία των χρόνιων πυρετών Q και ιδιαίτερα των ενδοκαρδίτιδων. Στη συνέχεια, ο BACA και οι συνεργάτες του χρησιμοποίησαν αυτό το κυτταρικό μοντέλο για μορφολογική μελέτη. Αυτή η μελέτη αναφέρεται σε τρία στελέχη αναφοράς και τρία καινούρια ανθρώπινα στελέχη και συμπεραίνει μια σοβαρή ετερογένεια της ενδοκυτταρικής ανάπτυξης (κύτταρα L929) των διαφόρων στελεχών (11):

- ◆ Ο χρόνος ανάπτυξης μιας σοβαρής λοίμωξης του υποστρώματος της κυτταρικής καλλιέργειας (70-80% των κυττάρων L929 είναι μολυσμένα) ποικίλει: 10 με 15 ημέρες για τα στελέχη με την ταχύτερη ικανότητα εισβολής και τρεις περίπου μήνες για το πιο αργό στέλεχος (στέλεχος Priscilla GQ 177),
- ◆ Από την άλλη, το ίδιο το κυταροπαθογενετικό φαινόμενο, δηλαδή το μέγεθος και η μορφή των φαγολυσωμάτων του συνόλου των μολυσμένων κυττάρων ήταν και αυτό πολυποίκιλο. Το στέλεχος αναφοράς GQ 212 και τα δύο καινούρια μας στελέχη είχαν το πιο εντυπωσιακό κυταροπαθογενετικό φαινόμενο. Το κύτταρο ξενιστής ήταν ολοκληρωτικά γεμάτο από ένα τεράστιο φαγολυσόσωμα. Αντίθετα, το κυταροπαθογενετικό φαινόμενο του στελέχους αναφοράς Priscilla GQ 177 ήταν λιγότερο εντυπωσιακό. Αυτό το στέλεχος οδήγησε στο σχηματισμό μικρών στρογγυλών κυττάρων. Οι εργασίες μας και αυτές του BACA και των συνεργατών του, παρουσιάστηκαν τον ίδιο χρόνο με ανεξάρτητο τρόπο (IV International Symposium of Rickettsiae and Rickettsial Diseases, Piastany Spa, October 1-6, 1990). Τα αποτελέσματα είναι εντελώς συγκρίσιμα:
α) Μικρή λοιμογόνος ισχύς και μέτριο κυταροπαθογενετικό φαινόμενο του στελέχους αναφοράς Priscilla GQ 177 (το οποίο παρόλα αυτά είναι το στέλεχος αναφοράς για τις χρόνιες μορφές του πυρετού Q) και αντίθετα β) Ικανότητα εισβολής και εντυπωσιακό κυταροπαθογενετικό φαινόμενο για κάποια στελέχη τα οποία προέρχονται από ασθενείς που είχαν χρόνια πυρετό Q. Στην πραγματικότητα φαίνεται ότι τα διάφορα στελέχη είναι ικανά να προκαλέσουν διαφορετικές βιολογικές αντιδράσεις στον ξενιστή και επομένως διαφορετικές κλινικές εκδηλώσεις.

Παθογόνοι βακτηριακοί παράγοντες

Δύο βακτηριακοί παράγοντες, οι οποίοι είναι καθοριστικοί στην παθογένεια του πυρετού Q, έχουν περιγραφεί στην *Coxiella burnettii*. Πρόκειται για τον λιποπολυσακχαρίτη επιφάνειας (ΛΠΣ) και το εξωχρωμοσωματικό πλασμιδιακό DNA (πλασμιδιακός τύπος).

Οι παραπάνω παράγοντες σχετίζονται με τη λοιμογόνο ισχύ της *Coxiella burnettii*, και μπορούν να εξηγήσουν την ετερογένεια της παθογόνου δυνάμεως των διαφόρων στελεχών.

Ο λιποπολυσακχαρίτης επιφανείας (ΛΠΣ)

Στη φύση, η *Coxiella burnettii* εκφράζει αποκλειστικά τα αντιγόνα της φάσης I (αντισώματα της φάσης Smooth), τα οποία οφείλονται στο λιποσακχαρίτη (ΛΠΣ) της μεμβράνης και καλύπτουν τα αντιγόνα της φάσης II. Ο λιποπολυσακχαρίτης (ΛΠΣ) των δύο αυτών φάσεων δεν είναι ο ίδιος και φαίνεται να εμπλέκεται στη λοιμογόνο ισχύ της *Coxiella burnettii*. Η φάση I είναι μολυσματική, καθώς τα αντιγόνα της έχουν αντιφαγοκυτταρικές ιδιότητες. Ο ΛΠΣ της φάσης I δεν επιτρέπει τη σύνδεση του κλάσματος C3 του συμπληρώματος σε αντίθεση με τον ΛΠΣ της φάσης II. Η φάση II (αντίστοιχη με τη φάση Rough) αποκτάται μετά από ανακαλλιέργειες σε εμβρυοφόρα αυγά (10 με 100 ανακαλλιέργειες) (25,168).

Ήδη από το 1941, οι πρώτες υποθέσεις του BURNET ενοχοποιούν τον ΛΠΣ για τις διαταραχές που προκαλούνται από τη λοίμωξη με *Coxiella burnettii*. Οι υποθέσεις αυτές επιβεβαιώθηκαν από τον BACA ο οποίος απέδειξε ότι το ινδικό χοιρίδιο παρουσιάζει τις ίδιες διαταραχές, είτε ενοφθαλμιστεί σε αυτό ο ΛΠΣ, είτε ο ίδιος ο μικροοργανισμός (13). Λιποπολυσακχαρίτες με διαφορετική δομή έχουν συσχετιστεί με τις κλινικές μορφές του πυρετού Q (101).

Ο HACKSTADT και οι συνεργάτες του ταυτοποίησαν, από ένα στέλεχος το οποίο προερχόταν από τον πλακούντα ινδικού χοιριδίου που είχε μολυνθεί πριν από ένα χρόνο με *Coxiella burnettii* φάσης I, έναν τρίτο τύπο ΛΠΣ ο οποίος αντιστοιχεί σε μία ενδιάμεση μορφή. Ως εκ τούτου, διατυπώθηκε η υπόθεση της τροποποίησης της δομής του ΛΠΣ στη χρόνια μορφή του πυρετού Q (67).

Σε επόμενη εργασία των ίδιων συγγραφέων, στην οποία μελετήθηκε ο ΛΠΣ διαφόρων στελεχών (στελέχη από γάλα, κρότνες, ζώα, άτομα που νοσούν από πυρετό Q), βρέθηκε ότι ένας τύπος του ΛΠΣ της φάσης I χαρακτήριζε όλα τα στελέχη που είναι υπεύθυνα για τις χρόνιες μορφές του πυρετού Q.

Το πλασμιδιακό DNA

Ο δεύτερος παράγοντας που ενοχοποιήθηκε για τη λοιμογόνο ισχύ της *Coxiella burnettii* είναι ο τύπος του πλασμιδίου που συναντάται.

Ο SAMUEL και οι συνεργάτες του αναφέρουν, για πρώτη φορά το 1983, την απομόνωση ενός πλασμιδίου στο στέλεχος αναφοράς Nine Mile φάσης I (142), και βασιζόμενοι σε στοιχεία από μελέτες σε άλλα βακτήρια που αναπτύσσονται εξωκυττάρια (53), υποθέτουν ότι το πλασμιδιακό DNA μπορεί να παίζει ένα ρόλο στη λοιμογόνο ισχύ της *Coxiella burnettii* και ειδικότερα στο επίπεδο του φαινομένου αλλαγής φάσης. Διατυπώνουν λοιπόν την υπόθεση, ότι στην πραγματικότητα, οι διαφορετικές πλασμιδιακές πληροφορίες θα μπορούσαν να είναι υπεύθυνες για την κωδικοποίηση διαφορετικών ΛΠΣ, πράγμα το οποίο

θα εξηγούσε τις διαφορές στο επίπεδο λοιμογόνου ισχύος της φάσης I και II της *Coxiella burnettii*.

Αυτή η υπόθεση γρήγορα διαψεύστηκε, καθώς η συγκριτική ανάλυση των περιοριστικών ενζύμων των πλασμιδίων φάσης I και II από το ίδιο στέλεχος της *Coxiella burnettii* δεν έδειξε καμία σημαντική διαφορά (99,118).

Στη συνέχεια, η ανάλυση και άλλων στελεχών εκτός από το στέλεχος αναφοράς Nine Mile, αποκάλυψε διαφορετικά πλασμίδια.

Αποδείχθηκε ότι όλα τα στελέχη που προέρχονταν από ασθενείς με πυρετό Q οξείας μορφής περιείχαν το πλασμίδιο QpH1, ενώ τα στελέχη είχαν το πλασμίδιο QpRS ή την ακολουθία QpRS ενσωματωμένη στο χρωμοσωμιακό DNA τους (147). Τα στελέχη με το πλασμίδιο QpDG μπορούν να μολύνουν τα ζώα αλλά δεν είναι λοιμογόνα και δεν έχουν ποτέ απομονωθεί στον άνθρωπο.

Ανοσία και λοιμογόνος δύναμη

Πολλοί συγγραφείς έχουν αναπτύξει τη σοβαρότητα των παθογενετικών παραγόντων του πυρετού Q που σχετίζονται με τον ξενιστή.

Η ανοσία από τον πυρετό Q όπως και από τη φυματίωση δεν κατορθώνει να εξαλείψει τους μικροοργανισμούς (127). Όσον αφορά τη χυμική ανοσία, ο ρόλος των αντισωμάτων δεν είναι αξιόλογος και στο χρόνιο πυρετό Q, αν και οι τίτλοι των αντισωμάτων είναι μερικές φορές υψηλοί, δεν εμποδίζουν την εξέλιξη της νόσου (82). Ο SIDWEE και οι συνεργάτες του (156,157) ανέφεραν, για πρώτη φορά, το 1964 την επαναδραστηριοποίηση της *Coxiella burnettii* στο ινδικό χοιρίδιο ύστερα από ανοσοκαταστολή είτε με κορτιζόνη είτε με ακτίνες X. Αυτή η επαναδραστηριοποίηση έγινε αντιληπτή 3 μήνες μετά τη μόλυνση, με την απομόνωση της *Coxiella burnettii* στα ούρα και τους ιστούς και με την αύξηση του τίτλου των αντισωμάτων της φάσης II. Αυτή η εργασία, καθώς και η βαρύτητα των πειραματικών μολύνσεων σε ζώα που έπαιρναν κυκλοφωσμιμίδη (88), καθιστούν προφανές ότι το έδαφος της προτίμησης των λοιμώξεων από *Coxiella burnettii* καθορίζεται από τα ανοσολογικά ελλείμματα σε T λεμφοκύτταρα τα οποία κανονικά δίνουν το έναυσμα για τη φαγοκυττάρωση της *Coxiella* από τα μακροφάγα (91,92). Άλλες εργασίες επιμένουν στη σοβαρότητα του ρόλου των T λεμφοκυττάρων αποδεικνύοντας το ρόλο της IFN-γ και άλλων λεμφοκινών στην κυτταρική ανοσία έναντι της *Coxiella* (83,84,184). Ο “Tumor Necrosis Factor” (TNF) καθώς και η ιντερλευκίνη 1 (IL-1) φαίνεται ότι παίζουν επίσης κάποιο ρόλο (190). Το σύνολο αυτών των πειραματικών δεδομένων αφήνει να υποθεθεί ότι οι λοιμώξεις από *Coxiella* εμφανίζονται συχνότερα και διαρκούν περισσότερο στον ανοσοκατασταλμένο ξενιστή. Αυτό το συμπέρασμα είναι συγκρίσιμο και με άλλους δυνητικά ενδοκυττάρους μικροοργανισμούς που επιζούν στο φαγολυσώσωμα, όπως το μικροβακτήριο της

φυματίωσης, η *Salmonella typhi murium*, η *Leishmania* sp. (127). Στην πραγματικότητα, οι λοιμώξεις από αυτά τα παθογόνα περιγράφονται κυρίως σε ασθενείς που έχουν μειωμένη κυτταρική ανοσία (AIDS, θεραπευτική ανοσοκαταστολή, κορτικοθεραπεία).

Είναι λοιπόν ενδιαφέρον να συσχετίσει κανείς τα πειραματικά με τα κλινικά δεδομένα του πυρετού Q. Οι πρώτες περιπτώσεις πυρετού Q σε ανοσοκατασταλμένους ασθενείς αναφέρθηκαν από τον HEARD και τους συνεργάτες του, οι οποίοι περιέγραψαν πυρετό Q σε 5 ασθενείς που είχαν ανοσολογικό έλλειμμα (δύο λευχαιμίες, ένα λέμφωμα Hodgkin, μία νόσο του Crohn, και μία ηπατική κίρρωση). Οι δύο ασθενείς με λευχαιμία καθώς και ο ασθενής με λέμφωμα Hodgkin είχαν σοβαρό ανοσολογικό έλλειμμα στα T-λεμφοκύτταρα (71). Στη συνέχεια, έχουν περιγραφεί και άλλες περιπτώσεις πυρετού Q σε έδαφος ανοσοκαταστολής: οξεία λευχαιμία (86), μεταμόσχευση μυελού των οστών (97), κορτικοθεραπεία (90), καθώς και μία πρόσφατη μελέτη όπου σε μία σειρά 71 χρόνιων πυρετών Q, σχεδόν ένας ασθενής στους τέσσερις παρουσίαζε μείωση της κυτταρικής ανοσίας.

Ενδαγγειακό έδαφος και λοιμογόνος ισχύς

Σήμερα, είναι παραδεκτό ότι στο σύνολο σχεδόν των χρόνιων μορφών του πυρετού Q προϋπάρχουν ενδαγγειακές βλάβες (51,57,120,128). Συμπερασματικά, το σύνολο των παραπάνω δεδομένων καταδεικνύει ότι οι παράγοντες που σχετίζονται με τον ξενιστή (ενδαγγειακές βλάβες, έδαφος ανοσοκαταστολής) παίζουν καθοριστικό ρόλο στην παθογένεια του χρόνιου πυρετού Q.

Ανοσία

Η ανοσία που αναπτύσσει ο ανθρώπινος οργανισμός στον πυρετό Q, όπως και στη φυματίωση, δεν καταφέρνει να εξαλείψει το μικροοργανισμό (127).

Κυτταρική ανοσία

Η κυτταρική ανοσία παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην αντιμετώπιση της *Coxiella burnetii*, ενώ τα αντισώματα έχουν επικουρικό ρόλο και βοηθούν στη φαγοκυττάρωση. Η κυτταρική ανοσία μπορεί να εκτιμηθεί με ενδοδερμική αντίδραση.

Χυμική ανοσία

Κατά τη διάρκεια της λοίμωξης από την *Coxiella burnetii*, παρόλο που μόνο η φάση I είναι μολυσματική, εμφανίζονται πρώτα τα αντισώματα κατά της φάσης II. Η χυμική απάντηση περιλαμβάνει μία μέτρια άνοδο του τίτλου IgM κατά της φάσης I. Τέλος, τα IgG κατά της φάσης II εμφανίζονται και παραμένουν για πολλά χρόνια. Τα IgG κατά της φάσης I εμφανίζονται αργότερα και είναι λιγότερο σαφή (43,61). Στη διάρκεια μίας οξείας λοίμωξης δεν εμφανίζονται καθόλου IgA ή εμφανίζονται σε ελάχιστη ποσότητα και κατευθύνονται αποκλειστικά κατά της φάσης II.

Ο ρόλος των αντισωμάτων δεν είναι σημαντικός και πρέπει να αναγνωρίσουμε ότι στο χρόνιο πυρετό Q, αν και οι τίτλοι των αντισωμάτων είναι πολλές φορές υψηλοί, δεν μπορούν να εμποδίσουν την εξέλιξη της νόσου.

ΚΛΙΝΙΚΑ ΣΗΜΕΙΑ

Η κλινική συμπτωματολογία του πυρετού Q είναι ιδιαίτερα πολύμορφη. Η νόσος μπορεί να παρουσιαστεί σαν παρατεταμένος πυρετός, άτυπη πνευμονία, χρόνια ενδοκαρδίτιδα ή σύνδρομο που μοιάζει με γρίπη. Κατά κανόνα μόνο η πραγματοποίηση ορολογικού ελέγχου μπορεί να θέσει τη διάγνωση, ενώ η κλινική εικόνα μπορεί μόνο να την πιθανολογήσει.

Συνήθως διακρίνουμε δύο μορφές της νόσου: μία *οξεία μορφή* που αντιπροσωπεύεται από τις πνευμονοπάθειες, τις ηπατίτιδες ή τα παρατεταμένα εμπύρετα και μία *χρόνια μορφή* της οποίας η συχνότερη κλινική εικόνα είναι η ενδοκαρδίτιδα με αρνητική αιμοκαλλιέργεια. Συνολικά η πρόγνωση είναι εξαιρετική για τις οξείες μορφές και μέτρια για τις χρόνιες μορφές (40% θνητότητα).

Σε ερευνητική εργασία του Moredan Research Institute του Εδιμβούργου, ο Aitken αναφέρει συμπερασματικά ότι η ικανότητα της *C. burnetti* να προκαλεί αποβολές στα αιγοπρόβατα έχει αποδειχθεί και πειραματικά όπως έχει παρατηρηθεί και στην πράξη. Στις αγελάδες είναι βέβαιο και παραδεκτό ότι έχει σχέση με τα προβλήματα στειρότητας.

ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΣΗΜΕΙΑ

Επιμένουμε στη σχετική συχνότητα των αυτοάνοσων φαινομένων στις χρόνιες μορφές του πυρετού Q (κυκλοφορούντα αντιπηκτικά, αντισώματα κατά των λείων μυϊκών ινών, αντιμιτοχονδριακά αντισώματα, αντιπυρηνικά αντισώματα, ρευματοειδής παράγοντας).

ΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΙΚΑ ΕΥΡΗΜΑΤΑ

Τα ιστολογικά ευρήματα από τις καρδιακές βαλβίδες ασθενών με ενδοκαρδίτιδα από πυρετό Q είναι μη ειδικά. Μακροσκοπικά αναφέρονται μικρές ή μεγάλες εκβλαστήσεις στη μιτροειδή και αορτική ή σε προσθετικές βαλβίδες με ανάπτυξη ινώδους ιστού και περιοχές νέκρωσης με εναποθέσεις ασβεστίου. Μικροσκοπικά παρατηρούνται ινώδης ιστός, διήθηση κυττάρων οξείας και χρόνιας φλεγμονώδους αντίδρασης, γιγαντοκύτταρα και νέκρωση. Η *Coxiella burnettii* ανιχνεύεται μέσα στα φαγολυσοσώματα των μακροφάγων και ινοβλαστών. Η παρουσία όμως κενοτοπίων ή η ανεύρεση αφρωδών μακροφάγων είναι ενδεικτικά της νόσου. Χαρακτηριστικά λείπουν τα κοκκιώματα, ένδειξη πιθανής ελαττωματικής ανοσολογικής απάντησης του ξενιστή, γεγονός που οδηγεί σε χρόνια νόσο, σε αντίθεση με την οξεία νόσο στην οποία ανευρίσκονται συχνά (27). Η οριστική διάγνωση όμως θα τεθεί με την απόδειξη της ύπαρξης του μικροοργανισμού απάνω στις προσβεβλημένες βαλβίδες με ειδικές χρώσεις, και την ανεύρεση μικροοργανισμών σε μικροαποικίες, οι οποίοι μοιάζουν με τις ρικέτσιες, με καλλιέργεια και απομόνωση του

μικροοργανισμού από την προσβεβλημένη βαλβίδα σε συνδυασμό με ανοσοφθορισμό και με ανοσοϊστοχημεία χρησιμοποιώντας το πρωτόκολλο των Cartum and Pederson με μονοκλωνικά αντισώματα (31).

ΔΙΑΓΝΩΣΗ

Σήμερα υπάρχουν 3 διαγνωστικές μικροβιολογικές προσεγγίσεις των λοιμώξεων από *Coxiella burnettii*: 1) Άμεση ανίχνευση του παθογόνου σε επίπεδο ιστών, 2) Αξιολόγηση της ορολογικής απάντησης στα αντιγόνα της *Coxiella burnettii* και 3) Απομόνωση του βακτηρίου στους μολυσμένους ιστούς. Από αυτές τις προσεγγίσεις χρησιμοποιείται περισσότερο η ορολογική διάγνωση (112). Αυτό συμβαίνει κυρίως εξαιτίας της μεγάλης μολυσματικότητας της *Coxiella burnettii*, γεγονός που την καθιστά έναν παράγοντα που ο χειρισμός του απαιτεί προσοχή σε ειδικευμένα εργαστήρια. Οι πολυάριθμες περιπτώσεις μόλυνσης των ερευνητών επιβεβαιώνουν τα παραπάνω (102). Έτσι, ο McDade περιορίζει τις ενδείξεις απομόνωσης της *Coxiella burnettii* μόνο σε εκείνες τις περιπτώσεις που δεν είναι διαθέσιμοι οι οροί. Επιμένει επίσης στο γεγονός ότι ακόμα και σε αυτές τις περιπτώσεις η άμεση ανίχνευση του παθογόνου μικροοργανισμού, με ανοσοφθορισμό σε επίπεδο ιστών, είναι προτιμότερη από την απομόνωση και καλλιέργεια του μικροοργανισμού, διότι είναι λιγότερο επικίνδυνη (112). Αν και η ορολογική εξέταση επαρκεί για να βεβαιωθεί η διάγνωση, η απομόνωση και η καλλιέργεια του μικροοργανισμού είναι απαραίτητες για βασικές μελέτες που αφορούν το φαινότυπο ή το γονότυπο. Έτσι, έχουν αναπτυχθεί διαδοχικά 3 τύποι συστημάτων απομόνωσης του βακτηρίου και η ταυτοποίηση γίνεται μετέπειτα, κατά κανόνα με ανοσοφθορισμό.

ΟΡΟΛΟΓΙΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ

Γίνεται κατά κανόνα με ορολογικές εξετάσεις χρησιμοποιώντας τον ανοσοφθορισμό ως μέθοδο αναφοράς. Η ερμηνεία των ορολογικών αποτελεσμάτων επιτρέπει στη διάκριση ανάμεσα στην οξεία και στη χρόνια μορφή της νόσου.

Η οξεία μορφή της νόσου ορίζεται από την άνοδο του τίτλου των αντισωμάτων κατά της φάσης II της *Coxiella burnettii* (αύξηση των IgG II x 4 σε 10 ημέρες κατά μέσο όρο, παρουσία IgM ή ορομετατροπή. Ενδεικτικός τίτλος: IgG II > 200, IgM II > 50).

Η χρόνια μορφή ορίζεται από την άνοδο του τίτλου των αντισωμάτων κατά της φάσης I της *Coxiella burnettii* (IgG I και IgA I).

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ των στελεχών της *C. burnettii*

Η απομόνωση και καλλιέργεια γίνεται με ενδοπεριτοναϊκό ενοφθαλμισμό παθολογικού υλικού σε α) ινδικά χοιρίδια, β) αυγά εμβρύου όρνιθας ή γ) καλλιέργεια σε κυτταρικές σειρές.

■ Ενοφθαλμισμός σε ινδικό χοιρίδιο

Το αίμα, το τεμάχιο βαλβίδας ή οργάνου ενοφθαλμίζονται ενδοπεριτοναϊκά. Μετά από αρκετές ημέρες, το ζώο στο οποίο έγινε ο ενοφθαλμισμός θυσιάζεται και αφαιρείται ο σπλήνας ο οποίος ενοφθαλμίζεται σε δεύτερο χρόνο.

■ Ενοφθαλμισμός σε εμβρυοφόρο αυγό

Τα εμβρυοφόρα αυγά της κότας χρησιμοποιούνται είτε για την παραγωγή ενός απομονωμένου στελέχους στο ζώο είτε για την απομόνωση αυτή καθ' αυτή. Το δείγμα ενοφθαλμίζεται, ύστερα από απολύμανση του κελύφους, μέσα στο λεκιθικό σάκο σε ένα έμβρυο 5-7 ημερών (37).

■ Ενοφθαλμισμός με κυτταρικές καλλιέργειες

Αυτή η απομόνωση “in vitro” μπορεί να γίνει με συνεχείς κυτταρικές καλλιέργειες (κύτταρα HEL, κύτταρα VERO, κύτταρα L929, κύτταρα BHK-21) και με συνεχείς μακροφαγικές γενεές (κύτταρα P388: μακροφάγα ποντικού). Η γενική μέθοδος συνίσταται στην επώαση του στείρου δείγματος σε επαφή με την κυτταρική επιφάνεια περίπου μία ώρα, κάτω από συνεχή αργή ανακίνηση και σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, ώστε να επιτρέψει την προσκόλληση και στη συνέχεια την είσοδο των Ρικετσιών στα κύτταρα. Τα κύτταρα στα οποία έγινε ενοφθαλμισμός καλλιεργούνται στη συνέχεια στους 37° C.

Δύο παράγοντες περιορίζουν τη συνολική αποδοτικότητα των μεθόδων απομόνωσης της *Coxiella burnettii*:

- 1) Η πυκνότητα του ενοφθαλμίσιμου υλικού είναι καθοριστική για την αποδοτικότητα του ενοφθαλμισμού. Η πυκνότητα αυτή εξαρτάται άμεσα από την ποσότητα της *Coxiella burnettii* μέσα στο ενοφθαλμίσιμο υλικό και από τον όγκο του περιβάλλοντος της καλλιέργειας. Πρακτικά, μόνο οι κυτταρικές καλλιέργειες επιτρέπουν την τροποποίηση της πυκνότητας του ενοφθαλμίσιμου υλικού.
- 2) Οι τεχνικές της καλλιέργειας “in vivo” εκτελούνται δύσκολα και είναι επικίνδυνες. Για παράδειγμα, ο χειρισμός των μολυσμένων ζώων του εργαστηρίου τα οποία εκτίθενται διαρκώς σε βιολογικά προϊόντα με μεγάλη μολυσματικότητα και ενώ η *Coxiella burnettii* βρίσκεται σε φάση I (μολυσματική σε επίπεδο ενός βακτηρίου).

Τα τελευταία χρόνια χρησιμοποιείται πρωτότυπη διαδικασία απομόνωσης της *Coxiella burnettii*. Πρόκειται για την ανάπτυξη μίας τεχνικής απομόνωσης με φυγοκέντρωση σε σωλήνα bijou (shell-vial assay technique) (129).

Σχηματικά αυτή η διαδικασία περιλαμβάνει πολλά στάδια:

- ♦ καλλιέργεια των κυττάρων HEL σε γυάλινη πλάκα μέσα σε σωλήνα bijou
- ♦ ενοφθαλμισμό του δείγματος (αίμα ή τεμάχιο ιστού) πάνω στην επιφάνεια των κυττάρων

- ♦ φυγοκέντρωση του σωλήνα στον οποίο έγινε ο ενοφθαλμισμός, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για μία ώρα στα 800 g, ώστε να διευκολυνθεί η προσκόλληση και στη συνέχεια η ενσωμάτωση της *Coxiella burnetii* στα κύτταρα,
- ♦ ανίχνευση της *Coxiella burnetii*, έξι μέρες αργότερα, από μία τεχνική ανοσοφθορισμού που χρησιμοποιεί ένα μονοκλωνικό αντίσωμα anti-*Coxiella burnetii*.

Η παραπάνω τεχνική χρησιμοποιείται σε επίπεδο ρουτίνας στο Εθνικό Κέντρο Αναφοράς Ρικετσιώσεων σαν διαγνωστικό μέσο του πυρετού Q.

ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ στελεχών *Coxiella burnetii*

A) ΑΜΕΣΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ

Η χρώση Gimenez μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την άμεση ανίχνευση της *Coxiella burnetii*. Η βασική φουξίνη χρωματίζει κόκκινα τα κύτταρα, τις ρικέτσιες και το υπόστρωμα. Ακολουθεί η επίδραση του πράσινου του μαλαχίτη που έχει μεγαλύτερη συγγένεια για τα κύτταρα και το υπόστρωμα παρά για τις ρικέτσιες. Έτσι, η βασική φουξίνη παραμένει μόνο στις ρικέτσιες, οι οποίες εμφανίζονται κόκκινες, ενώ τα κύτταρα και το υπόστρωμα διατηρούν το πράσινο χρώμα.

Η *Coxiella burnetii* ανιχνεύεται επίσης με τον άμεσο ανοσοφθορισμό. Η μέθοδος βασίζεται στην καθήλωση της σεσημασμένης με φθορίζουσα ουσία αντιανθρώπινης σφαιρίνης, πάνω στο σύμπλεγμα αντιγόνου αντισώματος και μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε βιοψιακό υλικό ή σε καλλιέργειες.

B) ΜΟΡΙΑΚΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ *COXIELLA BURNETTII*

Δεδομένης της πολυπλοκότητας και της δύσκολης ερμηνείας των μέσων που χρησιμοποιούνται για τη φαινοτυπική ταυτοποίηση των *Rickettsiaceae* (οικολογικά κριτήρια, χαρακτηριστικές καλλιέργειες, αντιγονικός προσδιορισμός οροτυπικά, χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων και προσδιορισμός πρωτεϊνικών προφίλ με Western Blot), η γονοτυπική ταυτοποίηση αποτέλεσε το αντικείμενο εργασιών που δημοσιεύθηκαν για τα περισσότερα είδη *Rickettsiaceae*.

Αυτή η γονοτυπική ταυτοποίηση γίνεται γενικά με δύο τρόπους προσέγγισης: i) με τη χρήση ειδικών ανιχνευτών DNA (probes), ή ii) με τον γενωμικό πολλαπλασιασμό συγκεκριμένης αλληλουχίας του DNA (PCR) που ακολουθείται από ανάλυση της κατατομής των τμημάτων του προϊόντος- DNA μετά από την επίδραση περιοριστικών ενζύμων (PCR-RFLP). Έτσι, μέθοδοι γονοτυπικής ταυτοποίησης έχουν περιγραφεί για: *Rickettsia prowazekii* (132,135), *Rickettsia typhi* (10,121), το σύνολο της ομάδας typhus και της ομάδας boutonneux (8,9,131), *Rickettsia richettsii* (185), *Rickettsia tsutsugamushi* (89).

Σε όλα αυτά τα μοριακά πρωτόκολλα βακτηριακής ανίχνευσης και ταυτοποίησης, η ευαισθησία της γονιδιακής ανάπτυξης με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) φαίνεται μεγαλύτερη από εκείνη των νουκλεοτιδικών ανιχνευτών. Ανάλογα με τις τεχνικές, η PCR επιτρέπει να ανιχνευθούν ποσότητες τόσο μικρές όσο 10-100 βακτήρια (κάποιοι συγγραφείς αναφέρουν ένα όριο κατώτερο των 10 μικροοργανισμών), ενώ με τις τεχνικές υβριδισμού με μοριακούς ανιχνευτές χρειάζονται γενικά το λιγότερο 1000 μικροοργανισμοί πριν δοθεί ένα θετικό αποτέλεσμα. (61). (100).

- ♦ Όσον αφορά την ανίχνευση της *Coxiella burnettii*, αναφέρθηκε η χρησιμοποίηση νουκλεοτιδικών ανιχνευτών. Το όριο της ανίχνευσης σε αυτές τις εργασίες είναι 10.000 βακτήρια

Γονιδιακή ανίχνευση με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Αρχικά επιλέγεται ένα ζεύγος ολιγονουκλεοτιδικών εναρκτών (primers) από το γονίδιο της κιτρικής συνθετάσης (73). Επίσης άλλοι “εκκινητές” επιλέγονται με βάση ειδική ακολουθία του γονιδίου της δισμουτάσης του υπεροξειδίου της *Coxiella burnettii* (72), όπου επιτρέπουν την ανάπτυξη ενός τμήματος DNA με 257 ζεύγη βάσεων. Έτσι, μπορούμε να πολλαπλασιάσουμε το DNA που απομονώνουμε από τα νέα στελέχη καθώς και το DNA των στελεχών αναφοράς (Nine Mile, Priscilla GQ 177, GO 212). Η ειδικότητα των εναρκτών αρχικά πιστοποιήθηκε με υβριδοποίηση των προϊόντων του πολλαπλασιασμού, χρησιμοποιώντας έναν ειδικά μαρκαρισμένο ανιχνευτή με ραδιενεργό φωσφόρο. Σήμερα, επεκτείνεται η εφαρμογή της τεχνικής PCR στη βακτηριολογική διαγνωστική. Η εξαγωγή και καθίζηση του DNA μπορούν να αντικατασταθούν από έναν απλό βρασμό των δειγμάτων της κυτταρικής καλλιέργειας.

Συμπερασματικά:

Η απομόνωση της *Coxiella burnettii* στο εργαστήριο είναι εξαιρετικά δύσκολη και γίνεται με τις κυτταροκαλλιέργειες σε κύτταρα HEL ή L929 και με την τεχνική των Shell-vials. Στη συνέχεια, η χρώση Gimenez αναδεικνύει τις ρικέτσιες, ενώ με τις τεχνικές του άμεσου ανοσοφθορισμού, της PCR, RFLP και Pulse field electrophoresis γίνεται η ταυτοποίηση στελεχών της *Coxiella burnettii* και των πλασμιδίων τους (59)

ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Η τετρακυκλίνη είναι το φάρμακο εκλογής στην ενδοκαρδίτιδα όπως άλλωστε και στην οξεία λοίμωξη. Σε μονοθεραπεία όμως η τετρακυκλίνη, παρ’ όλο που βελτιώνει την κλινική εικόνα, φαίνεται ότι δεν αρκεί. Έχει ανευρεθεί μικροοργανισμός σε βιοψιακό υλικό βαλβίδας μετά από 4 έτη θεραπείας.

Συνήθως ο συνδυασμός τετρακυκλίνης και co-trimoxazole με ή χωρίς ριφαμπικίνη είναι η θεραπεία εκλογής.

Δεν υπάρχει ομοφωνία όσον αφορά τη χρονική διάρκεια της αντιμικροβιακής αγωγής για την ενδοκαρδίτιδα από *Coxiella burnettii* (147).

Ορισμένοι μιλούν για θεραπεία δια βίου, άλλοι για 2 έτη αγωγής (183).

ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ ΣΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ

Οι μακρολίδες, τα β-λακταμικά και οι αμινογλυκοσίδες είναι αναποτελεσματικές. Η *Coxiella burnettii* είναι ευαίσθητη μόνο στα αντιβιοτικά που δρουν ενδοκυττάρια όπως οι τετρακυκλίνες, η ριφαμπικίνη, οι φλουοροκινολόνες και η τριμεθοπρίμη. Τα αντιβιοτικά στα οποία είναι ευαίσθητη η *Coxiella burnettii* είναι βακτηριοστατικά και κανένα βακτηριοκτόνο.

ΕΙΛΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο πυρετός Q στον άνθρωπο και στα ζώα είναι μία ζωννόσος με παγκόσμια εξάπλωση και είναι περισσότερο διαδεδομένη από ότι νομίζεται, αφού τις περισσότερες φορές υποδιαγιγνώσκεται.

Ο πυρετός Q οφείλεται στην *Coxiella burnettii*, ένα υποχρεωτικά ενδοκυττάριο μικροοργανισμό, Gram αρνητικό. Οι πρώτες αναφορές στον πυρετό Q σαν ασθένεια στους ανθρώπους χρονολογούνται από το 1937. Από τότε η νόσος αυτή έχει αναγνωριστεί σαν πλατιά διαδεδομένη ζωννόσος με δυνατότητα πρόκλησης σποραδικών κρουσμάτων και επιδημιών στους ανθρώπους και στα ζώα.

Η νόσος αυτή έχει σοβαρές επιπτώσεις τόσο στην υγεία του ανθρώπου όσο και στην υγεία των ζώων και κατά συνέπεια στην οικονομία μιας χώρας μέσω της μειωμένης παραγωγικότητας των ζώων.

Πρόσφατα, οι τεχνικές άμεσης και έμμεσης διάγνωσης των ρικετσιώσεων βελτιώθηκαν σημαντικά. Οι κλασικές μέθοδοι καλλιέργειας και ταυτοποίησης αποτελούσαν εμπόδιο στη μελέτη του πυρετού Q. Η εφαρμογή της ταχείας καλλιέργειας (cell vial technique), της τεχνικής της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) και της επίδρασης περιοριστικών ενζύμων (RFLP) έδωσε τη δυνατότητα ταχείας ανίχνευσης και ταυτοποίησης της *C.burnettii*.

Στις χώρες της Ανατολικής Μεσογείου υπάρχουν πολύ λίγες μελέτες για τον πυρετό Q και λόγω έλλειψης οροεπιδημιολογικών μελετών δεν είναι γνωστή η διασπορά της *C.burnettii*. Πρόσφατες έρευνες έδειξαν ότι η νόσος είναι πλατιά διαδεδομένη στην Κρήτη, και σε άλλες περιοχές της Ελλάδος (181).

Στην Κύπρο, η νόσος διαγνώστηκε ορολογικά το 1951 (το ιστορικό της νόσου αναλύεται στο επόμενο κεφάλαιο) και από τότε έχουν γίνει αποσπασματικές προσπάθειες διερεύνησης και αντιμετώπισης του νοσήματος στα ζώα κυρίως και ελάχιστα στους ανθρώπους.

Η νόσος δεν καταγράφεται και υποδιαγιγνώσκεται, δεν έχει γίνει η συστηματική της μελέτη. Ο αιτιολογικός παράγοντας της νόσου δεν είχε απομονωθεί ούτε από τον άνθρωπο ούτε από τα ζώα, δεν υπήρχαν στοιχεία για τα κυκλοφορούντα στελέχη, και οι τεχνικές που εφαρμόζονταν για την εργαστηριακή διάγνωση θεωρούνται πια ξεπερασμένες. Οι σύγχρονες τεχνικές απομόνωσης ανίχνευσης και ταυτοποίησης δεν είχαν εφαρμοστεί στην Κύπρο προτού αρχίσει αυτή η μελέτη.

Η παρούσα μελέτη αποσκοπεί σε μία ολοκληρωμένη διερεύνηση και μελέτη του πυρετού Q (επιδημιολογική και εργαστηριακή, κάνοντας χρήση και της μηχανογραφημένης χαρτογράφησης) σε ολόκληρη την Ελεύθερη Κύπρο με την εφαρμογή σύγχρονων μεθόδων.

Οι ειδικοί σκοποί της μελέτης αυτής είναι οι ακόλουθοι:

1. Εκτίμηση του επιπολασμού του πυρετού Q σε ανθρώπους και ζώα

2. Αναζήτηση παραγόντων κινδύνου που σχετίζονται με τη μετάδοση της *C.burnettii* από τα ζώα στους ανθρώπους
3. Εντόπιση περιοχών με αυξημένο οροεπιπολασμό σε ανθρώπους και ζώα
4. Απομόνωση της *C.burnettii* και τυποποίηση του αιτιολογικού παράγοντα από νοσούντες ανθρώπους και ζώα
5. Μελέτη της επιδημιολογικής αλυσίδας της *C.burnettii* από τα ζώα στον άνθρωπο σε περιοχές υψηλού οροεπιπολασμού (High risk regions).

ΙΣΤΟΡΙΚΟ ΠΥΡΕΤΟΥ Q ΣΤΗΝ ΚΥΠΡΟ

Η ασθένεια Q Fever έχει αναφερθεί για πρώτη φορά στην Κύπρο το 1951 από τους Kalrpan και Bertagna (1955) όταν ανακάλυψαν αντισώματα στην εκτροπή συμπληρώματος της *C.burnettii* σε 24 από τα 60 πρόβατα (40%) και σε 11 από τις 31 αίγες (35%). Ταυτόχρονα, ύποπτα περιστατικά Q Fever στους ανθρώπους αναφέρθηκαν από το Τμήμα Ιατρικών Υπηρεσιών.

Στην ετήσια έκθεση των Κτηνιατρικών Υπηρεσιών το 1951 (Roe 1951) δηλώνεται ότι αριθμός δειγμάτων έχει συλλεχθεί με τη μέθοδο random (τυχαίο δείγμα) και αποσταλεί στο Αμερικάνικο Πανεπιστήμιο της Βηρυτού στο Λίβανο κατόπιν δικής τους επιθυμίας. Τα αποτελέσματα της εργαστηριακής εξέτασης με τη μέθοδο της εκτροπής του συμπληρώματος (CFT) των ορών αυτών ήταν τα ακόλουθα.

Πίνακας 2

Είδος Ζώων	Αρ. Συλλεγέντων Ορών	Αρ. Εξετασθένων Ορών	Αρνητικά	Αμφίβολα	Θετικά
Αγελάδες	19	19	3	3	13
Πρόβατα	91	60	24	12	24
Αίγες	54	31	5	15	11

Ταυτόχρονα, 10 οροί λήφθηκαν από εργάτες σφαγείου και εξετάστηκαν με την ίδια μέθοδο. Πλην ενός ορού που ήταν αμφίβολο το αποτέλεσμα οι υπόλοιποι οροί ήταν αρνητικοί.

Έξι ομάδες από τρία ινδικά χοιρίδια ενοφθαλμίστηκαν αντίστοιχα με γάλα από έξι διαφορετικές φόρμες. Ένα μήνα μετά τον ενοφθαλμισμό λήφθηκαν οροί από όλα τα ινδικά χοιρίδια. Μία ομάδα από έξι που ενοφθαλμίστηκαν με γάλα προβάτου έδωσε ισχυρή θετική αντίδραση ενώ οι υπόλοιπες πέντε ήταν αρνητικές.

Οροί που λήφθηκαν αμέσως μετά από τους δύο βοσκούς που εργάζονταν στη φάρμα από όπου λήφθηκε το γάλα και τα ενοφθαλμισμένα ινδικά χοιρίδια έδωσαν θετική αντίδραση, αποδείχθηκαν επίσης θετικοί.

Είχε εξαχθεί το συμπέρασμα ότι η *C. burnettii* ενδημούσε στην Κύπρο.

Στα τέλη του 1960 ο Kelly (1994) είχε προβεί σε διερεύνηση 547 ορών αίματος που λήφθηκαν τυχαία από ανθρώπους στο Γενικό Νοσοκομείο Λευκωσίας κατά τα έτη 1968 και 1969. Το 5,3% των ορών αποδείχθηκαν θετικοί με τη μέθοδο της εκτροπής συμπληρώματος αντισωμάτων φάσης 2 του αντιγόνου της *C. burnettii*.

Το 1970 αποφασίστηκε η διερεύνηση των αποβολών στα παραγωγικά ζώα της νήσου. Ζητήθηκε από όλους τους κτηνιατρικούς σταθμούς να αποστέλλουν στο κτηνιατρικό εργαστήριο των Κτηνιατρικών Υπηρεσιών ορούς αίματος, έμβρυα και πλακούντες από ζώα που έχουν αποβάλλει.

Κατά τη διάρκεια του 1971, έξι πλακούντες βρέθηκαν να περιέχουν αριθμό μικρών acid-fast rot-like οργανισμών. Οροί από τα ίδια ζώα αποδείχθηκαν αρνητικοί για αντισώματα *Chlamydia Psittaci* και αντισώματα *Brucella melitensis*.

Το 1973 είχαν βρεθεί και πάλι σε πλακούντες οι ίδιοι μικροοργανισμοί σε ζώα που είχαν αποβάλει. Σε δύο περιπτώσεις κοπαδιών με αποβολές που βρέθηκαν τέτοιοι μικροοργανισμοί συλλέχθηκαν από τα ίδια ζώα οροί αίματος που εξετάστηκαν από το Standards Laboratory, Colindale, UK και αποδείχθηκαν θετικοί στο Q Fever.

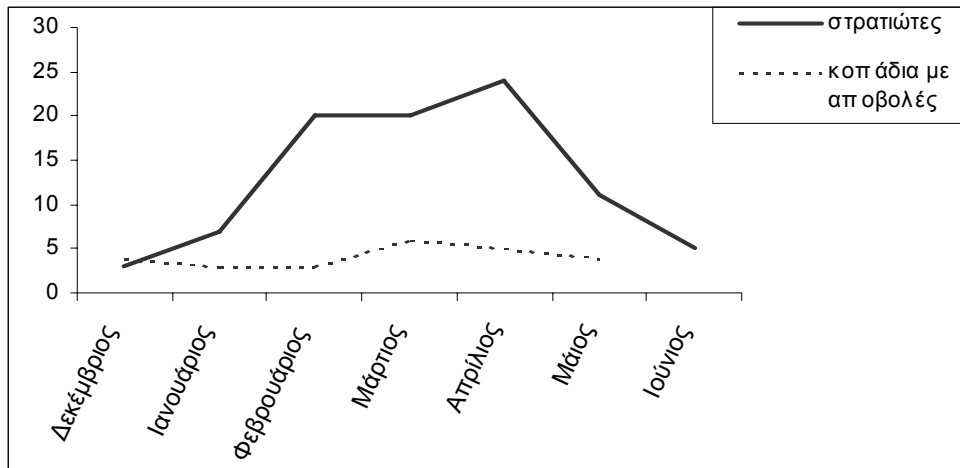
Τον ίδιο χρόνο, από άλλες τέσσερις περιπτώσεις αποβολών σε κοπάδια που μικροσκοπικά ανευρέθησαν οι ίδιοι μικροοργανισμοί, οι εξετασθέντες οροί αίματος από τα ίδια ζώα αποδείχθηκαν θετικοί για αντισώματα στην *C. burnettii*.

Κατά τη χρονική περίοδο του Δεκεμβρίου 1974 και του Ιουνίου 1975, 78 Βρετανοί στρατιώτες που είχαν σαν έδρα της Βρετανικής Βάσης Δεκέλειας στην Επαρχία Λάρνακας (Spicer et al, 1977)(205) οι οποίοι ασθένησαν με συμπτώματα πυρετού και γρίπης, βρέθηκαν θετικοί στον πυρετό Q μετά από σειρά εργαστηριακών εξετάσεων. Την ίδια περίοδο πρέπει να σημειωθεί ότι στην πιο πάνω περιοχή των βάσεων είχαν μετακινηθεί 40.000 πρόσφυγες, πολλοί από τους οποίους μετέφεραν και τα κοπάδια τους.

Είναι ενδιαφέρον να σημειωθεί ότι από τους μόνιμους κατοίκους της περιοχής αυτής των βάσεων κανένας δεν παρουσίασε συμπτώματα της ασθένειας. Οι Ιατρικές αρχές των Βρετανικών Βάσεων ζήτησαν συνεργασία με τις Κτηνιατρικές Υπηρεσίες και αφού διερευνήθηκε το ταυτόχρονο πρόβλημα αποβολών σε 21 κοπάδια αιγοπροβάτων της περιοχής τα περισσότερα βρέθηκαν να είναι θετικά στο πυρετό Q.

Είναι ενδιαφέρουσα η σχηματική σύγκριση των ορολογικών αποτελεσμάτων από τους στρατιώτες των Βάσεων και των ορολογικών αποτελεσμάτων των κοπαδιών της περιοχής που είχαν παρουσιάσει αποβολές:

Διάγραμμα 1: Μηνιαία κατανομή κρουσμάτων πυρετού Q σε στρατιώτες των Αγγλικών Βάσεων στην Κύπρο το 1974-75 σε σύγκριση με τις αποβολές στα αιγοπρόβατα της ίδιας περιοχής



Το Νοέμβριο του 1978 κοπάδι 37 προβάτων φυλής Χίου που ανήκε στο Ινστιτούτο Γεωργικών Ερευνών παρουσίασε αποβολές. Τρία πρόβατα απέβαλαν ενώ άλλα τέσσερα γέννησαν θνησιγενή αρνιά. Όλα τα αποβληθέντα έμβρυα, θνησιγενή αρνιά και πλακούντες εξετάστηκαν στο εργαστήριο και διεγνώσθη *C.burnettii* μικροσκοπικά. Οροί αίματος λήφθηκαν από τα 7 συγκεκριμένα ζώα και εξετάστηκαν με τη μέθοδο εκτροπής συμπληρώματος για τα αντισώματα *C.burnettii* και βρέθηκαν όλα θετικά σε διαλύσεις από 1/10 έως 1/40.

Στην ίδια φάρμα διπλανό κοπάδι αποτελούμενο από 59 αίγες φυλής Δαμασκού αναμένετο να αρχίσει γέννες σε 6 εβδομάδες. Ελήφθηκαν αμέσως οροί αίματος από όλο το κοπάδι και βρέθηκε ότι 30 αίγες παρουσίασαν τίτλο αντισωμάτων από 1/10 έως 1/40. Μερικές μόνο μέρες αργότερα τα ζώα αυτά άρχισαν να αποβάλλουν. Δέκα εννέα ζώα απέβαλαν και εννέα γέννησαν θνησιγενή ερίφια. Τα έμβρυα και οι πλακούντες από 16 αποβολές και επτά από τις γέννες με θνησιγενή ερίφια εξετάστηκαν μικροσκοπικά και τέθηκε η διάγνωση της παρουσίας σε όλα *C.burnettii*.

Ζεύγη ορών ελήφθησαν από εννέα από τα 19 ζώα που απέβαλαν. Το πρώτο δείγμα ορού λήφθηκε την ημέρα της αποβολής και το δεύτερο τρεις εβδομάδες αργότερα. Τα αποτελέσματα ήσαν τα ακόλουθα:

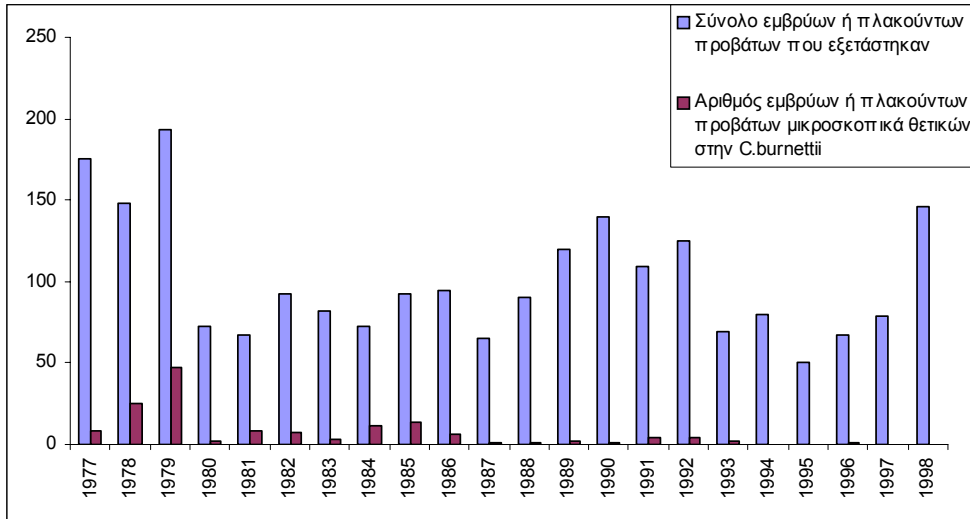
Πίνακας 3

Αρ. ζώου	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Πρώτος ορός	1/20	0	2/20	0	2/40	3/40	0	0	0
Δεύτερος ορός	3/40	3/40	2/40	1/10	4/40	4/40	1/40	2/40	2/40

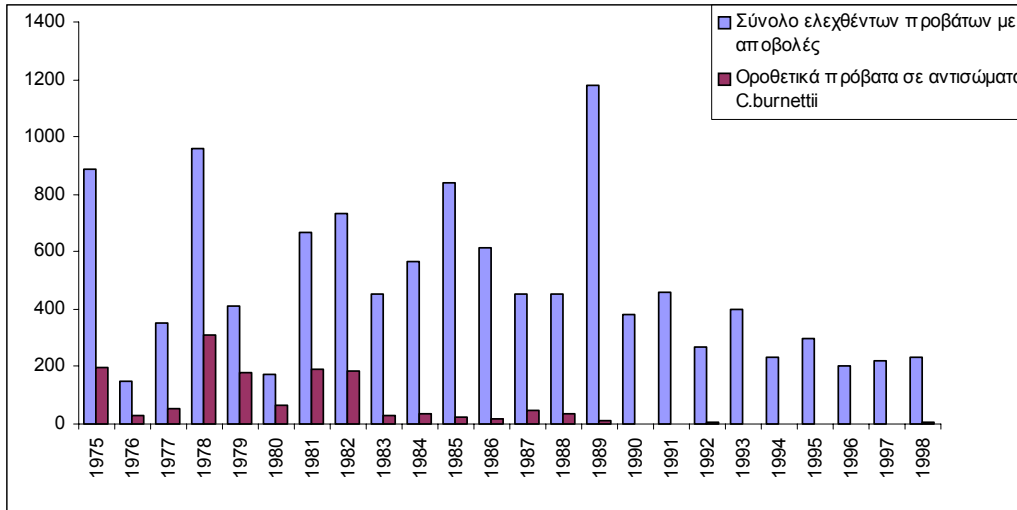
Ανατρέχοντας στα στοιχεία που διαθέτουν τα αρχεία των Κτηνιατρικών Εργαστηρίων του Τμήματος Κτηνιατρικών Υπηρεσιών, η όλη εικόνα στα αιγοπρόβατα παρουσιάζεται στα διαγράμματα 2, 3, 4, 5.

Οι εργαστηριακές εξετάσεις που χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο των ορών από ζώα που απέβαλαν ήταν η δοκιμή εκτροπής συμπληρώματος, για δε την εξέταση των εμβρύων ή πλακούντων ή παραλλαγή της χρώσης ZIEL-NIELSEN, STAMP-FARBUNG πάνω σε επίχρισμα από τα υλικά αυτά. Στα αρχεία του Τμήματος Ιατρικών Υπηρεσιών δεν αναφέρεται ότι δηλώθηκαν κρούσματα πυρετού Q σε ανθρώπους.

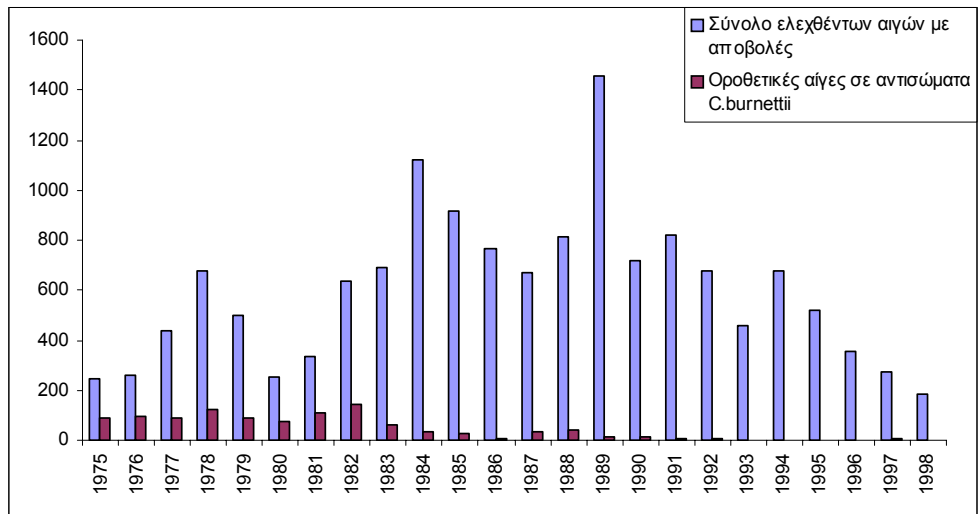
Διάγραμμα 2: Ετήσια κατανομή εξετασθέντων εμβρύων ή πλακούντων προβάτων και των μικροσκοπικά θετικών στην *C.burnettii*



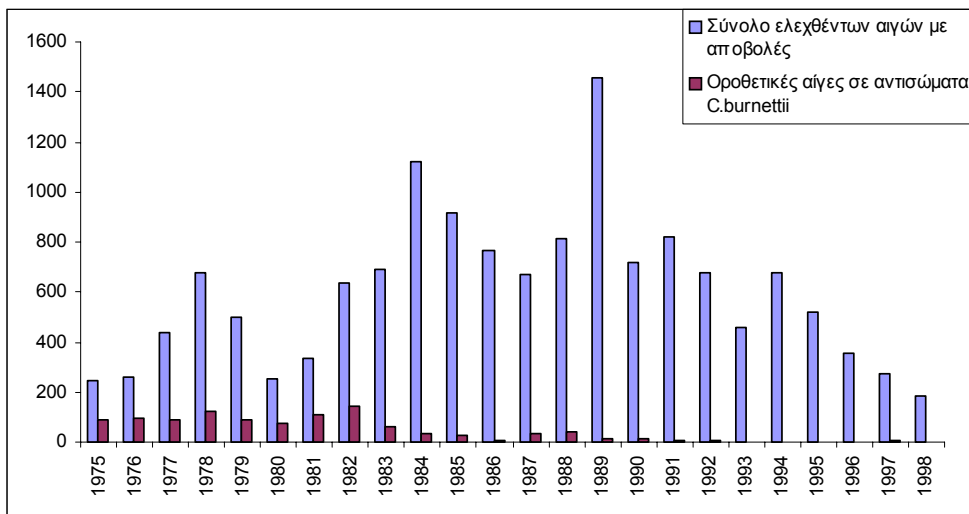
Διάγραμμα 3: Ετήσια κατανομή εξετασθέντων ορών προβάτων που απέβαλαν και των οροθετικών



Διάγραμμα 4: Ετήσια κατανομή εξετασθέντων εμβρύων ή πλακούντων αιγών και των μικροσκοπικά θετικών στην *C.burnettii*



Διάγραμμα 5: Ετήσια κατανομή εξετασθέντων ορρών αιγών που απέβαλαν και των οροθετικών



Όπως είναι φανερό από τα πιο πάνω διαγράμματα, υπάρχει μια σταδιακή σημαντική πτώση της ορθοθετικότητας καθώς και των θετικών εξετάσεων στα έμβρυα η οποία τείνει να γίνει μηδενική.

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Ο σχεδιασμός και η εκτέλεση της μελέτης έγιναν σε τρεις χρονικές φάσεις. Την πρώτη φάση, τη δεύτερη φάση και την τρίτη φάση.

Όπως φαίνεται και στη διαγραμματική απεικόνιση των φάσεων της μελέτης, αρχικά έγινε προσπάθεια μέσα από οροεπιδημιολογική διερεύνηση σε ανθρώπους και ζώα καθώς και με την ανίχνευση της *C. burnettii* σε κρότωνες να εντοπισθούν περιοχές υψηλού κινδύνου στην Κύπρο.

Στη δεύτερη φάση, αφού εντοπίστηκαν δύο συγκεκριμένες περιοχές, έγινε αναλυτική επιδημιολογική διερεύνηση σε ανθρώπους και ζώα και αφού καταγράφηκαν οι οροαρνητικοί κάτοικοι και ζώα παρακολούθηθηκαν με μηνιαίες επισκέψεις για ένα χρόνο με στόχο να αναζητηθούν κλινικές περιπτώσεις του νοσήματος σε ανθρώπους και ζώα, ενώ στο τέλος της παρακολούθησης εκτιμήθηκε η οροθετικότητα των αρχικά οροαρνητικών ατόμων και ζώων. Στην Τρίτη Φάση αναπτύχθηκε σε όλη την Κύπρο σύστημα ενεργητικής επιτήρησης του νοσήματος σε ανθρώπους και ζώα.

Κατά το σχεδιασμό της μελέτης αποφασίστηκε να χρησιμοποιηθούν όλα τα σύγχρονα εργαλεία στον εργαστηριακό διαγνωστικό τομέα (PCR shell-vial Technique κλπ.) καθώς και σύγχρονα εργαλεία στην επιδημιολογική διερεύνηση (Πρόγραμμα Μηχανογραφημένης Χαρτογράφησης).

Όπως είναι φανερό, η μελέτη αφορούσε όλη την ελεύθερη Κύπρο, ανθρώπινο και ζωικό πληθυσμό, διήρκεσε μεγάλο χρονικό διάστημα, ήταν αρκετά περίπλοκη και χρησιμοποιήθηκε μεγάλος αριθμός συνεργατών (ιατροί, κτηνίατροι, εργαστηριακοί κλπ.). Για όλους τους πιο πάνω λόγους αποφασίστηκε η δημιουργία αναλυτικών πρωτοκόλλων στα οποία γινόταν λεπτομερής περιγραφή όλων των σταδίων της μελέτης.

Συγκεκριμένα δημιουργήθηκαν τα πιο κάτω αναλυτικά πρωτόκολλα, τα οποία περιγράφονται παρακάτω:

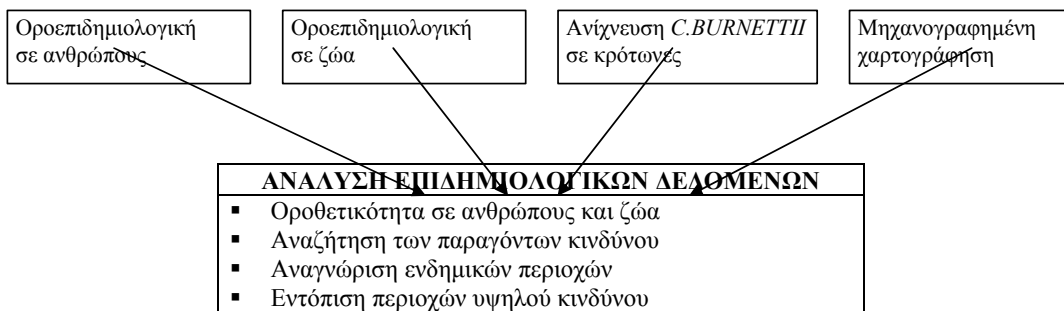
1. Αναλυτικό πρωτόκολλο συλλογής στοιχείων από τα αρχεία των Ιατρικών Υπηρεσιών
2. Αναλυτικό πρωτόκολλο συλλογής δειγμάτων αίματος από ενήλικες
3. Αναλυτικό πρωτόκολλο συλλογής δειγμάτων αίματος από παιδιά που προσέρχονται σε παιδιατρικές κλινικές
4. Αναλυτικό πρωτόκολλο συλλογής στοιχείων από τα αρχεία των Κτηνιατρικών Υπηρεσιών
5. Αναλυτικό πρωτόκολλο συλλογής δειγμάτων αίματος από αιγοπρόβατα και αγελάδες

6. Αναλυτικό πρωτόκολλο συλλογής κροτώνων από αιγοπρόβατα και αγελάδες
7. Αναλυτικό πρωτόκολλο συλλογής δειγμάτων αίματος από ασθενείς με πιθανή ή διαγνωσμένη ρικετσίωση
8. Αναλυτικό πρωτόκολλο συλλογής δειγμάτων αίματος από ύποπτα ζώα για πυρετό Q
9. Γενικό εργαστηριακό πρωτόκολλο
10. Αναλυτικό πρωτόκολλο εκτέλεσης έμμεσου ανοσοφθορισμού

ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΙΚΗ ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΤΩΝ ΦΑΣΕΩΝ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

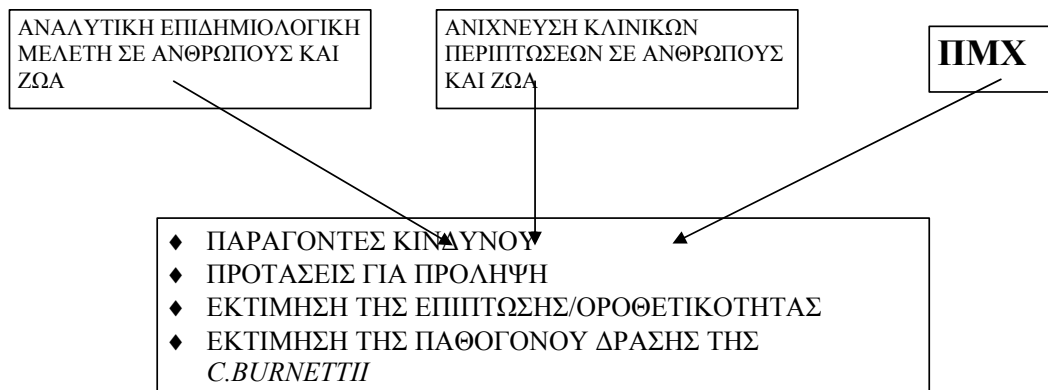
ΦΑΣΗ I

Επιδημιολογική διερεύνηση της *C.burnettii* σε ανθρώπους και ζώα για τον εντοπισμό περιοχών υψηλού κινδύνου



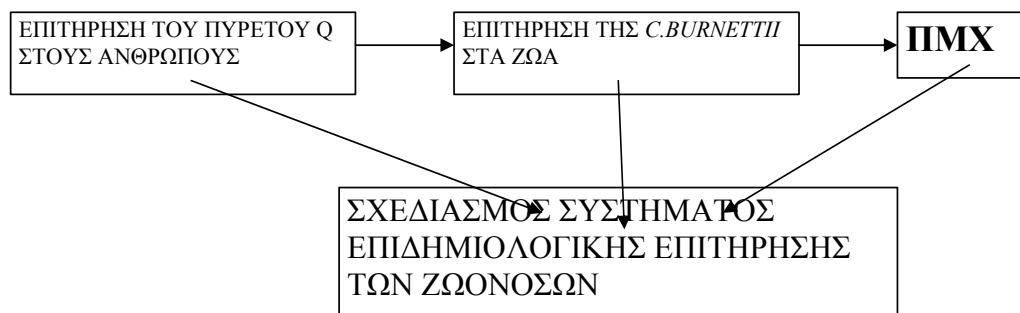
ΦΑΣΗ II

Αναλυτική επιδημιολογική διερεύνηση σε ανθρώπους και ζώα σε περιοχές υψηλού κινδύνου



ΦΑΣΗ ΙΙΙ

Ενεργητική επιτήρηση της *C.burnettii* σε ανθρώπους και ζώα σε ολόκληρη την Κύπρο



Μέθοδος της Μηχανογραφημένης χαρτογράφησης

Η χαρτογράφηση αποδείχθηκε ένα χρήσιμο εργαλείο στην επιδημιολογική έρευνα. Η τεχνική της χαρτογράφησης χρησιμοποιήθηκε αρχικά σε μικροτοπικές κατανομές (επίπεδο μικρής περιοχής χωριού) και συγκεκριμένα για την επιδημιολογική διερεύνηση λοιμωδών νοσημάτων. Κλασικά παραδείγματα όπου χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος είναι τα πιο κάτω:

- 1) Η διερεύνηση της επιδημίας χολέρας που έγινε το 1854 στο Λονδίνο από τον Snow: ο μεγάλος αυτός ερευνητής που θεωρείται από πολλούς και πατέρα της επιδημιολογίας τοποθέτησε τα κρούσματα χολέρας (σαν σημεία) σε κάθε οικοδομικό τετράγωνο περπατώντας στο Λονδίνο για πολλές μέρες. Επίσης, τοποθετήθηκε στο χάρτη το σύστημα ύδρευσης της πόλης. Παρατηρήθηκε ότι κρούσματα υπήρχαν σε περιοχές που έπαιρναν νερό από μία συγκεκριμένη εταιρεία ύδρευσης. Πρέπει να σημειωθεί ότι την εποχή εκείνη στο Λονδίνο υπήρχαν δύο διαφορετικές εταιρείες ύδρευσης. Έτσι, συνδυάστηκε η μετάδοση του νοσήματος με την κατανάλωση μολυσμένου νερού (Snow J, 1955).
- 2) Η επιδημιολογική διερεύνηση του ενδημικού τύφου στην Αλαμπάμα το 1922: Τα κρούσματα τοποθετήθηκαν σε σημεία στο μικροτοπικό χάρτη της περιοχής χρησιμοποιώντας τον τόπο διαμονής των πασχόντων που δεν εργάζονταν και τον τόπο εργασίας των εργαζομένων. Όπως φαίνεται και στο σχήμα, τα κρούσματα παρουσιάζουν αυξημένη συγκέντρωση σε ένα εργοστάσιο. Τελικά η πηγή της μόλυνσης θεωρήθηκε η καντίνα του εργοστασίου (Maxcy K.F., 1926).

Με τα παραδείγματα αυτά είναι φανερό η χρησιμότητα της χαρτογράφησης στην ανεύρεση παραγόντων κινδύνου που σχετίζονται με το νόσημα καθώς και την ανεύρεση της πιθανής πηγής μόλυνσης. Η μεθοδολογία αυτή όμως είχε μερικά μειονεκτήματα:

- α) Στους χάρτες δε λαμβανόταν υπόψη η πυκνότητα του πληθυσμού με αποτέλεσμα να υπάρχει κίνδυνος, επειδή χρησιμοποιούνταν σημεία για τα κρούσματα να φανούν πλασματικές συγκεντρώσεις κρουσμάτων (να οφείλονται σε αυξημένη πυκνότητα πληθυσμού).
- β) Είναι περιορισμένη η δυνατότητα απεικόνισης διαφόρων παραγόντων κινδύνου στους χάρτες ταυτόχρονα με την απεικόνιση των κρουσμάτων.
- γ) Η μέθοδος απαιτούσε πολύ χρόνο και ήταν δύσκολο να αναπαραχθεί, αν χρησιμοποιούνταν άλλα στοιχεία ή άλλοι παράγοντες κινδύνου.

Τα πρόσφατα επιτεύγματα στον τομέα των ηλεκτρονικών υπολογιστών και συγκεκριμένα στις γραφικές απεικονίσεις, έδωσαν νέα ώθηση και νέους ορίζοντες στη μεθοδολογία της χαρτογράφησης (Openshaw S., 1995). Η μηχανογραφημένη χαρτογράφηση (MX) χρησιμοποιήθηκε ευρύτατα σε πολλούς τομείς σε επίπεδο χώρας – νομού. Στον καρκίνο χρησιμοποιήθηκε για την δημιουργία χαρτών θνησιμότητας ταυτόχρονα με την

απεικόνιση των παραγόντων κινδύνου, με στόχο να συνδεθεί το νόσημα με συγκεκριμένο παράγοντα κινδύνου (Manson T.J. et al, 1975; Jenkins C.D., 1983; Beral V, 1990;). Ακόμα, η MX σε επίπεδο νομού χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη των λοιμωδών νόσων (π.χ. ελονοσία) (Kitron V. et al, 1994; Bhopal P.S. et al, 1991; Openshaw S., 1996;) και από τα τμήματα δημόσιας υγείας διαφόρων χωρών (CDC ΗΠΑ κλπ.) (Nimmo A.W., 1989; Garson G.D., 1992; Dean J.A. et al, 1993;). Με τη βοήθεια της MX απεικονίζονται τα κρούσματα των λοιμωδών νοσημάτων ανά νομό και γίνεται προσπάθεια ανεύρεσης περιοχών υψηλού κινδύνου, για να ληφθούν δραστικά μέτρα πρόληψης. Επίσης γίνεται σύγκριση των κρουσμάτων με τα προηγούμενα χρόνια. Ένας άλλος τομέας που χρησιμοποιήθηκε η MX ήταν στη μελέτη των ατυχημάτων (Martinez B.F. et al, 1989), όπου απεικονίζοντας τα τροχαία ατυχήματα ανά νομό έγινε δυνατό να εντοπιστούν οι δρόμοι υψηλού κινδύνου για ατυχήματα.

Παρά την ευρεία χρήση της MX σε επίπεδο νομού – χώρας δεν υπάρχει μεγάλη εμπειρία στη χρησιμοποίησή της σε απεικόνιση μικρής περιοχής (π.χ. προάστιο). Ένα δημοσιευμένο άρθρο (Difford F.,1985) αναφέρεται απλά στη γραφική απεικόνιση (όχι σε οθόνη, αλλά σε χάρτη) της επίπτωσης της νοσηρότητας σε μικρή περιοχή ενός γενικού ιατρού.

Μεθοδολογία Χαρτογράφησης

Το PIMX δημιουργήθηκε στο Πανεπιστήμιο Κρήτης αρχικά το 1989 και εξελίχθηκε σταδιακά από εφαρμογή για Dos σε παραθυρική εφαρμογή (under windows) το 1998. Μέχρι σήμερα χρησιμοποιήθηκε σε επιδημιολογικές μελέτες λοιμωδών νοσημάτων με ιδιαίτερα ικανοποιητικά αποτελέσματα. Κύρια χαρακτηριστικά του είναι η ευκολία στη χρήση, η μη απαίτηση υψηλών προδιαγραφών μηχανοργάνωσης και η ανεξαρτησία στη χρήση των ψηφιακών χαρτών. Η ακρίβεια που παρέχει το σύστημα δεν είναι ιδιαίτερα μεγάλη, αλλά πολύ ικανοποιητική στη χρήση του σε επιδημιολογικές μελέτες.

Γλώσσα Προγραμματισμού - Μηχανογραφικό Υλικό

Το πρόγραμμα, στηρίζεται στη φιλοσοφία χρησιμοποίησης συντεταγμένων των σημείων τα οποία ενώνονται και μας δημιουργούν την απεικόνιση που θέλουμε, όπως για παράδειγμα την απεικόνιση της Κύπρου με τις επαρχίες της και την απεικόνιση των τοπογραφικών των χωριών. Οι συντεταγμένες των σημείων μπορούν να υπολογιστούν είτε χρησιμοποιώντας digitizer είτε scanner και ειδικό πρόγραμμα επεξεργασίας εικόνας. Ακόμα μπορεί να υπολογιστούν και με απλά μέσα: χρησιμοποιώντας ένα χάρακα τετραγωνίζοντας ένα χάρτη ή ένα τοπογραφικό και ορίζοντας ένα άξονα σαν X και ένα άξονα σαν Y. Η

απαιτούμενη ακρίβεια που θέσαμε για τις ανάγκες του προγράμματος ήταν τέτοια ώστε, να ικανοποιεί τις ανάγκες μιας επιδημιολογικής έρευνας και όχι μιας τοπογραφικής μελέτης ή μιας αυστηρά γεωγραφικής χρήσης. Το πρόγραμμα αυτό είναι συνδεδεμένο με μια βάση δεδομένων ευμετάβλητη, στην οποία μπορεί να καταχωρηθούν στοιχεία που αφορούν ένα λοιμώδες νόσημα ή στοιχεία που αφορούν κατοίκους μιας συγκεκριμένης περιοχής και αυτά τα στοιχεία στη συνέχεια να απεικονιστούν στους χάρτες που δημιουργούνται από το πρόγραμμα. Το πρόγραμμα αποτελείται από 3 υποπρογράμματα και ανάλογες βάσεις δεδομένων:

α) Master.exe

β) Analysis.exe

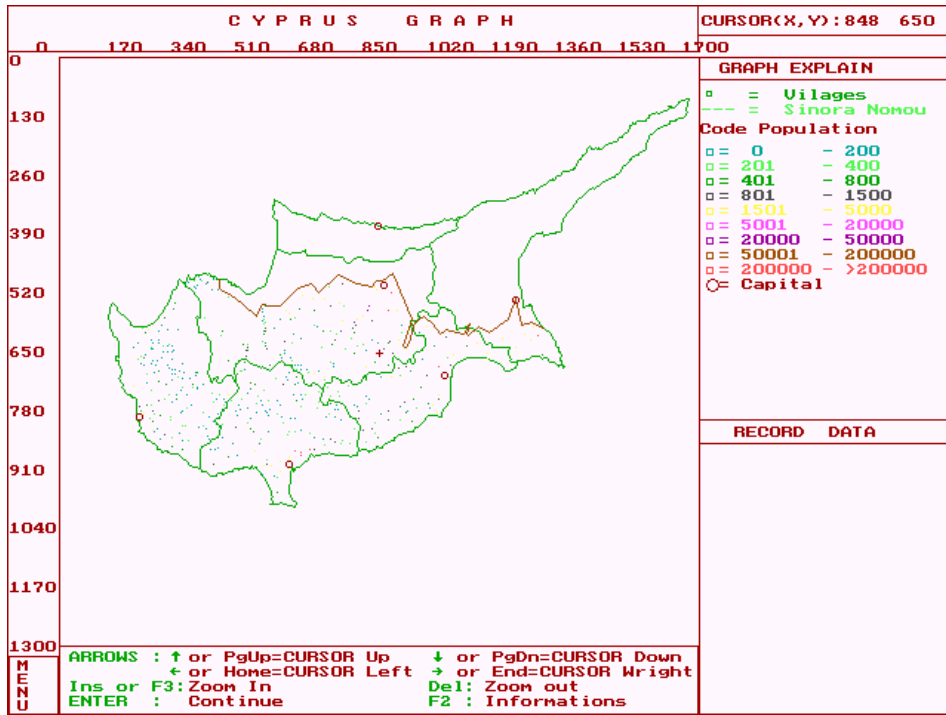
γ) Dbase.exe

Μηχανογραφημένη χαρτογράφηση της Κύπρου σε επίπεδο επαρχίας (Master.exe)

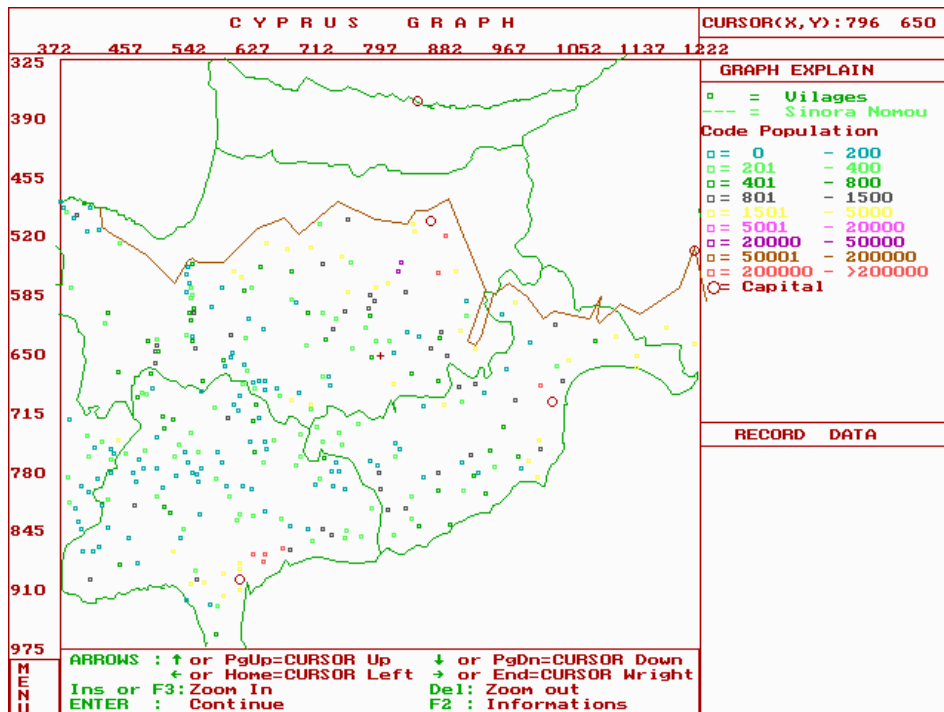
Για να δημιουργηθεί το μηχανογραφημένο περίγραμμα της Κύπρου υπολογίσθηκαν οι συντεταγμένες των σημείων αρχικά τετραγωνίζοντας ένα χάρτη της Κύπρου με τη χρησιμοποίηση προγράμματος επεξεργασίας εικόνας και dijidizer. Στη συνέχεια καταχωρήθηκαν οι συντεταγμένες των σημείων που σχηματίζουν το περίγραμμα της Κύπρου και τα όρια των επαρχιών. Στις επαρχίες καταχωρήθηκαν οι συντεταγμένες των χωριών που υπάρχουν σε κάθε επαρχίες. Με την κατάλληλη επεξεργασία έγιναν οι πρώτες απεικονίσεις του χάρτη της Κύπρου (Σχήμα 1).

Ο χάρτης ο οποίος δημιουργήθηκε, συνδέθηκε αρχικά με βάση δεδομένων η οποία αφορούσε το όνομα του κάθε χωριού, τον πληθυσμό του, το υψόμετρό του τον αριθμό των ζώων και άλλων επιδημιολογικών παραγόντων. Παίρνοντας στοιχεία από τη βάση δεδομένων γίνονται οι πρώτες απεικονίσεις σε επίπεδο χώρας (πληθυσμός επαρχίες) και σε επίπεδο επαρχίας (πληθυσμός χωριών). Πρέπει να σημειωθεί ότι υπάρχει η δυνατότητα μεγέθυνσης της εικόνας σε μία γεωγραφική περιοχή της Κύπρου που θα επιλεγεί ή και αυτούσιας μιας επαρχίας η οποία θα μεγεθυνθεί και θα απεικονίζεται με τα χωριά και τις πόλεις της (Σχήμα 2).

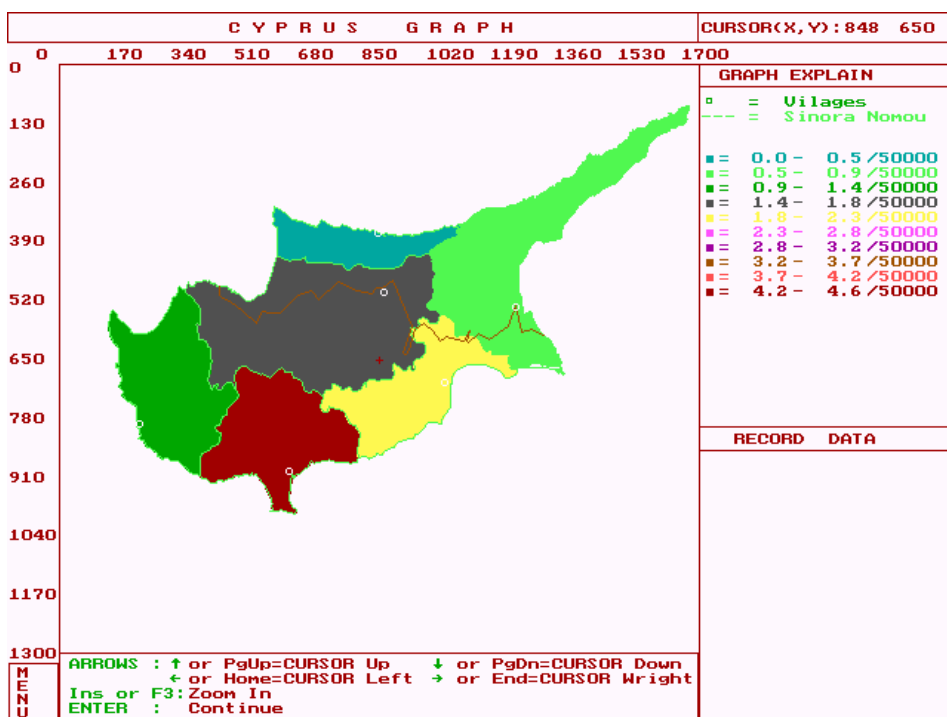
Στην συνέχεια ο χάρτης της Κύπρου συνδέθηκε με τη βάση δεδομένων στην οποία ήταν καταχωρημένα τα κρούσματα ρικετσιώσεων από το Υπουργείο Υγείας. Έγιναν δοκιμαστικές απεικονίσεις χρησιμοποιώντας κλίμακα χρωμάτων που αντιστοιχούσε στην επίπτωση και στην αθροιστική επίπτωση (cumulative incidence) (Σχήμα 3). Επίσης δίνεται η δυνατότητα επιλογής συγκεκριμένης επαρχίας και μεγέθυνση της εικόνας, με σκοπό να απεικονιστούν τα χωριά χρωματισμένα ανάλογα με την επίπτωση τους (Σχήμα 4).



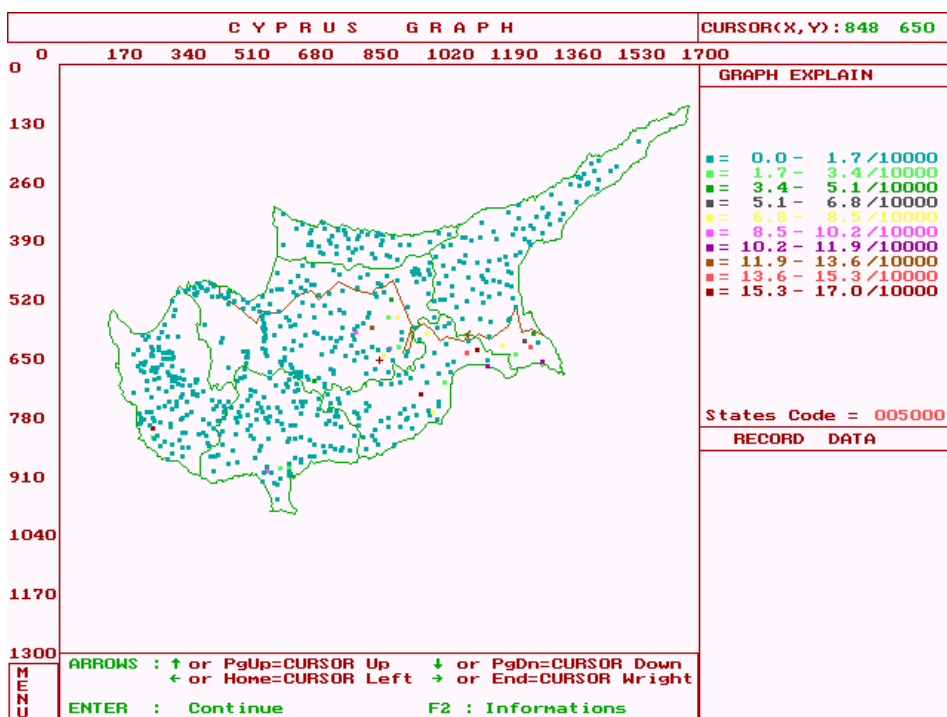
Σχήμα 1: Απεικόνιση της Κύπρου με τα όρια των επαρχιών στα οποία μπορούν να απεικονιστούν τα χωριά χρωματισμένα ανάλογα με τον πληθυσμό τους. Κάθε επαρχία περιγράφεται από τα όρια της τα οποία σχηματίζονται χρησιμοποιώντας τις συντεταγμένες των σημείων. Τα όρια των επαρχιών πρέπει να είναι κλειστά (να ξεκινούν και να τελειώνουν από το ίδιο σημείο), έτσι ώστε να αφορίζουν μια συγκεκριμένη περιοχή. Κάθε επαρχία έχει ένα κωδικό του οποίου το πρώτο ψηφίο ορίζει σε ποια περιφέρεια ανήκει. Μέσα στην επαρχία καταχωρούνται σε σημεία (συντεταγμένες) τα χωριά που περιλαμβάνονται στην επαρχία. Ο κωδικός του χωριού περιλαμβάνει τον κωδικό της επαρχίας. Στην συνέχεια μπορεί να καταχωρηθεί το τοπογραφικό του χωριού με τα σπίτια και τους δρόμους. Οι κωδικοί των σπιτιών περιλαμβάνουν τον κωδικό του χωριού και τον κωδικό του νομού. Με αυτή την σχεδίαση δημιουργήθηκε ένα ολοκληρωμένο ΠΜΧ με το οποίο μπορούμε να ξεκινήσουμε από το επίπεδο χώρας και να φτάσουμε στο σπίτι ενός συγκεκριμένου χωριού. Οι χάρτες συνδέθηκαν με βάση δεδομένων, στην οποία καταχωρήθηκαν δημογραφικά στοιχεία (πληθυσμός επαρχίας, χωριού) και έγιναν δοκιμαστικές απεικονίσεις.



Σχήμα 2: Απεικόνιση της Κύπρου σε επίπεδο χώρας. Μεγέθυνση επιλεγείσας περιοχής στην οποία μπορούν να φανούν τα χωριά χρωματισμένα ανάλογα με τον πληθυσμό τους. Το ΠΙΜΧ παρέχει την δυνατότητα μεγέθυνσης οποιασδήποτε περιοχής επιλεγεί (ένα τετράγωνο κλπ.) ή μιας αυτούσιας επαρχίας. Αυτό έχει πρακτική σημασία, γιατί αρχίζει η απεικόνιση των αποτελεσμάτων από επίπεδο χώρας και μπορεί σταδιακά να κατέβει σε επίπεδο περιφέρειας (3-4 επαρχίες), επαρχίας με τα χωριά της και στην συνέχεια μικρής περιοχής (τοπογραφικό χωριού). Έτσι παρέχεται η δυνατότητα επιλογής του επιπέδου που θα γίνει η ανάλυση των αποτελεσμάτων και η αναζήτηση της συσχέτισης του νοσήματος με γεωγραφική παράμετρο.



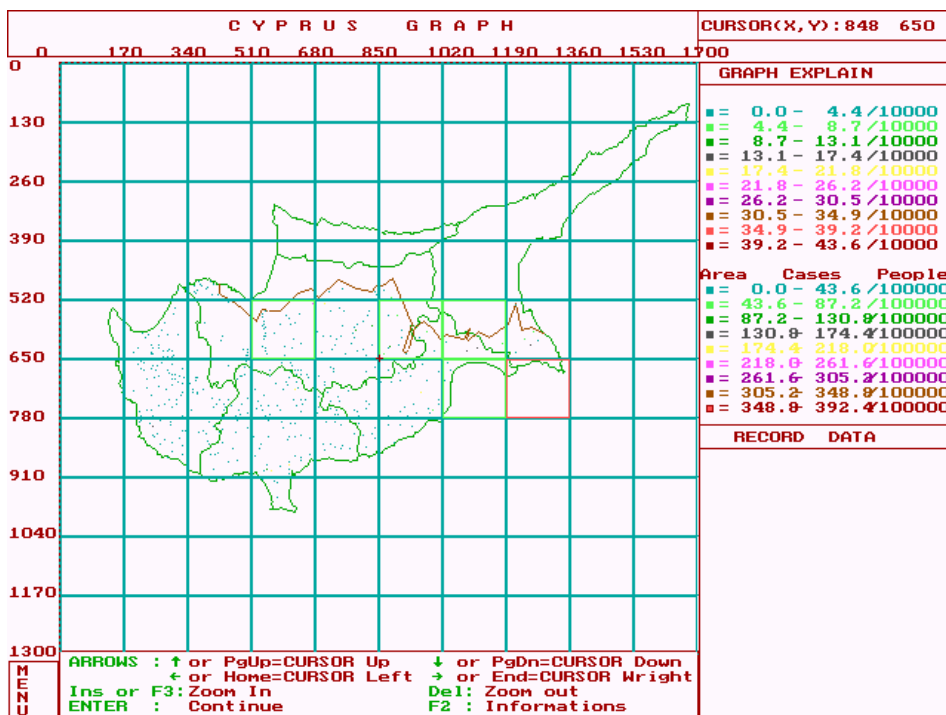
Σχήμα 3: Δοκιμαστική απεικόνιση κρουσμάτων σε επίπεδο χώρας-επαρχίας: οι επαρχίες χρωματίζονται ανάλογα με την επίπτωση που αντιστοιχεί σε αυτές. Η επίπτωση των νομών μπορεί να καταχωρηθεί στην αντίστοιχη βάση δεδομένων ή να υπολογιστεί από την επίπτωση των χωριών που υπάγονται σε κάθε επαρχία. Εάν υπάρχουν καταχωρημένα στοιχεία που αφορούν τους κατοίκους κάθε χωριού, μπορεί να υπολογιστεί η επίπτωση πρώτα σε κάθε χωριό και στην συνέχεια σε κάθε επαρχία. Έτσι η πληροφορία που απεικονίζεται σε επίπεδο χώρας μπορεί να συλλέγεται από το χαμηλότερο δυνατό επίπεδο, την κάθε περίπτωση ρικέτσιας ξεχωριστά, η οποία έχει γνωστή γεωγραφική παράμετρο.



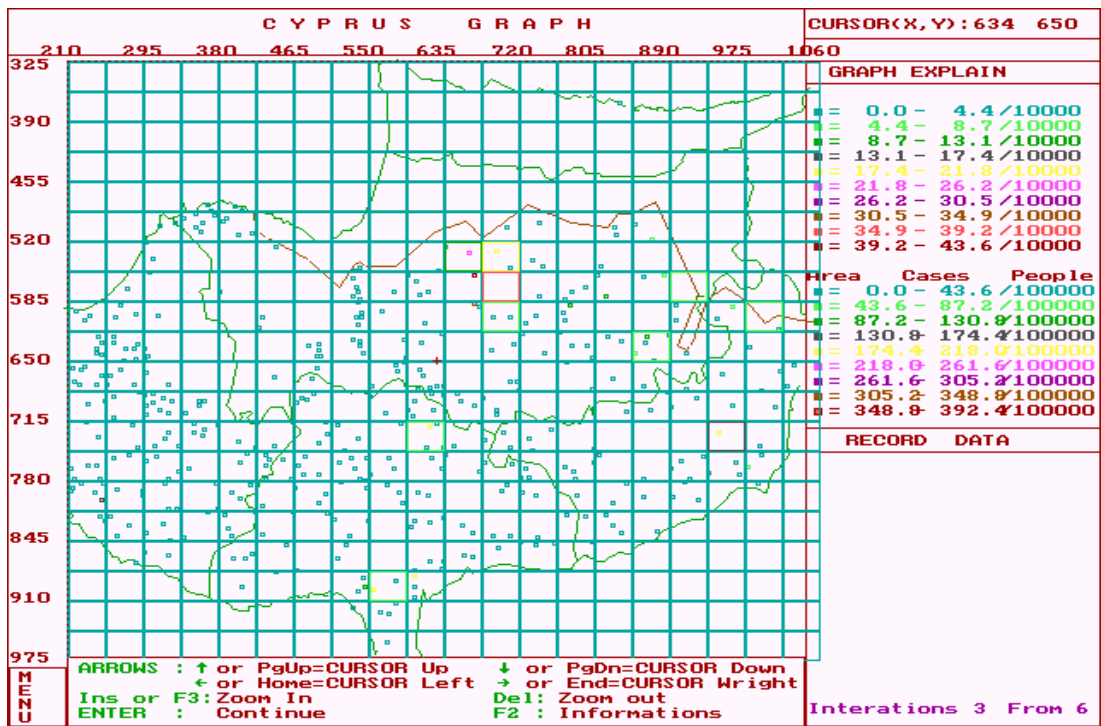
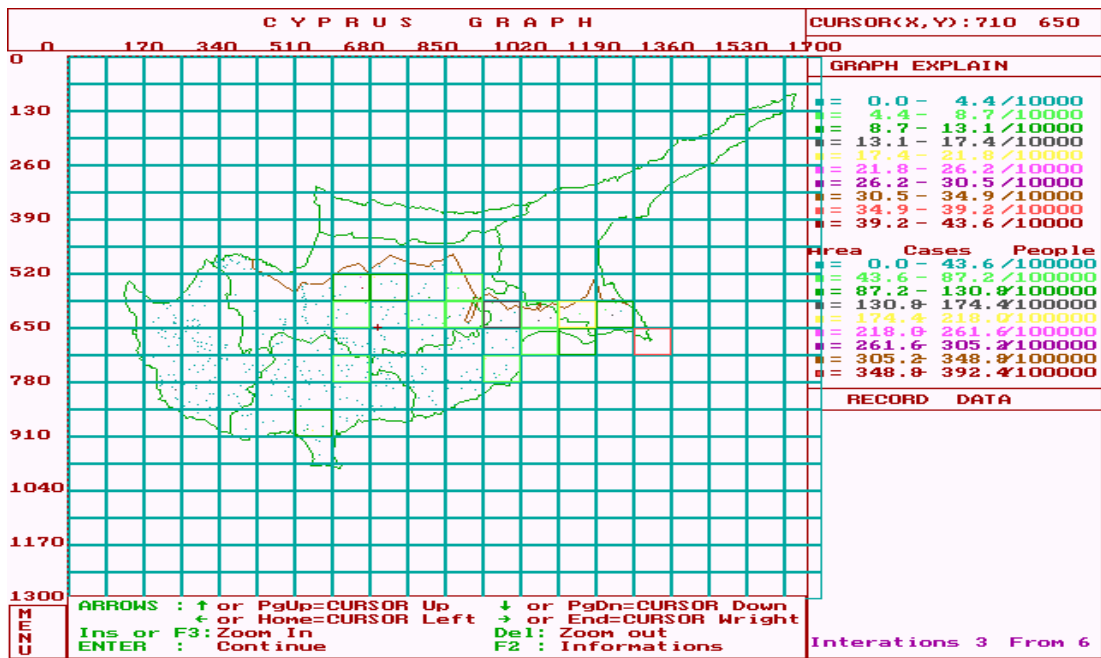
Σχήμα 4: Απεικονίσεις κρουσμάτων σε επίπεδο χώρας. Μεγέθυνση συγκεκριμένης περιοχής-επαρχίας στην οποία απεικονίζονται χρωματισμένα τα χωριά ανάλογα με την επίπτωση τους.

Επειδή τα γεωγραφικά όρια μίας επαρχίας είναι τεχνητά και όχι φυσικά όρια, δεν παρεμποδίζεται η εξάπλωση του νοσήματος από επαρχία σε επαρχία. Έτσι αποφασίσαμε, εκτός από την δυνατότητα απεικόνισης της επίπτωσης ανά επαρχία, να δώσουμε τη δυνατότητα στο πρόγραμμα δυναμικής αναζήτησης περιοχής υψηλού κίνδυνου πέρα από τα όρια μιας επαρχίας (περιοχή ανάμεσα σε δύο ή τρεις επαρχίες). Το πρόγραμμα χρησιμοποιεί μετακινούμενα τετράγωνα με αυξομειούμενο μέγεθος τα οποία χρωματίζονται ανάλογα με την επίπτωση της περιοχής. Η επίπτωση υπολογίζεται με βάση τα στοιχεία που περιέχονται στην βάση δεδομένων και αναφέρονται στα χωριά που περικλείονται σε κάθε τετράγωνο (Σχήμα 5, 6, 7).

Ακόμη πιο πέρα, εάν υπάρχουν καταχωρημένα στοιχεία μικρής περιοχής (τοπογραφικά χωριών με απεικονίσεις κρουσμάτων), το πρόγραμμα τα υπολογίζει και με τον τρόπο αυτό οι επιδημιολογικοί χάρτες μιας χώρας κτίζονται από κάτω προς τα πάνω: τοπογραφικό μικρής περιοχής, απεικόνιση σε επίπεδο επαρχίας και τέλος απεικόνιση σε επίπεδο χώρας. Αυτό παρέχει τη δυνατότητα να παρακολουθείται το νόσημα εκεί που πραγματικά συμβαίνει (μικρή περιοχή) χρησιμοποιώντας την μικροτοπική κατανομή, δίνεται στη συνέχεια η δυνατότητα μακροτοπικής κατανομής (Επαρχία, Χώρα)



Σχήμα 5: Αναζήτηση περιοχών με αυξημένη επίπτωση του νοσήματος. Τα όρια των επαρχιών είναι τεχνητά και όχι φυσικά (τα λοιμώδη νοσήματα δεν αναγνωρίζουν όρια) και επιπλέον σε επαρχίες με μικρό πληθυσμό μπορεί εύκολα να θεωρούνται τυχαία επαρχίες ως υψηλή επίπτωση χωρίς στην πραγματικότητα αυτό να έχει καμιά αξία. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήσαμε τα αυξομειούμενα τετράγωνα, για να μετακινούμαστε ανάμεσα στις επαρχίες και να γίνεται καλύτερη αναζήτηση συγκέντρωσης κρουσμάτων. Σε κάθε τετράγωνο μπορεί να περιλαμβάνονται 2 ή 3 επαρχίες και έτσι η περιοχή που θα ανεβρεθεί μπορεί να ανήκει σε 3 διαφορετικές επαρχίες. Η επίπτωση σε κάθε τετράγωνο υπολογίζεται με βάση τα χωριά που περιλαμβάνονται και χρωματίζονται ανάλογα. Για να διαπιστωθεί, αν μια περιοχή (τετράγωνο ή επαρχία) έχει στατιστικά σημαντικά υψηλότερη επίπτωση από της υπόλοιπες, μπορεί να εφαρμοστούν διάφορες στατιστικές μέθοδοι (χ^2 test for heterogeneity, Autocorrelation and Baysien statistics). Σε αυτή τη μελέτη χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία χ^2 test for heterogeneity με την οποία ελέγχεται εάν η παρατηρηθείσα επίπτωση σε κάθε επαρχία ή τετράγωνο διαφέρει στατιστικά σημαντικά από την αναμενόμενη. Σαν αναμενόμενη επίπτωση σε κάθε περιοχή μπορεί να ορισθεί η μέση τιμή.



Σχήμα 6,7: Χρησιμοποιώντας αυξομειούμενα τετράγωνα μαζί με ταυτόχρονη μεγέθυνση της περιοχής, παρέχεται η δυνατότητα να αναζητηθούν περιοχές με αυξημένη επίπτωση σε όλη την Κύπρο. Με αυτό τον τρόπο μετακινούμαστε ανάμεσα στα όρια των επαρχιών και

ελέγχουμε περιοχές που υπάγονται διοικητικά σε 2 η 3 επαρχίες.

ΠΡΩΤΗ ΦΑΣΗ

Βασικός στόχος της πρώτης φάσης του προγράμματος ήταν, με βάση τη χρησιμοποίηση επιδημιολογικών δεδομένων σε ανθρώπους και ζώα, η εντόπιση περιοχών υψηλού κινδύνου.

Στα πλαίσια της πρώτης φάσης πραγματοποιήθηκαν:

Η οροεπιδημιολογική μελέτη σε ανθρώπινο πληθυσμό

Η οροεπιδημιολογική μελέτη στα ζώα

Η ανίχνευση *C.burnetii* σε κρότωνες

Η χρησιμοποίηση μηχανογραφημένης χαρτογράφησης σε επίπεδο χώρας και μικρής περιοχής

Ο σχεδιασμός της Πρώτης Φάσης περιελάμβανε τη δειγματοληψία από ανθρώπινο πληθυσμό (παιδιά και ενήλικες) και από ζωικό πληθυσμό (αίγες, πρόβατα, βοοειδή) από διάφορες περιοχές της Κύπρου. Ταυτόχρονα, κατεβλήθη προσπάθεια συλλογής κροτώνων που παρασιτούν στα ζώα. Όλα τα αποτελέσματα των επί μέρους επιδημιολογικών μελετών αναλύθηκαν με τη βοήθεια του ΠΜΧ και του επιδημιολογικού πακέτου Epi-info με σκοπό να υπολογισθούν τα πιο κάτω:

Οροθετικότητα σε ανθρώπους και ζώα

Αναζήτηση των παραγόντων κινδύνου

Αναγνώριση ενδημικών περιοχών

Εντόπιση περιοχών υψηλού κινδύνου

ΟΡΟΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΥ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥ

Δειγματοληψία από ανθρώπινο πληθυσμό

Με βάση τα στοιχεία του πληθυσμού που παραχωρήθηκαν από τη στατιστική υπηρεσία της Κυπριακής Δημοκρατίας, έγινε διαχωρισμός των ελεύθερων περιοχών της Κύπρου στις επαρχίες: Λευκωσίας, Λεμεσού, Λάρνακας, Αμμοχώστου και Πάφου.

Στη συνέχεια καταγράφηκαν τα χωριά και οι κάτοικοι ανά επαρχία και έγινε αδρός διαχωρισμός σε αστικές, ημιαστικές και αγροτικές περιοχές. Ο αστικός πληθυσμός της Κύπρου υπολογίστηκε κατά προσέγγιση σε 283.000, ο ημιαστικός πληθυσμός σε 68.000 και ο αγροτικός (γεωργοκτηνοτροφικός) πληθυσμός σε 244.000.

Χρησιμοποιώντας το επιδημιολογικό πακέτο Epi-info υπολογίστηκε το απαιτούμενο δείγμα ανά περιοχή. Με βάση τη διεθνή βιβλιογραφία θεωρήθηκε σαν αναμενόμενος επιπολασμός το 5% (1%-9%) στις αστικές περιοχές, το 10% (5%-15%) για τις ημιαστικές και το 15% (10%-20%) για τις γεωργοκτηνοτροφικές. Σαν όριο αξιοπιστίας χρησιμοποιήθηκε το 95%.

Με βάση τα πιο πάνω, το τυχαίο δείγμα ανά ομάδα πληθυσμού υπολογίστηκε ως ακολούθως:

Δείγμα Αστικού πληθυσμού = 114

Δείγμα Ημιαστικού πληθυσμού = 138

Δείγμα Γεωργοκτηνοτροφικού πληθυσμού = 196

Επειδή έγινε στρωματοποιημένη δειγματοληψία ανά περιοχή, το υπολογισθέν δείγμα πολλαπλασιάστηκε περίπου με τον συντελεστή 1,5 προσεγγίζοντας το συνολικό απαιτούμενο αριθμό των 600 δειγμάτων.

Τα δείγματα συλλέχθηκαν από πέντε επαρχίες της Κύπρου, από 50 περιοχές (πόλεις-χωριά) που επιλέχθηκαν τυχαία με τη βοήθεια του προγράμματος μηχανογραφημένης χαρτογράφησης. Με βάση το ΠΜΧ, το δείγμα κατανεμήθηκε ως εξής:

1. Δείγμα Αστικού Πληθυσμού: 120

Αστικός πληθυσμός Λευκωσίας	30
Αστικός πληθυσμός Λεμεσού	30
Αστικός πληθυσμός Λάρνακας	30
Αστικός πληθυσμός Πάφου	30

2. Δείγμα Ημιαστικού πληθυσμού: 125

α) Ημιαστικός πληθυσμός περιοχής Λευκωσίας (Λακατάμα, Λατσιά, Τσέρι, Αγλατζιά, Καϊμακλί)	25
β) Ημιαστικός πληθυσμός περιοχής Λεμεσού (Γερμασόγεια, Μέσα Γειτονιά, Υψωνας)	25
γ) Ημιαστικός πληθυσμός περιοχής Λάρνακας (Κίτι, Άγιοι Ανάργυροι)	25
δ) Ημιαστικός πληθυσμός περιοχής Αμμοχώστου (Παραλίμνι)	25
ε) Ημιαστικός πληθυσμός περιοχής Πάφου (Πισούρι, Γεροσκήπου)	25

3. Δείγμα Γεωργοκτηνοτροφικού πληθυσμού =375

α) Περιοχή Λευκωσίας (από : Λύμπια, Γέρι, Δάλι, Ακάκι, Περιστερεώνας, Κοτσιάτης, Μένικο, Νικητάρι, Ευρύχου)	75
β) Περιοχή Λεμεσού (από: Αυδήμου, Κορφή, Παραμάλι, Πάχνα, Σούνι, Αρμενοχώρι, Πισσούρι, Δορά, Καντού)	75
γ) Περιοχή Λάρνακας (από: Αραδίππου, Πύλα, Κοφίνου, Σκαρίνου, Αλεθρικό, Κελιά, Κυβισίλι, Αβδελερό)	75
δ) Περιοχή Αμμοχώστου (από: Ορμήδεια, Αυγόρου, Δασάκι, Σωτήρα)	45
ε) Περιοχή Πάφου	

Σύνολο υπολογισθένος δείγματος = 620

Η επιλογή των συμμετεχόντων έγινε τυχαία μέσα από καταλόγους κατοίκων κάθε χωριού ή πόλης που επιλέχθηκε με το ΠΜΧ. Στη φάση αυτή τελικά περιλήφθηκαν 583 άνθρωποι, αντί 620 που είχαν προγραμματιστεί λόγω άρνησης συμμετοχής.

Σύμφωνα με το καταρτισθέν αναλυτικό πρωτόκολλο αιμοληψίας, από τους 583 συμμετέχοντες ελήφθη από 411 αίμα χωρίς αντιπηκτικό, το οποίο μετά την πήξη του φυγοκεντρήθηκε και ο ορός διαμοιράστηκε εξίσου σε 3 σωληνάρια.

Ενημερώθηκε το μηχανογραφημένο ερωτηματολόγιο του κάθε ατόμου από τον συνεργαζόμενο ιατρό. Ο κωδικός αριθμός που αναγράφηκε στο δείγμα αίματος και στα σωληνάρια αναγράφηκε και στο ερωτηματολόγιο.

Οι οροί φυλάχθηκαν στην κατάψυξη μέχρι την παραλαβή τους από τις Κτηνιατρικές Υπηρεσίες για τη διεξαγωγή των εργαστηριακών αναλύσεων.

Για το κάθε δείγμα από ανθρώπινο πληθυσμό συμπληρώθηκε ειδικό ερωτηματολόγιο για συλλογή όλων των στοιχείων και παραγόντων οι οποίοι είναι δυνατό να σχετίζονται με τη μετάδοση του νοσήματος. Συγκεκριμένα περιλήφθηκαν πληροφορίες που αφορούσαν τον συμμετέχοντα σχετικά με: φύλο, ηλικία, επάγγελμα, διαμονή, τύπος κατοικίας, ιδιοκτησία κήπου, χρήση κοπριάς στον κήπο, ιδιοκτησία κατοικίδιων ζώων (σκύλος, γάτα, πρόβατα, βοοειδή, κουνέλια) καθώς και η κατανάλωση μη παστεριωμένου γάλακτος.

Ειδικά σε σχέση με το επάγγελμα ο πληθυσμός χωρίστηκε σε τρεις ομάδες:

ΕΡΓ1: Κτηνοτρόφοι, κτηνίατροι, σφαγείς

ΕΡΓ2: Γεωργοκτηνοτρόφοι

ΕΡΓ3: Καμία σχέση με τα ζώα

ΜΕΛΕΤΗ ΠΥΡΕΤΟΥ Q ΣΤΗΝ ΚΥΠΡΟ

**ΕΡΩΤΗΜΑΤΟΛΟΓΙΟ
(ΑΤΟΜΑ ΑΠΟ ΓΕΝΙΚΟ ΠΛΗΘΥΣΜΟ)**

ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ ΔΙΕΥΘ.....
1. Αστική 1. Ισόγειο
ΤΗΛΕΦΩΝΟ ΔΙΑΜΟΝΗ 2. Ημιαστική ΟΙΚΙΑ 2. Διαμέρισμα
3. Γεωργοκτηνοτροφική
1. Άρρεν 1. Κτηνοτρόφοι, Κτηνίατροι,
Σφαγείς
ΦΥΛΟ 2. Θήλυ ΗΛΙΚΙΑ ΕΠΑΓΓΕΛΜΑ 2. Γεωργοκτηνοτρόφοι
3. Καμία σχέση με τα ζώα
ΚΗΠΟΣ ΚΟΠΡΙΑ ΣΤΟΝ ΚΗΠΟ

ΚΑΤΟΙΚΙΔΙΑ ΖΩΑ

ΣΚΥΛΟΣ ΤΣΙΒΙΤΖΙΑ ΑΡΡΩΣΤΟ ΠΡΟΣΔ.....
ΓΑΤΑ ΤΣΙΒΙΤΖΙΑ ΑΡΡΩΣΤΟ ΠΡΟΣΔ.....

ΆΛΛΑ ΖΩΑ

ΑΙΓΟΠΡΟΒΑΤΑ ΤΣΙΒΙΤΖΙΑ ΑΡΡΩΣΤΟ ΠΡΟΣΔ.....
ΒΟΟΕΙΔΗ ΤΣΙΒΙΤΖΙΑ ΑΡΡΩΣΤΟ ΠΡΟΣΔ.....
ΚΟΥΝΕΛΙΑ ΤΣΙΒΙΤΖΙΑ ΑΡΡΩΣΤΟ ΠΡΟΣΔ.....

ΔΙΑΙΤΗΤΙΚΕΣ ΣΥΝΗΘΕΙΕΣ

ΑΒΡΑΣΤΟ ΓΑΛΛΑ

ΟΡΟΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΖΩΙΚΟΥ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥ

Δειγματοληψία από ζώα

Με βάση τα στοιχεία των Κτηνιατρικών Υπηρεσιών της Κυπριακής Δημοκρατίας που αφορούν τα αιγοπρόβατα και τα βοοειδή, έγινε διαχωρισμός των ελεύθερων περιοχών της Κύπρου στις επαρχίες: Λευκωσίας, Λεμεσού, Λάρνακας, Αμμοχώστου και Πάφου.

Ο σχεδιασμός περιελάμβανε τη δειγματοληψία από αίγες, πρόβατα και αγελάδες, καθώς επίσης και συλλογή κροτώνων από τα ίδια χωριά από τα οποία έγινε συλλογή δειγμάτων από τον ανθρώπινο πληθυσμό των γεωργοκτηνοτροφικών περιοχών για να υπάρχει αντιστοιχία και δυνατότητα σύγκρισης παραγόντων και επιπολασμού.

Ο πληθυσμός των ζώων στις γεωργοκτηνοτροφικές αυτές περιοχές υπολογίστηκε σε 179.116 αίγες, 188.879 πρόβατα και 3.785 βοοειδή.

Θεωρώντας σαν αναμενόμενο επιπολασμό της νόσου $5\% \pm 3\%$ για τα αιγοπρόβατα και $5\% \pm 4\%$ για τα βοοειδή υπολογίστηκε το δείγμα με τη βοήθεια του επιδημιολογικού πακέτου Epi-info, με υπολογισμό της αντιπροσωπευτικότητας του δείγματος ανά περιοχή, με όρια αξιοπιστίας 95%.

Στη μελέτη περιλήφθηκε δείγμα από τις 5 επαρχίες της Κύπρου και συγκεκριμένα από 39 γεωργοκτηνοτροφικά χωριά που επιλέγησαν τυχαία με τη βοήθεια του προγράμματος μηχανογραφημένης χαρτογράφησης. Το υπολογισθέν δείγμα αιγοπροβάτων πολλαπλασιάστηκε με το συντελεστή 2 για να καλυφθεί η γεωργοκτηνοτροφική αιμοληψία.

Επειδή τα βοοειδή στην Κύπρο είναι συγκεντρωμένα σε συγκεκριμένες περιοχές, το υπολογισθέν δείγμα δεν πολλαπλασιάστηκε με το συντελεστή 2.

Με βάση το Π.Μ.Χ., το δείγμα κατανεμήθηκε ως εξής:

	Αίγες	Πρόβατα	Βοοειδή
A) Επαρχία Λευκωσίας (από: Λύμπια, Γέρι, Δάλι, Ακάκι, Περιστερώνας, Κοτσιάτης, Μένικο, Νικητάρι, Ευρύχου)	100	100	50
B) Επαρχία Λεμεσού (από: Αραδίππου, Πύλα, Κοφίνου, Σκαρίνου, Αλεθρικό, Κελιά, Κυβισίλι, Αβδελερό)	80	80	10
Δ) Επαρχία Αμμοχώστου (από: Ορμήθεια, Αυγόρου, Δασάκι, Σωτήρα)	40	40	50
E) Επαρχία Πάφου (από: Αναρίτα, Δρούσια, Κελοκέδαρα, Κούκλια, Τιμή, Τραχηπέδουλα, Αρχιμανδρίτα, Μανδριά, Αρόδες)	100	100	10
Σύνολο υπολογισθέντος δείγματος ζώων	420	420	110

Τελικά στη μελέτη συμπεριλήφθηκαν 960 πρόβατα και βοοειδή: 414 αίγες, 472 πρόβατα και 74 βοοειδή.

Για το κάθε ζώο που συμπεριλήφθηκε στη μελέτη συμπληρώθηκε ειδικό ερωτηματολόγιο που περιελάμβανε όλες τις χρήσιμες πληροφορίες και παράγοντες κινδύνου, οι οποίοι δυνατόν να σχετίζονται με τη μετάδοση του νοσήματος στα ζώα. Συγκεκριμένα, περιλήφθηκαν πληροφορίες σχετικές με την κατάσταση υποστατικού ενσταυλισμού, ηλικία ζώου, είδος ζώου, την υγεία του ζώου (παρασίτωση, αγαλαξία, αποβολή, στειρότητα) και το χρόνο εμφάνισης οποιουδήποτε συμπτώματος.

ΜΕΛΕΤΗ ΠΥΡΕΤΟΥ Q ΣΤΗΝ ΚΥΠΡΟ

ΕΡΩΤΗΜΑΤΟΛΟΓΙΟ (ΔΕΙΓΜΑ ΑΠΟ ΖΩΑ)

ΟΝ/ΝΥΜΟ ΙΔΙΟΚΤΗΤΗ ΔΙΕΥΘ..... Τηλ.

ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΥΠΟΣΤΑΤΙΚΩΝ ΖΩΟΥ 1. Καλή
 2. Μέτρια ΑΡΙΘ. ΖΩΩΝ ΗΛΙΚΙΑ

3. Κακή

ΕΙΔΟΣ 1. ΑΙΓΕΣ
 2. ΠΡΟΒΑΤΑ
 3. ΒΟΟΕΙΔΗ
 4. ΣΚΥΛΟΣ
 5. ΓΑΤΑ

ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΤΩΝ ΖΩΩΝ

ΤΣΙΒΙΤΖΙΑ		ΠΟΤΕ
ΑΓΑΛΛΞΙΑ		ΠΟΤΕ
ΑΠΟΒΟΛΗ		ΠΟΤΕ
ΣΤΕΙΡΟΤΗΤΑ		ΠΟΤΕ

μήνας / χρόνος	

Σύμφωνα με το καταρτισθέν πρωτόκολλο δειγματοληψίας από κάθε ζώο που περιλήφθηκε στη μελέτη λήφθηκαν 4ml αίματος σε σωληνάριο χωρίς αντιπηκτικό. Μετά την πήξη του φυγοκεντρήθηκε και διαχωρίστηκε ο ορός σε 3 σωληνάκια τα οποία φυλάχθηκαν στην κατάψυξη -20^o μέχρι την εξέτασή τους. Ειδικοί κωδικοί αριθμοί που τυπώθηκαν σε ετικέτες χρησιμοποιήθηκαν για τη συσχέτιση ορών, ερωτηματολογίου, και αποτελεσμάτων.

ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΗΣ *C.BURNETTII* ΣΕ ΚΡΟΤΩΝΕΣ

Από το σχεδιασμό της μελέτης και σύμφωνα με το καταρτισθέν πρωτόκολλο συλλογής κροτώνων από αιγοπρόβατα και βοοειδή, επιδιώχθηκε συλλογή κροτώνων με στόχο την πιθανή ανίχνευση *C.burnettii* σε αυτούς ώστε να εκτιμηθεί ο κίνδυνος μετάδοσης του νοσήματος από ζώο σε ζώο και από τα ζώα στον άνθρωπο. Από τα ίδια αιγοπρόβατα και βοοειδή που συλλέχθηκαν δείγματα αίματος, κατεβλήθη προσπάθεια να ανευρεθούν και να συλλεχθούν παρασιτούντες κρότωναes. Από τα ζώα αυτά όπου υπήρχαν κρότωναes, συλλέχθηκαν 6-9 και τοποθετήθηκαν ανά 2-3 αντίστοιχα σε 3 σωληνάκια και φυλάχθηκαν σε υγρό άζωτο.

Ο κωδικός που αναγράφεται στα σωληνάκια με κρότωναes ήταν ο ίδιος κωδικός του ζώου από το οποίο είχαν συλλεχθεί για να είναι δυνατή η σύγκριση της ανίχνευσης *C.burnettii* στους κρότωναes με την πιθανή οροθετικότητα του ζώου στο οποίο παρασιτούσαν. Τελικά έγινε δυνατή η συλλογή 141 κροτώνων: 131 του γένους *Rhipicephalus* και 10 του γένους *Hyalomma*. Οι κρότωναes αποστάληκαν στην Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου της Κρήτης μέσα σε υγρό άζωτο για να γίνει προσπάθεια ανίχνευσης *C.burnettii* με τη μέθοδο του PCR και απομόνωσης με την shell-vial technique.

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΕΞΕΤΑΣΕΙΣ ΠΡΩΤΗΣ ΦΑΣΗΣ

Ακολουθήθηκαν με λεπτομέρεια τα αναλυτικά πρωτόκολλα των δειγματοληψιών με αποτέλεσμα να φθάνουν στα Εργαστήρια Κτηνιατρικών Υπηρεσιών όλα τα δείγματα αίματος και κροτώνων με την ορθή σήμανσή τους.

Στη συνέχεια, όλοι οι οροί από ανθρώπινο πληθυσμό και από τα ζώα εξετάστηκαν με τη μέθοδο του Έμμεσου Ανοσοφθορισμού (IFA) σύμφωνα με το καταρτισθέν και πάλι λεπτομερές πρωτόκολλο (ακολουθεί). Οι οροί από ανθρώπους εξετάστηκαν αρχικά στην πρώτη αραίωση για IgG αντισώματα της *C.burnettii* και στη συνέχεια, εφόσον ήταν θετικοί, προσδιορίστηκε ο ακριβής τίτλος και ο τίτλος των αντισωμάτων IgM και IgA.

Οι οροί από τα ζώα εξετάστηκαν αρχικά στην πρώτη αραίωση για IgG αντισώματα και, εφόσον ήταν θετικοί, προσδιορίστηκε ο ακριβής τίτλος IgG αντισωμάτων.

Οι συλλεχθέντες κρότωναes απεστάλησαν στην Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Κρήτης σε υγρό άζωτο. Για την γονοτυπική ανίχνευση της *C.burnettii* χρησιμοποιήθηκαν η τεχνική της nested PCR, για την γονοτυπική ταυτοποίηση ο συνδυασμός των μεθόδων PCR-RLFP. Για την άμεση ανίχνευση και απομόνωση χρησιμοποιήθηκε η shell-vials technique.

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΑ

Έμμεσος ανοσοφθορισμός (Indirect immunofluorescence)

Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος βασίζεται στην καθήλωση της σεσημασμένης με φθορίζουσα ουσία αντιανθρώπινης σφαιρίνης πάνω στο σύμπλεγμα αντιγόνου- αντισώματος.

Υλικά

Αντιγόνο της *C.burnettii*

IgG και IgM αντι-ανθρώπινα αντισώματα αίγας συλεγμένα με fluorescein isothiocyanate Rheumatoid Factor absorbent για προσδιορισμούς IgM

Γλυκερόλη

Αιθανόλη 70%

Ακετόνη

Σκόνη μη λιπαρού γάλακτος

Διάλυμα Phosphate Buffer Saline (PBS)

Na Cl	20,0 gr
KCl	0,5 gr
Na ₂ HPO ₄	2,87 gr
KH ₂ PO ₄	0,5 gr
H ₂ O qsp	2 lt

Διαδικασία

Οι πλάκες ανοσοφθορισμού εμβαπτίζονται σε αιθανόλη 70% για 5 λεπτά και καθαρίζονται με μαλακή πετσέτα

Το αντιγόνο τοποθετείται στις πλάκες ανοσοφθορισμού με τη βοήθεια λεπτής πένας

Ξήρανση

Το αντιγόνο σταθεροποιείται με εμβάπτιση των πλακών σε ακετόνη για 10 λεπτά

Ξήρανση

Προετοιμάζονται διαδοχικές αραιώσεις των ορών με PBS εμπλουτισμένο με 3% σκόνη μη λιπαρού γάλακτος (PBS 3%)

Για προσδιορισμός IgG αρχική αραιώση 1/60

IgM 1/25

IgA 1/25

Ειδικά για τον προσδιορισμό IgM οι αραιώσεις των ορών επωάζονται για 10 λεπτά με Rheumatoid Factor absorbent

20 ml κάθε αραιώσης τοποθετούνται στις υποδοχές των αντικειμενοφόρων πλακών

Η πλάκα επωάζεται για 30 λεπτά στους 37°C με υγρασία

Ακολουθούν δύο δεκάλεπτες πλύσεις με PBS και μία με νερό

Ξήρανση

Τα φθορίζοντα αντισώματα αραιώνονται (1/300) με τη βοήθεια μίγματος Blue Evans (50μl Blue Evans και 50ml PBS 3%)

20 μl κάθε αραιώσης τοποθετείται στις υποδοχές των πλακών

Επώαση 30 λεπτών στους 37°C με υγρασία

Ακολουθούν δύο 10λεπτες πλύσεις με PBS και μία με νερό

Ξήρανση

Προστίθενται μερικές σταγόνες γλυκερόλης στις πλάκες και επικαλύπτονται με καλυπτρίδα, αποφεύγοντας τη δημιουργία φυσαλίδων

Παρατήρηση της πλάκας στο μικροσκόπιο ανοσοφθορισμού.

Οι ρικέτσιες φθορίζουν πράσινες

Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) και nested PCR στην ανίχνευση της *C.burnettii* σε buffy coat και κρότωνα

Το PCR είναι εργαστηριακή μέθοδος σύνθεσης νουκλεϊκών οξέων κατά την οποία αντιγράφεται ένα συγκεκριμένο τμήμα του DNA (όπως έχει αναφερθεί στο γενικό μέρος της παρούσας εργασίας).

Το PCR με τη χρήση του ζεύγους των εναρκτών CB1 και CB, οι οποίοι κωδικοποιούν μια αλληλουχία 257 ζευγών βάσεων του γενώματος της υπεροξειδικής δισμουτάσης (Superoxide Dismutase) της *C.burnettii*, ανιχνεύουν την *C.burnettii* όταν η συγκέντρωσή της στο δείγμα είναι από 10 μικροοργανισμούς και πάνω (κυτταροκαλλιέργειες). Επειδή στα κλινικά δείγματα ο μικροοργανισμός μπορεί να υπάρξει σε μικρότερη συγκέντρωση, η ανίχνευσή του γίνεται με τη χρήση του nested PCR το οποίο είναι ικανό να ανιχνεύσει από ένα μικροοργανισμό και πάνω.

Η μέθοδος περιλαμβάνει δύο επαναλαμβανόμενα PCR και ολιγονουκλεοτιδικούς εναρκτές (primers), οι οποίοι προέρχονται από ομόλογες περιοχές των πλασμιδίων της *C.burnettii* οξείας και χρόνιας φάσης. Για το πρώτο PCR το ζευγάρι εναρκτών είναι οι Hfrag1 και Hfrag2 οι οποίοι κωδικοποιούν μια αλληλουχία 508 ζευγών βάσεων. Το προϊόν από το πρώτο PCR που τις περισσότερες φορές είναι αρνητικό πολλαπλασιάζεται με ένα δεύτερο PCR χρησιμοποιώντας το ζευγάρι εναρκτών HF1 και HF2 οι οποίοι κωδικοποιούν μια αλληλουχία

183 ζευγών βάσεων. Οι εναρκτές και στα δύο PCR προσδένονται στα άκρα του τμήματος του DNA που θα αντιγραφεί και μετά από 35 επαναλαμβανόμενους κύκλους πολλαπλασιασμού του DNA για κάθε PCR παίρνουμε το επιθυμητό αποτέλεσμα.

Πενήντα μl λειοτριβιθέντων κροτώνων χρησιμοποιήθηκαν για την εξαγωγή του DNA. Το δείγμα επώαστηκε στην παρουσία 400mg/ml στους 56°C. Στη συνέχεια, η πρωτεϊνάση K αδρανοποιήθηκε με βρασμό για 10 λεπτά στους 22°C. Η υπερκείμενη στοιβάδα διατηρήθηκε στους -20°C.

Εφαρμογή της Shell-vial technique στην απομόνωση της *C.burnettii* από buffy coat από αίμα και από κρότωνα

Η τεχνική των shell-vials

Η τεχνική περιλαμβάνει τη φυγοκέντρηση του πλάσματος, αιμόλεμφου ή σώματος κρότωνα σε shell-vials τα οποία περιέχουν ένα μικρό υάλινο δίσκο όπου έχει επιστρωθεί ταπήτιο κυττάρων HEL (Διπλοειδή κύτταρα μορφής ινοβλαστών).

Πρωτόκολλο απομόνωσης

Οι χειρισμοί γίνονται σε θάλαμο νηματικής ροής ώστε να μειωθεί ο κίνδυνος επιμόλυνσης. Θρυψινοποιείται η φλάσκα με τα κύτταρα HEL και διανέμεται σε κάθε shell-vials 1ml κυτταρικού υλικού.

Τα shell-vials τοποθετούνται σε κλίβανο 37°C, σε ατμόσφαιρα 5% CO₂ για διάστημα 3 ημερών μέχρι το σχηματισμό κυτταρικού ταπητίου.

Buffy coat

Απορρίπτεται το υπερκείμενο από 2 shell vial με Hel ή Vero κύτταρα 0,5ml από κάθε δείγμα πλάσματος αναμεμιγμένο με 0,5 ml θρεπτικού υλικού ενοφθαλμίζονται σε κάθε shell-vials

Ακολουθεί φυγοκέντρηση των shell-vials για μία ώρα στα 700 g και 22°C

Αιμόλεμφος

Κόβεται το μπροστά αριστερό πόδι του κρότωνα ώστε να απελευθερωθεί αιμόλεμφος. Τοποθετείται η σταγόνα της αιμόλεμφου σε 300μl MEM στο οποίο έχουν προστεθεί 50μg/ml sulphamehtoxazole, 200μg/ml gentamycin, 1,5μg/ml amphotericin B και αναμιγνύεται. Απορρίπτεται το υπερκείμενο από 2 shell-vial με Hel ή Vero κύτταρα και μεταφέρονται 150μl του μίγματος αιμόλεμφου σε κάθε shell-vial

Ακολουθεί φυγοκέντρηση των shell-vials για μία ώρα στα 700g και 22°C.

Σώμα κρότωνα

Μετά την απολύμανση του κρότωνα σε ιωδιούχο αλκοόλη και την πλύση του σε στείρο νερό, τοποθετείται σε περίπου 500μl MEM με αντιβιοτικά (όπως παραπάνω) και συνθλίβεται. Από αυτά 200μl περίπου μεταφέρονται σε κάθε shell-vial για απομόνωση. Ακολουθεί φυγοκέντρηση των shell-vials για μία ώρα στα 700g και 22°C. Και στις 3 παραπάνω περιπτώσεις μετά τη φυγοκέντρηση του δείγματος ακολουθεί προσθήκη 1ml νέου θρεπτικού υλικού σε κάθε shell-vials και επώαση στους 37°C.

Η επιτυχία της απομόνωσης ελέγχεται με IFA ή χρώση Gimenez κάθε 7 ημέρες

Μετά την παρατήρηση της *Coxiella burnettii* προχωρούμε στην θρυψινοποίηση των θετικών shell-vials.

Θρυψινοποίηση των θετικών shell-vials

ΥΛΙΚΑ

Rinaldini

Θρυψίνη

Θρεπτικό υλικό (MEM 4%)

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Απορρίπτεται το υπερκείμενο του shell-vial

Το ταπήτιο πλένεται με Rinaldini

Προστίθεται 0,2ml θρυψίνης

Ακολουθεί επώαση λίγων λεπτών στους 37°C

Το shell-vial αναδεύεται έντονα, ώστε να αποκολληθούν τα κύτταρα

Προστίθεται 0,8 ml θρεπτικού υλικού 4%

Το εναιώρημα μεταφέρεται σε φλάσκα των 25cm², που περιέχει 5ml θρεπτικού υλικού 4%
Η φλάσκα επωάζεται στους 35°C/5%CO₂ με ανοικτό καπάκι και μετά 24 ώρες στους 35°C με κλειστό καπάκι.

Η ανίχνευση *C.burnettii* ελέγχεται με τη χρώση Gimenez και PCR μετά από 7 ημέρες. Η κυτταροπαθογόνος δράση της *C.burnettii* φαίνεται μετά από ένα μήνα επώασης της μολυσμένης φλάσκας στους 35°C. Ακολουθεί μαζική καλλιέργεια του στελέχους (όπως έχει αναφερθεί στο γενικό μέρος της παρούσας εργασίας).

Επιβεβαίωση της ύπαρξης της *C.burnettii* σε κυτταρικές σειρές με τη χρώση Gimenez **Αρχή της μεθόδου**

Η βασική φουξίνη χρωματίζει κόκκινα τα κύτταρα, τις ρικέτσιες και το υπόστρωμα.

Ακολουθεί επίδραση του πράσινου του μαλαχίτη που έχει μεγαλύτερη συγγένεια για τα κύτταρα και το υπόστρωμα παρά για τις ρικέτσιες. Με τον τρόπο αυτό η βασική φουξίνη παραμένει μόνο στις ρικέτσιες, οι οποίες εμφανίζονται κόκκινες. Τα κύτταρα διατηρούν το πράσινο χρώμα, ενώ το υπόστρωμα αποκτά ανοικτή πράσινη χροιά.

Μετά 3 με 5 ημέρες από τη μόλυνση των flasks, γίνεται δειγματοληψία του κυτταρικού τάπητα και του υπερκείμενου. Με τη βοήθεια της χρώσης Gimenez εκτιμάται ο βαθμός της μόλυνσης της flask.

Διαλύματα

Βασική φουξίνη: 10gr φουξίνης σε 100ml καθαρής αιθανόλης, 11,25gr φαινόλης σε 250ml H₂O. Ακολουθεί η ανάμειξη των δύο διαλυμάτων και προσθήκη 650ml H₂O. (Το διάλυμα διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου για 1 χρόνο).

Πράσινο του μαλαχίτη 0,8%: 2gr οξαλικού μαλαχίτη σε 250ml H₂O. (Το διάλυμα διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου για 4 μήνες)

Ρυθμιστικό διάλυμα:
3,5 ml NaH₂PO₄ (0,2M)
15,5 ml NaHPO₄ (0,2M)
19 ml H₂O αποσταγμένο

Διαδικασία

Αναμιγνύονται 2ml βασικής φουξίνης και 5ml ρυθμιστικού διαλύματος

Ακολουθεί φιλτράρισμα του διαλύματος

Τα μολυσμένα κύτταρα ή καθαρό αντιγόνο τοποθετείται σε αντικειμενοφόρο πλάκα

Μετά το στέγνωμα της πλάκας σε θερμοκρασία δωματίου ακολουθεί χρώση της με το διάλυμα της βασικής φουξίνης για 3 λεπτά

Έπειτα ακολουθεί πλύση της πλάκας με H₂O βρύσης

Η πλάκα χρωματίζεται με διάλυμα του πράσινου μαλαχίτη για 9 δευτερόλεπτα

Ακολουθεί πλύση της πλάκας με H₂O βρύσης και ξανά χρώση της με το διάλυμα του πράσινου μαλαχίτη για 9 δευτερόλεπτα

Η πλάκα πλύνεται με H₂O βρύσης και στεγνώνεται ανάμεσα σε δύο φύλλα απορροφητικού χαρτιού. Ακολουθεί έπειτα παρατήρηση της πλάκας με καταδυτικό φακό σε οπτικό μικροσκόπιο.

Η *C.burnettii* εμφανίζεται φούξια σε πράσινο κυτταρικό φόντο.

ΔΕΥΤΕΡΗ ΦΑΣΗ

Αφού συμπληρώθηκαν όλες οι εργαστηριακές εξετάσεις της Πρώτης Φάσης, αναλύθηκαν όλα τα συλλεχθέντα στοιχεία με τη βοήθεια του ΠΜΧ και του επιδημιολογικού πακέτου epi-info, εκτιμήθηκαν τα αποτελέσματα ανίχνευσης *C.burnettii* στους κρότωνες, η οροθετικότητα σε ανθρώπους και ζώα και η ύπαρξη παραγόντων κινδύνου, με αποτέλεσμα να εντοπισθούν ενδημικές περιοχές και περιοχές υψηλού κινδύνου για την εμφάνιση κρουσμάτων πυρετού Q. Με τη διαδικασία αυτή επιλέγησαν τα χωριά Παραμάλι στην επαρχία Πάφου και Κωτσιάτης στην επαρχία Λευκωσίας για να γίνει αναλυτική επιδημιολογική διερεύνηση σε ανθρώπους

και ζώα.

Στόχοι της δεύτερης φάσης του προγράμματος ήταν να αναζητηθούν παράγοντες κινδύνου, καθώς επίσης να εκτιμηθεί η οροθετικότητα και η επίπτωση του νοσήματος καθώς και η παθογόνος δράση στην *C. burnettii* στις συγκεκριμένες περιοχές. Για να επιτευχθούν οι στόχοι της δεύτερης φάσης έγιναν τα πιο κάτω:

Οροεπιδημιολογική μελέτη σε ανθρώπους και ζώα

Ανίχνευση κλινικών περιπτώσεων σε ανθρώπους και ζώα

Η φάση αυτή υποστηρίχθηκε μηχανογραφικά χρησιμοποιώντας το ΠΜΧ σε επίπεδο χωριού τόσο στην οροεπιδημιολογική μελέτη όσο και στην ανίχνευση κλινικών περιπτώσεων.

ΟΡΟΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΣΕ ΑΝΘΡΩΠΟΥΣ ΚΑΙ ΖΩΑ ΣΕ ΠΕΡΙΟΧΕΣ ΥΨΗΛΟΥ ΚΙΝΔΥΝΟΥ.

Ελήφθησαν τοπογραφικά των χωριών και έγινε αντιστοιχία σπιτιών-κατοίκων καθώς και όλων των επιδημιολογικών παραμέτρων που σχετίζονται με το νόσημα (σταύλοι, ζώα κλπ.). Σαν συμμετέχοντες στη μελέτη θεωρήθηκαν όλοι οι κάτοικοι των δύο χωριών και όλες οι κτηνοτροφικές μονάδες.

Για τη συλλογή πληροφοριών που σχετίζονται με παράγοντες κινδύνου για το νόσημα καθώς και συμπτώματα συμβατά με την κλινική εικόνα του νοσήματος, καταγράφηκαν οι παρακάτω λεπτομερείς πληροφορίες μέσα στο ειδικό ερωτηματολόγιο:

φύλο, ηλικία, επάγγελμα, αριθμός ατόμων στην κατοικία, ύπαρξη κήπου, χρήση κοπριάς, ιδιοκτησία σκύλου, γάτου και η υγεία τους, ιδιοκτησία αιγοπροβάτων ή βοοειδών και η υγεία τους, ατομικό ιστορικό για εξάνθημα, πυρετό αγνώστου αιτιολογίας, πνευμονία, κρότνες στο σώμα, ατομική υγιεινή και διατροφικές συνήθειες.

Ορίστηκε ημέρα δειγματοληψίας και ειδικές ομάδες εργασίας επισκέφθηκαν όλες τις οικίες των δύο χωριών όπου λήφθηκαν οι πληροφορίες για συμπλήρωση του ερωτηματολογίου και έγινε η αιμοληψία από τους οικειοθελώς συμμετέχοντες. Ακολουθήθηκε το ίδιο πρωτόκολλο αιμοληψίας όπως και της πρώτης φάσης.

Παράλληλα, ειδικά συνεργεία των Κτηνιατρικών Υπηρεσιών επισκέφθηκαν τις κτηνοτροφικές μονάδες των δύο χωριών και προέβηκαν σε δειγματοληψία συμπληρώνοντας και πάλι ειδικό ερωτηματολόγιο από τους ιδιοκτήτες των ζώων. Χρησιμοποιήθηκε το ίδιο ερωτηματολόγιο της πρώτης φάσης.

Ο αριθμός των ζώων που επιλέγηκαν τυχαία από κάθε μονάδα υπολογίστηκε με τη μεθοδολογία τυχαίας δειγματοληψίας χρησιμοποιώντας σαν αναμενόμενο επιπολασμό τον επιπολασμό που υπολογίστηκε στην πρώτη φάση και τον αριθμό των ζώων σε κάθε κοπάδι. Τόσο για τα οροαρνητικά άτομα των δύο χωριών όσο και τα οροαρνητικά ζώα, τέθηκαν υπό ενεργητική επιτήρηση με στόχο την αναζήτηση νέων περιπτώσεων πυρετού Q. Για το σκοπό αυτό διευθετήσαμε άμεση επικοινωνία και συνεργασία με ιατρούς της περιοχής των δύο χωριών καθώς επίσης και με κτηνοτροφικούς σταθμούς στους οποίους υπάγονται τα δύο χωριά για πληροφόρησή μας σχετικά με την εμφάνιση στους ανθρώπους ή στα ζώα συμβατής συμπτωματολογίας με το νόσημα. Παράλληλα, ιατροί πραγματοποιούσαν μηνιαίες κατ' οίκον επισκέψεις και συμπλήρωναν ειδικό ερωτηματολόγιο από τους συμμετέχοντες αναζητώντας ύποπτες περιπτώσεις πυρετού Q. Αντίστοιχα, κτηνίατροι πραγματοποιούσαν μηνιαίες επισκέψεις στις μονάδες με οροαρνητικά ζώα αναζητώντας ύποπτες περιπτώσεις πυρετού Q. Σε περίπτωση που η συμβατή με το νόσημα συμπτωματολογία αφορούσε τα ζώα, δείγματα εμβρύων, πλακούντων αίματος με αντιπηκτικό και αίματα χωρίς αντιπηκτικό στάλθηκαν στο εργαστήριο από τον υπεύθυνο του Κτηνιατρικού Σταθμού.

Όταν η συμβατή με το νόσημα συμπτωματολογία αφορούσε τον ανθρώπινο πληθυσμό, στάλθηκε στο εργαστήριο δείγμα αίματος με αντιπηκτικό και δείγμα αίματος χωρίς αντιπηκτικό ενώ ταυτόχρονα συμπληρωνόταν ειδικό ερωτηματολόγιο στο οποίο καταγράφονταν τα ακόλουθα: στοιχεία ασθενούς, διεύθυνση, φύλο, επάγγελμα, ιδιοκτησία ζώου, υγεία του ζώου, πλήρη στοιχεία αναμνηστικού, προηγούμενη νόσηση, φαρμακευτική αγωγή, προηγηθείσα νοσηλεία, τύπος πυρετού-διάρκεια, εξάνθημα, τύπος εξανθήματος, τοπογραφία εξανθήματος, σημειολογία λεμφοποιητικού, πνευμονική, καρδιακή, καρδιαγγειακές επιπλοκές, καρδιολογική θεραπεία, ηπατική σημειολογία, νεφρική σημειολογία, οφθαλμική, νευρική και γενική σημειολογία.

Η λήψη δείγματος αίματος από ύποπτα περιστατικά τόσο των ζώων όσο και ανθρώπων με αντιηκτικό διεξαγόταν με βάση ειδικό αναλυτικό πρωτόκολλο το οποίο διελάμβανε τη λήψη περί τα 10ml αίματος, την προσεκτική μεταφορά του στο εργαστήριο, τη λήψη του μέρους του πλάσματος και ειδικότερα της στοιβάδας των λευκών αιμοσφαιρίων και την φύλαξή τους στους -20°C. Ακολούθως το δείγμα μεταφερόταν στην Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Κρήτης για απομόνωση της *C.burnettii* με τη μέθοδο της shell-vial technique όπως περιγράφηκε στο εργαστηριακό πρωτόκολλο της πρώτης φάσης. Μετά την παρακολούθηση των οροαρνητικών ανθρώπων και ζώων των δύο χωριών για περίοδο ενός έτους έγινε από τους ίδιους δεύτερη αιμοληψία με στόχο να αναζητηθούν άτομα και ζώα που παρουσίασαν οροθετικότητα στο διάστημα αυτό χωρίς να παρουσιάσουν συμβατή κλινική εικόνα. Το ΠΜΧ χρησιμοποιήθηκε και σε αυτή τη φάση για τη γεωγραφική συσχέτιση παραγόντων κινδύνου με την οροθετικότητα.

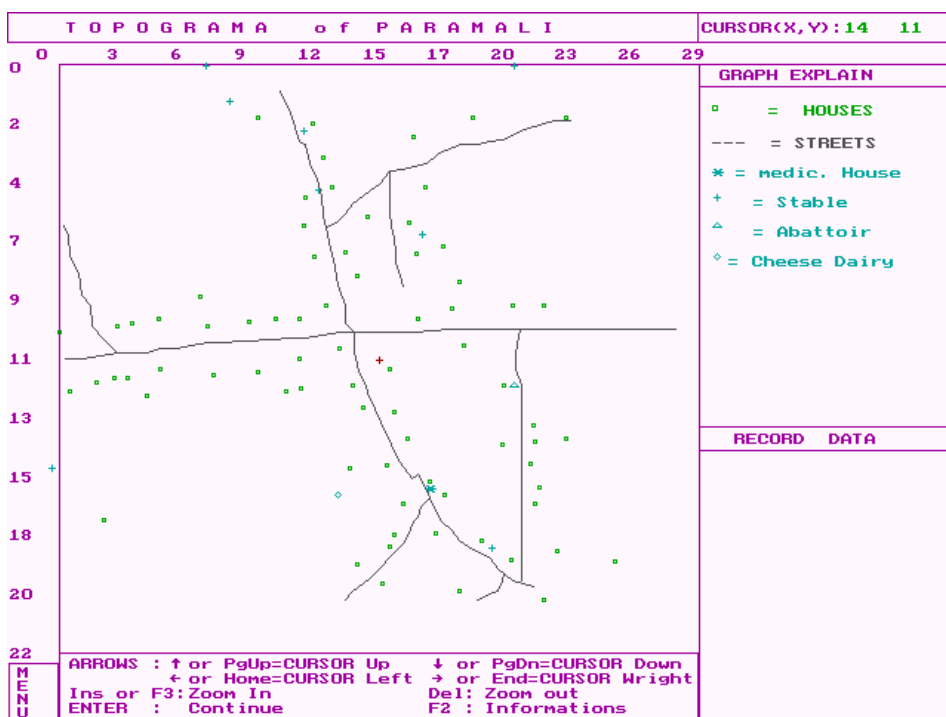
Μηχανογραφημένη Χαρτογράφηση Μικρής Περιοχής (Analysis.exe)

Χρησιμοποιώντας και πάλι τις συντεταγμένες σημείων, οι οποίες υπολογίστηκαν είτε με τη χρησιμοποίηση digitizer ή scanner ή και με απλά μέσα, έγινε δυνατή η απεικόνιση στην οθόνη του Η/Υ του τοπογραφικού μικρής περιοχής, στο οποίο σημειώνονται όλες οι επιδημιολογικές πληροφορίες που μας ενδιαφέρουν ανάλογα με το λοιμώδες νόσημα που μελετούμε (π.χ. για τη βρουκέλλωση στάβλοι, τυροκομεία κλπ). Στην πρώτη απεικόνιση του τοπογραφικού φαίνονται οι δρόμοι και τα σπίτια και στη συνέχεια προστίθενται στην εικόνα και οι επιδημιολογικές πληροφορίες (Σχήμα 8). Με το ΠΜΧ είναι συνδεδεμένη βάση δεδομένων (dbase.exe), η οποία περιέχει πληροφορίες που αφορούν τους κατοίκους της μικρής περιοχής (χωριό) και έτσι δίνεται η δυνατότητα απεικόνισής τους στο τοπογραφικό. Το πρόγραμμα παρέχει τη δυνατότητα μεγέθυνσης μιας συγκεκριμένης περιοχής, καθώς και την απεικόνιση συγκεκριμένου σπιτιού και της γειτονιάς του με πληροφορίες από τη βάση δεδομένων των κατοίκων.(Σχήμα 9)

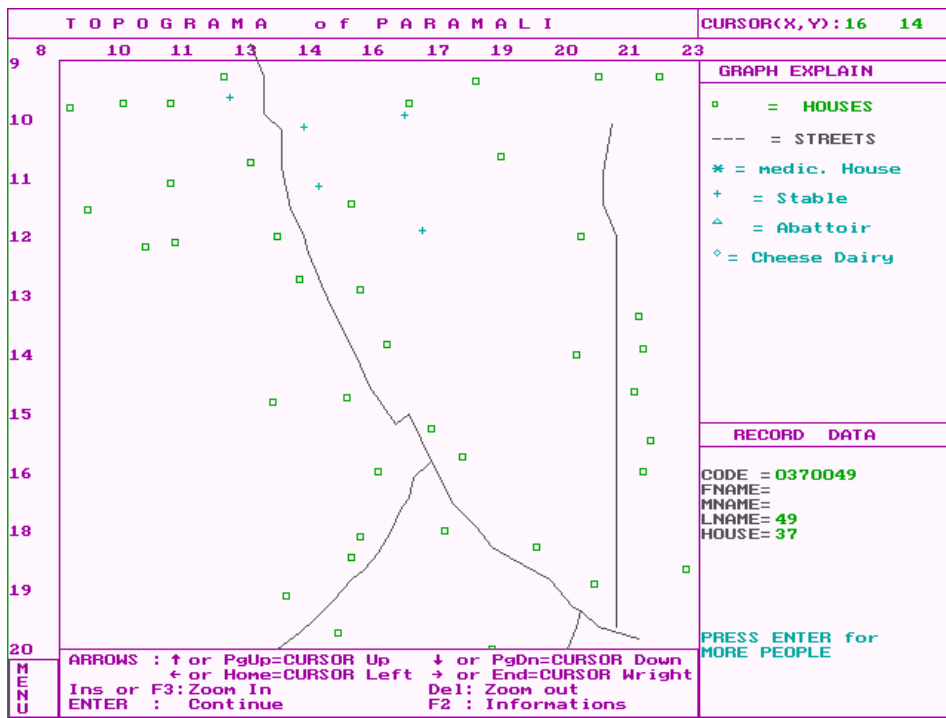
Στην συνέχεια έχοντας σαν βάση το πρόγραμμα απεικόνισης της μικρής περιοχής δημιουργήθηκε το πρόγραμμα επιδημιολογικής έρευνας (analysis.exe), το οποίο παρέχει τις πιο κάτω δυνατότητες:

- 1) Υπολογισμό αντιπροσωπευτικότητας του δείγματος
- 2) Απεικόνιση της κατανομής των κρουσμάτων σε επίπεδο μικρής περιοχής και αναζήτηση συγκέντρωσης κρουσμάτων και συσχέτισης τους με διάφορους παράγοντες κινδύνου.
- 3) Απεικόνιση των κρουσμάτων στην διάσταση του χώρου και του χρόνου με στόχο την ανίχνευση του σημείου από το οποίο ξεκίνησαν τα πρώτα κρούσματα και στην συνέχεια να απεικονισθεί η εξάπλωση του νοσήματος.
- 4) Αναζήτηση ύπαρξης κοινής πηγής μετάδοσης του νοσήματος τόσο για τους ανθρώπους, όσο και στα ζώα.

Αυτές οι δυνατότητες του προγράμματος θα αναλυθούν στα αποτελέσματα, για να γίνουν περισσότερο κατανοητές.



Σχήμα 8: Τοπογραφική απεικόνιση μικρής περιοχής. Στο τοπογραφικό φαίνονται τα σπίτια, οι δρόμοι, καθώς και επιδημιολογικές πληροφορίες (στάβλοι, σφαγεία κλπ). Για κάθε επιδημιολογική παράμετρο δίνεται διαφορετικό σχήμα και, εάν ζητηθεί από το χρήστη του προγράμματος, παρέχονται πληροφορίες που περιέχονται στις συνδεδεμένες βάσεις δεδομένων: κάτοικος συγκεκριμένου σπιτιού, ιδιοκτήτης στάβλου, αριθμός ζώων κλπ. Το ΠΜΧ παρέχει την δυνατότητα μεγέθυνσης συγκεκριμένης περιοχής ή επιλογή συγκεκριμένης γειτονιάς



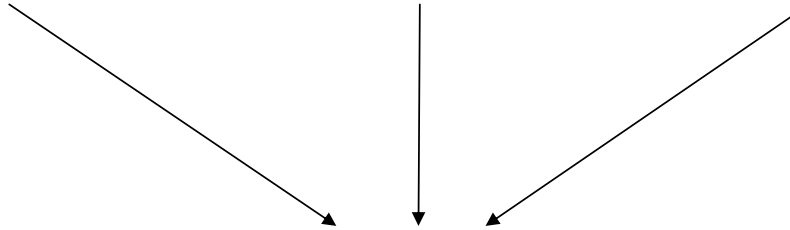
Σχήμα 9: Μεγέθυνση του τοπογραφικού στην οποία απεικονίζονται τα σπίτια και οι δρόμοι. Επιλέγοντας ένα σπίτι μπορούν να εμφανιστούν δημογραφικά στοιχεία του ιδιοκτήτη (όνομα, ηλικία κλπ), καθώς και επιδημιολογικά στοιχεία

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΗΧΑΝΟΓΡΑΦΗΜΕΝΗΣ ΧΑΡΤΟΓΡΑΦΗΣΗΣ
(ΠΜΧ)**

ΔΕΔΟΜΕΝΑ
ΟΡΟΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΗΣ
ΜΕΛΕΤΗΣ ΣΤΟΥΣ ΑΝΘΡΩΠΟΥΣ

ΔΕΔΟΜΕΝΑ
ΟΡΟΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΗΣ
ΜΕΛΕΤΗΣ ΣΤΑ ΖΩΑ

ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΗΣ
C.BURNETTI
ΣΤΟΥΣ ΚΡΟΤΩΝΕΣ



ΠΜΧ



- ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΩΝ « ΠΕΡΙΟΧΩΝ ΥΨΗΛΟΥ ΚΙΝΔΥΝΟΥ»
- ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΚΙΝΔΥΝΟΥ

ΤΡΙΤΗ ΦΑΣΗ

Βασικοί στόχοι της τρίτης φάσης ήταν οι ακόλουθοι:

Ενισχυμένη επιτήρηση του πυρετού Q στους ανθρώπους σε όλη την ελεύθερη Κύπρο

Ενισχυμένη επιτήρηση του πυρετού Q στα ζώα σε όλη την Κύπρο

Σχεδιασμός συνδυασμένης επιδημιολογικής επιτήρησης ζωνοόσων σε ανθρώπους και ζώα στην Κύπρο

Για την επίτευξη των στόχων αυτών αποφασίσθηκε η ευαισθητοποίηση των ιατρών και κτηνιάτρων της Κύπρου. Πραγματοποιήθηκαν επισκέψεις στους χώρους εργασίας των όπου συζητήθηκε το θέμα και ο ρόλος του καθενός.

Παράλληλα, διοργανώθηκαν διαλέξεις, σεμινάρια, όπως και ραδιοφωνικές και τηλεοπτικές ενημερωτικές εκπομπές με θέμα την επιδημιολογία, κλινική εικόνα και θεραπεία του νοσήματος.

Από τους ιατρούς και κτηνιάτρους ζητήθηκε σε περίπτωση ύπαρξης υπόπτων περιστατικών (συμβατή κλινική εικόνα) να ακολουθούνται οι διαδικασίες που υποδεικνύονται από τα πρωτόκολλα δειγματοληψίας: συμπλήρωση του ειδικού ερτηματολογίου για ύποπτα περιστατικά, αιμοληψία για ορολογικό έλεγχο και απομόνωση της *C.burnettii*.

Στη συνέχεια, με βάση τον εργαστηριακό έλεγχο, γινόταν αξιολόγηση περιστατικού από την ερευνητική ομάδα και είτε απορρίπτετο είτε εθεωρείτο βεβαιωμένο περιστατικό.

Τέλος, τόσο τα ύποπτα περιστατικά όσο και τα βεβαιωμένα απεικονίσθηκαν σε επίπεδο χώρας αναζητώντας τοπική και χρονική συγκέντρωση των κρουσμάτων.

ΚΑΤΑΧΩΡΗΣΗ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Η μελέτη υποστηρίχθηκε πλήρως μηχανογραφικά τόσο στο σχεδιασμό και την εκτέλεσή της όσο και στην ανάλυση αποτελεσμάτων. Τα ερωτηματολόγια από ανθρώπους και ζώα καθώς και τα ορολογικά αποτελέσματα των εξετάσεων καταχωρήθηκαν σε βάση δεδομένων στο επιδημιολογικό πακέτο epi-info. Παράλληλα, καταχωρήθηκαν σε βάση δεδομένων τα αποτελέσματα της ανίχνευσης *C.burnettii* σε κρότωνες. Χρησιμοποιώντας κωδικούς των χωριών και των ατόμων-σπιτιών έγινε σύνδεση των αποτελεσμάτων με το PMX με τελικό στόχο απεικονίσεις σε επίπεδο χώρας και επίπεδο μικρής περιοχής. Για την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το επιδημιολογικό πακέτο epi-info και το στατιστικό πακέτο SPSS.

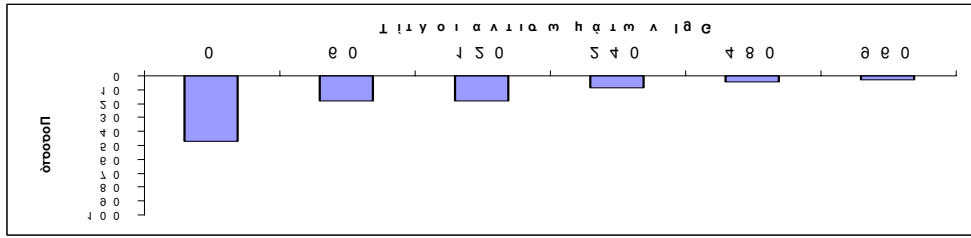
Για τη στατιστική ανάλυση ποσοτικών χαρακτηριστικών χρησιμοποιήθηκε το t-test και όπου τα κριτήρια δεν πληρούνταν για τη χρησιμοποίησή τους, χρησιμοποιήθηκε το ANOVA (analysis of variance).

Για τα προσωπικά χαρακτηριστικά χρησιμοποιήθηκε το χ^2 test. Για τη σύνδεση πολλών παραγόντων κινδύνου με την οροθετικότητα χρησιμοποιήθηκε μοντέλο γραμμικής παλινδρόμησης (Logistic regression analysis).

Στα πλαίσια του PMX και για την αναζήτηση περιοχών υψηλού κινδύνου χρησιμοποιήθηκε το χ^2 -test for heterogeneity. Σαν επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας χρησιμοποιήθηκε το 5%.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

ΦΑΣΗ ΠΡΩΤΗ



ΟΡΡΟΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΥ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥ

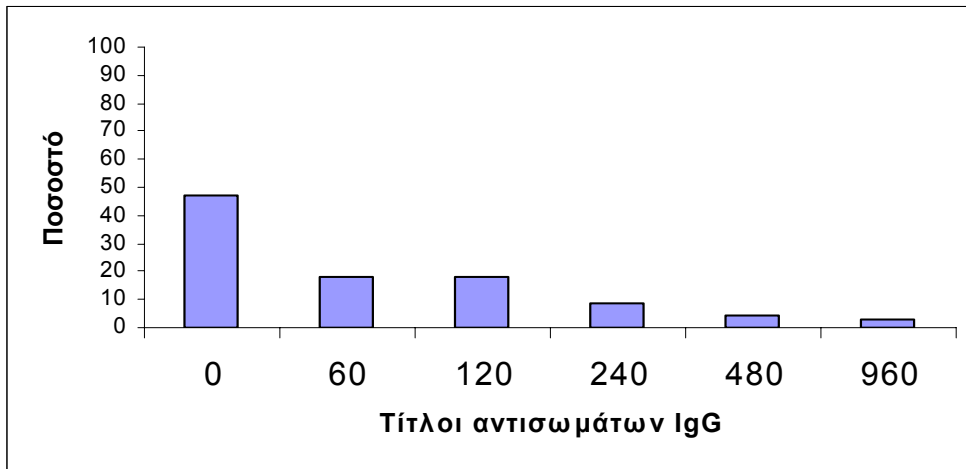
Στα πλαίσια της πρώτης φάσης της μελέτης λήφθηκε ορρός από 583 συμμετέχοντες από 39 χωριά και πόλεις της Κύπρου. 60 (10,3%) ήταν παιδιά και 523 (89,7%) ενήλικες. Από το σύνολο των συμμετεχόντων, 230 (39,4%) ήταν γυναίκες ενώ 353 (60,6%) ήταν άνδρες. Σε 307 από 583 των εξετασθέντων (52,7%) ανεβρέθηκαν αντισώματα IgG με τίτλο $\geq 1/60$.

Με τίτλο $\geq 1/120$ ανεβρέθηκαν 200 (34,3%). Η ποσοστιαία αναλογία των τίτλων των αντισωμάτων φαίνεται στο διάγραμμα 6 με μεγαλύτερο ποσοστό από αυτό του 1/60 και 1/120 και λιγότερα ποσοστά στους υπόλοιπους τίτλους.

Πίνακας 4: Ποσοστιαία αναλογία οροθετικότητας ανθρώπινου πληθυσμού σε σχέση με τις τρεις ανοσοσφαιρίνες IgG, IgM, IgA

	ΝΑΙ	ΟΧΙ
IgG ⁺ , IgM ⁻ , IgA ⁻	249 (42,7%)	334 (57,3%)
IgG ⁺ , IgM ⁺ , IgA ⁻	33 (5,6%)	550 (94,4%)
IgG ⁺ , IgM ⁺ , IgA ⁺	4 (0,6%)	579 (99,4%)
IgG ⁺ , IgM ⁻ , IgA ⁺	21 (3,6%)	562 (96,4%)

Διάγραμμα 6: Ποσοστιαία κατανομή τίτλων αντισωμάτων IgG της *C.burnettii* στον ανθρώπινο πληθυσμό

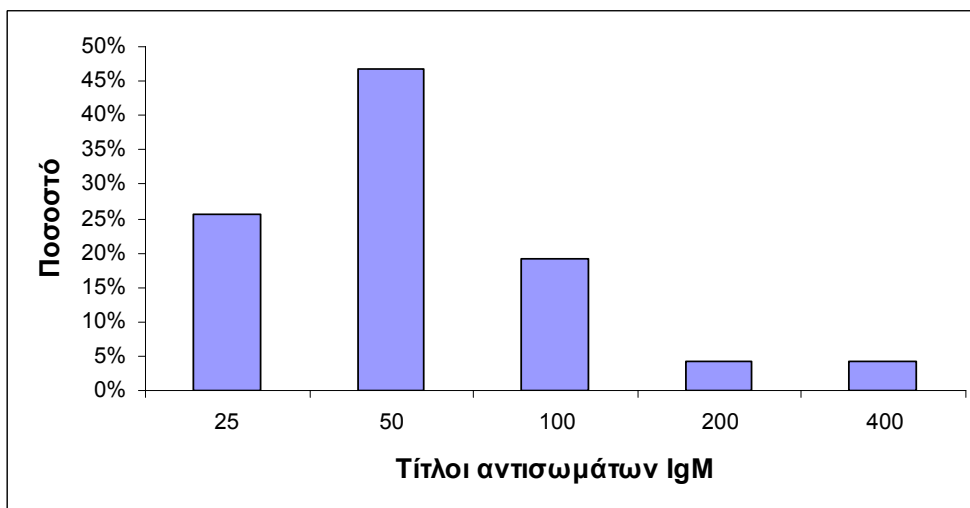


Αναφορικά με την ανίχνευση IgM αντισωμάτων βρέθηκαν 47 άτομα (8,1%) με τίτλο αντισωμάτων $\geq 1/25$.

Με τίτλο αντισωμάτων $\geq 1/50$ ανεβρέθησαν 35 άτομα (6,8%).

Η ποσοστιαία αναλογία των θετικών ορρών σε αντισώματα IgM φαίνεται στο διάγραμμα 7 με μεγαλύτερη αναλογία στον τίτλο 1/50.

Διάγραμμα 7: Ποσοστιαία κατανομή θετικών τίτλων αντισωμάτων IgM της *C.burnettii*

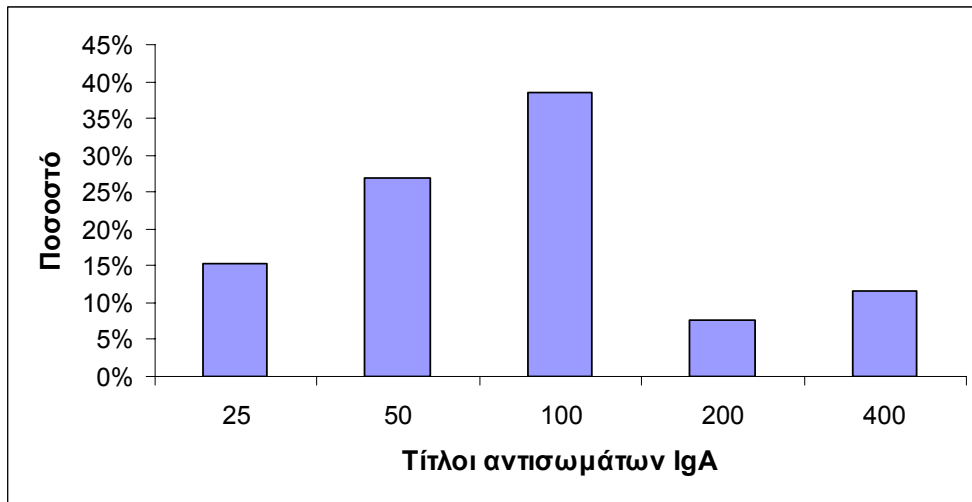


Θετικά IgA ανεβρέθησαν μόνο σε 26 άτομα (4,5%) με τίτλο αντισωμάτων $\geq 1/25$.

22 (3,8%) άτομα παρουσίασαν τίτλο αντισωμάτων $\geq 1/50$

Η ποσοστιαία αναλογία των θετικών ορρών σε αντισώματα IgA φαίνεται στο διάγραμμα 8 με μεγαλύτερη αναλογία στον τίτλο 1/100.

Διάγραμμα 8: Ποσοστιαία κατανομή θετικών τίτλων αντισωμάτων IgA της *C.burnettii*

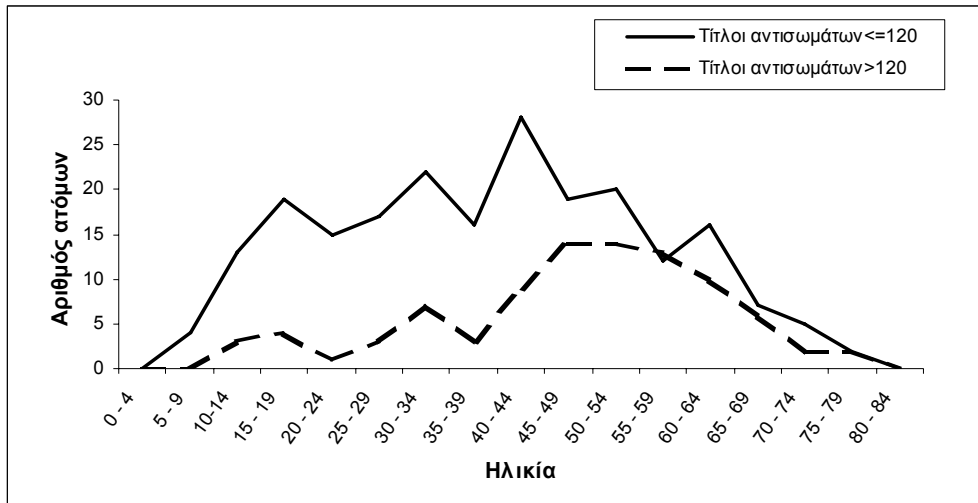


Παράγοντες κινδύνου

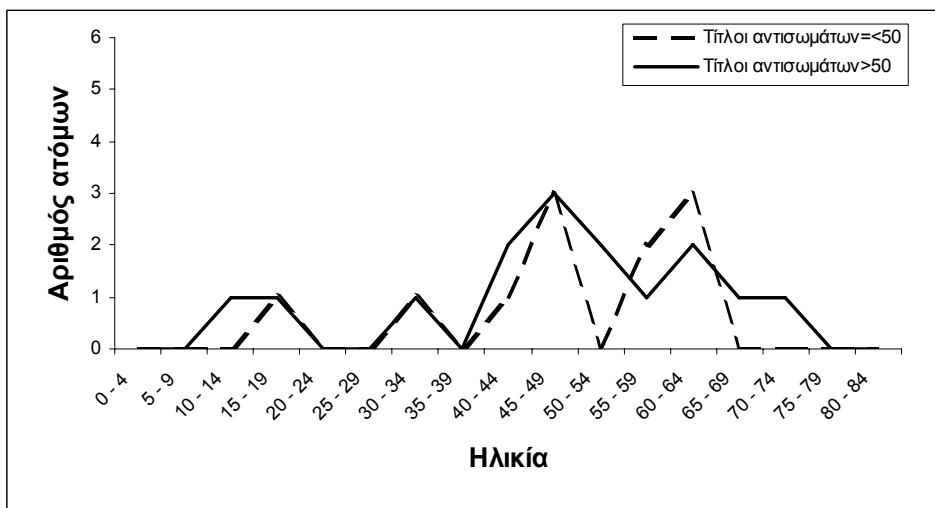
1. Ηλικία

Όπως φαίνεται στα Διαγράμματα 9, 10, 11 που αναφέρονται στην κατανομή ηλικίας ορροθετικών ατόμων IgG, IgM, IgA, οι ηλικίες 40-60 χρόνων παρουσιάζουν μεγαλύτερο ορροεπιπολασμό ο οποίος αυξάνεται σταδιακά στις μικρότερες ηλικίες και ελαττώνεται αντίστοιχα στις μεγαλύτερες ηλικίες.

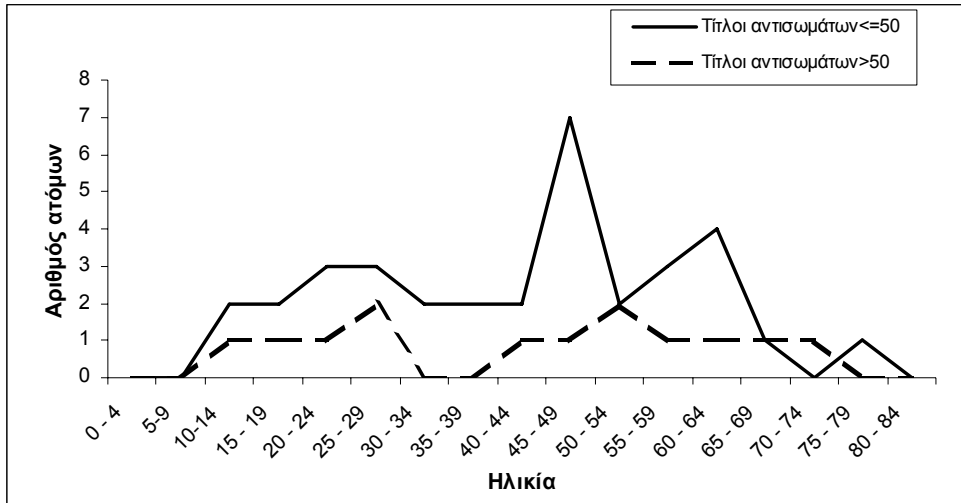
Διάγραμμα 9: Κατανομή ηλικίας ορροθετικών ατόμων σε IgG αντισώματα *C.burnettii*



Διάγραμμα 10: Κατανομή ηλικίας ορροθετικών ατόμων σε IgA αντισώματα *C.burnettii*

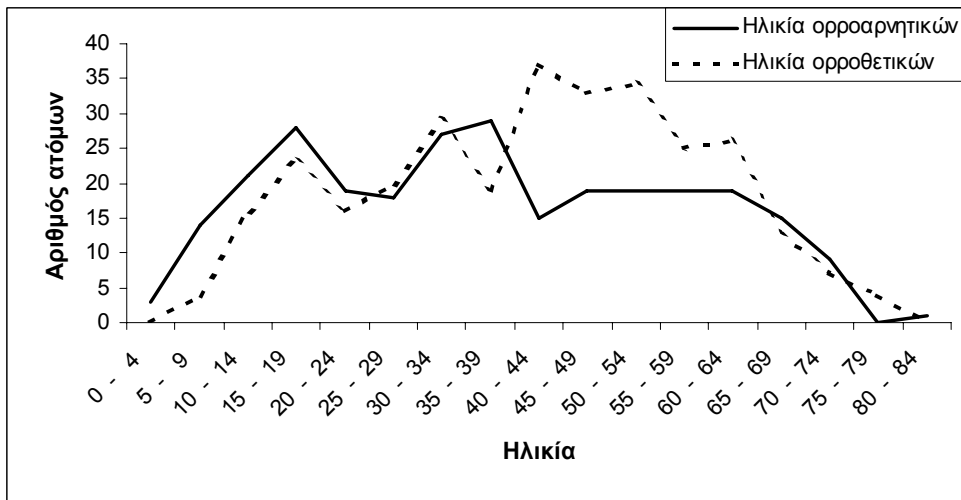


Διάγραμμα 11: Κατανομή ηλικίας ορροθετικών ατόμων σε IgM αντισώματα *C.burnettii*



Η μέση ηλικία των ορροαρνητικών ήταν 36,8 (σταθ. απόκλ. 18,9) στατιστικά σημαντικά χαμηλότερη ($P=0,002$) από τη μέση ηλικία των ορροθετικών 41,4 (σταθ. απόκλ. 16,7).

Διάγραμμα 12: Κατανομή ηλικίας ορροαρνητικών και ορροθετικών ατόμων σε IgG αντισώματα *C.burnettii*



Από τα 60 παιδιά που συμμετείχαν 58 εξετάστηκαν ορολογικά. Από αυτά 34,5% βρέθηκε να είναι ορροθετικά σε σύγκριση με ποσοστό 54,7% των ενηλίκων που βρέθηκαν ορροθετικοί ($P=0,02$ $0,56 < RR = 0,68 < 0,83$).

2. Φύλο

Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ ανδρών και γυναικών όσον αφορά στην ορροθετικότητα. Από τους 353 άνδρες οι 191 (54,5%) βρέθηκαν ορροθετικοί για IgG ενώ από τις 230 γυναίκες οι 115 (50%) ήταν ορροθετικές.

3. Διαμονή

Όπως φαίνεται στους πίνακες 5, 6, 7 και στο διάγραμμα 13 όπου παρουσιάζεται η ορροθετικότητα ανά επαρχία της Κύπρου και η αναλογία των τίτλων των αντισωμάτων, υψηλότερος ορροεπιπολασμός παρατηρήθηκε στην Πάφο (64,6) ενώ χαμηλότερο ορροεπιπολασμό παρουσίασε η Λευκωσία και ακόμα χαμηλότερο οι υπόλοιπες επαρχίες.

Πίνακας 5: Ορροθετικότητα σε αντισώματα IgM της *C.burnettii* του γενικού πληθυσμού ανά περιοχή διαμονής

Περιοχή	Σύνολο	Θετικά IgM	Ποσοστό
Λευκωσία	141	3	2,1%
Λεμεσός	131	15	11,5%
Λάρνακα	121	3	2,5%
Αμμόχωστος	63	16	25,4%
Πάφος	127	10	7,9%

Πίνακας 6: Ορροθετικότητα σε αντισώματα IgG της *C.burnettii* του γενικού πληθυσμού ανά περιοχή διαμονής

Περιοχή	Σύνολο	Θετικά IgG	Ποσοστό
Λευκωσία	141	81	57,4%
Λεμεσός	131	58	44,3%
Λάρνακα	121	52	43,0%
Αμμόχωστος	63	33	52,4%

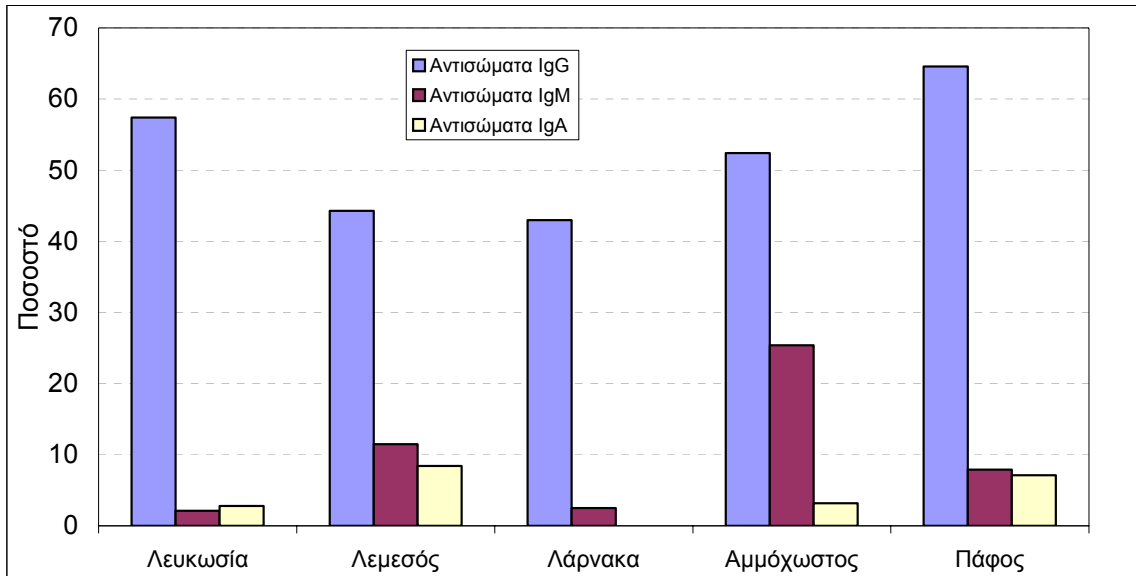
Πάφος	127	82	64,6%
-------	-----	----	-------

Πίνακας 7: Ορροθετικότητα σε αντισώματα IgA της *C.burnettii* του γενικού πληθυσμού ανά περιοχή διαμονής

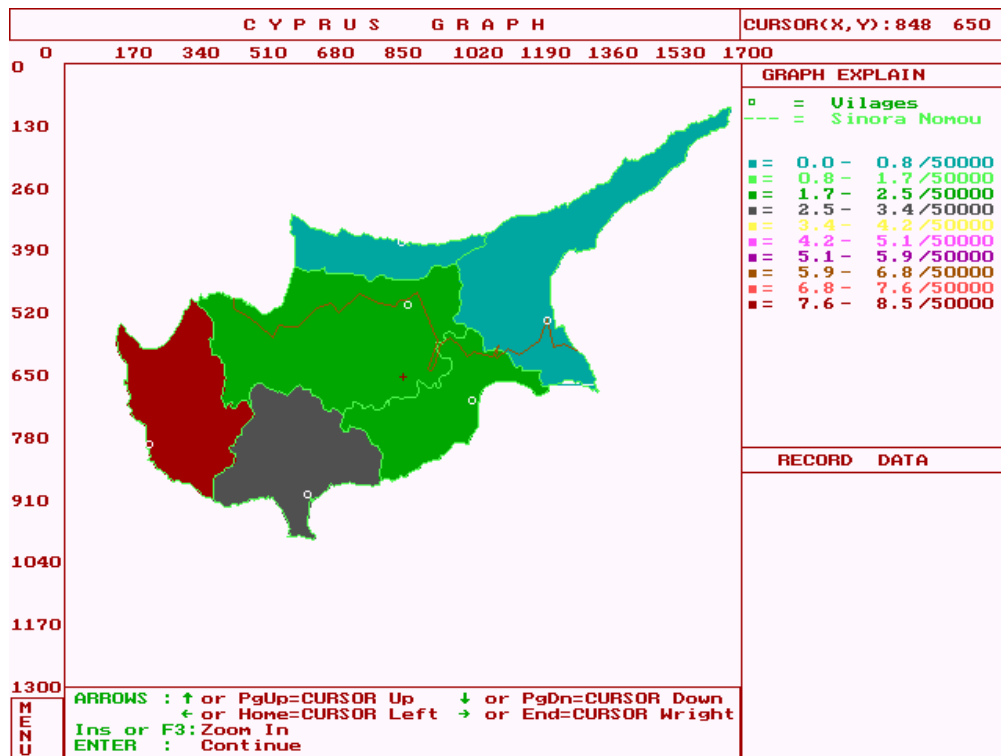
Περιοχή	Σύνολο	Θετικά IgA	Ποσοστό
Λευκωσία	141	4	2,8%
Λεμεσός	131	11	8,4%
Λάρνακα	121	0	0,0%
Αμμόχωστος	63	2	3,2%
Πάφος	127	9	7,1%

Αναφορικά με τα IgM και IgA αντισώματα, η περιοχή της Λεμεσού έχει το υψηλότερο ποσοστό ορροθετικότητας όπως φαίνεται στο διάγραμμα 13.

Διάγραμμα 13: Ορροθετικότητα ανά περιοχή



Σχήμα 10: Γεωγραφική απεικόνιση των ορροθετικών σε IgG αντισωμάτων *C.burnettii* σε επίπεδο περιοχής.



Στον πίνακα 8 φαίνεται η ορροθετικότητα ανά περιοχή:

Αστικές

Ημιαστικές

Γεωργοκτηνοτροφικές

Οι Γεωργοκτηνοτροφικές περιοχές παρουσιάζουν στατιστικά υψηλότερο επιπολασμό σε σύγκριση με τις ημιαστικές και αστικές περιοχές (<0,001).

Πίνακας 8: Ορροθετικότητα σε αντισώματα IgG, IgM, IgA της *C.burnettii* ανά περιοχή

Διαμονή	Σύνολο	Θετικά IgG	Ποσοστό	Θετικά IgM	Ποσοστό	Θετικά IgA	Ποσοστό
Αστικές	118	40	33,9%	7	5,9%	1	0,8%
Ημιαστικές	126	61	48,4%	7	5,6%	2	1,6%
Γεωργοκτηνοτροφικές	337	205	60,8%	33	9,8%	23	6,8%

4. Επάγγελμα

Από τους 75 συμμετέχοντες που ανήκαν στην κατηγορία επαγγέλματα ΕΡΓ1 (Κτηνοτρόφοι, Κτηνίατροι, Σφαγείς) οι 60 (80%) ήταν ορροθετικοί για IgG αντισώματα, ενώ από τους 121 που ανήκαν στην κατηγορία ΕΡΓ2 (Γεωργοκτηνοτρόφοι) οι 80 (66,1%) ήταν ορροθετικοί. Από τους 385 που ανήκαν στην κατηγορία ΕΡΓ3 (καμιά σχέση με ζώα) οι 161 (42,9%) βρέθηκαν να είναι ορροθετικοί.

Όπως φαίνεται στον πίνακα 9 η ομάδα ΕΡΓ1 έχει στατιστικά σημαντικά υψηλότερο ορροεπιπολασμό σε σύγκριση με τις ομάδες ΕΡΓ2 και ΕΡΓ3 ($P < 0,00001$). Επίσης χρησιμοποιώντας το chi square for trend φαίνεται αρνητική γραμμική τάση ανάμεσα στο βαθμό έκθεσης στα ζώα και στην ορροθετικότητα. [(1,58 < RR = 1,86 < 2,19, $P < 0,001$ (ΕΡΓ3)],

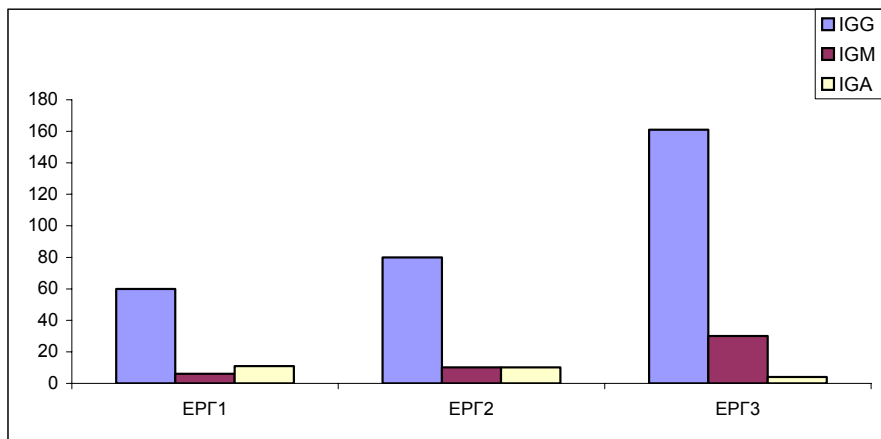
[1,02 < RR = 1,21 < 1,43, $P < 0,001$ (ΕΡΓ2)].

Πίνακας 9: Ποσοστό ορροθετικότητας στη *C.burnettii* ανάλογα με την κατηγορία επαγγέλματος

	ΣΥΝΟΛΟ	ΘΕΤΙΚΑ	ΠΟΣΟΣΤΟ
ΕΡΓ1	75	60	80%
ΕΡΓ2	121	80	66,1%
ΕΡΓ3	375	161	42,9%

Στο διάγραμμα 14 φαίνεται το ποσοστό των IgG, IgM και IgA στις τρεις ομάδες επαγγελματιών.

Διάγραμμα 14: Ορροθετικότητα ανθρώπινου πληθυσμού στη *C.burnettii* ανά επάγγελμα



Το επάγγελμα ΕΡΓ1 έχει σαφώς υψηλότερα ποσοστά ορροθετικότητας στα αντισώματα IgA με λίαν στατιστικώς σημαντική διαφορά ($P < 0,00001$) από τα ΕΡΓ2 και ΕΡΓ3 όπως φαίνεται στον πίνακα 10, ενώ δεν παρατηρήθηκε διαφορά στα αντισώματα IgM.

Πίνακας 10: Ορροθετικότητα ανθρώπινου πληθυσμού σε αντισώματα IgG, IgM, IgA ανά επάγγελμα

	Σύνολο	Θετικά IgG	Ποσοστό	Θετικά IgM	Ποσοστό	Θετικά IgA	Ποσοστό
ΕΡΓ1	75	60	80,0%	6	8,0%	11	14,7%
ΕΡΓ2	121	80	66,1%	10	8,3%	10	8,3%
ΕΡΓ3	375	161	42,9%	30	8,0%	4	1,1%

5. Είδος Κατοικίας – Κήπος – Κοπριά

Δεν ανεβρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στον τύπο κατοικίας (Ισόγειος κατοικία, Διαμέρισμα) και στην ορροθετικότητα ($0,61 < RR = 0,81 < 1,08$, $P = 0,26$).

Αναφορικά με την ύπαρξη κήπου ή όχι χρησιμοποιώντας αρχικά το χ^2 test ανεβρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στην ύπαρξη κήπου και την ορροθετικότητα ($1,10 < RR = 1,44 < 1,89$, $P = 0,06$). Κάνοντας όμως στρωματοποιημένη ανάλυση και λαμβάνοντας υπόψη και τους άλλους παράγοντες όπως είναι η διαμονή και το επάγγελμα, αποδεικνύεται ότι η ύπαρξη κήπου στις αστικές και ημιαστικές περιοχές δεν σχετίζεται με την ορροθετικότητα ενώ σχετίζεται ακόμα περισσότερο στις γεωργοκτηνοτροφικές περιοχές. Παράλληλα, ο παράγοντας επάγγελμα δεν φαίνεται να επηρεάζει σημαντικά τη συσχέτιση μεταξύ της ύπαρξης κήπου και της ορροθετικότητας. Επιπρόσθετα, η χρήση κοπριάς στον κήπο φαίνεται να συνδέεται με αυξημένο κίνδυνο ορροθετικότητας ($1,01 < RR = 1,66 < 2,74$, $P < 0,05$).

6. Ιδιοκτησία ζώων

Σκύλος

Καμία σχέση δεν βρέθηκε να υπάρχει μεταξύ ιδιοκτησίας σκύλου και ορροθετικότητας καθώς και με προβλήματα υγείας των σκύλων (ύπαρξη κροτώνων ή άλλα προβλήματα).

Γάτος

Δεν βρέθηκε να υπάρχει συσχέτιση με την ιδιοκτησία γάτου ή γάτου με προβλήματα υγείας και ορροθετικότητας.

Κουνέλια

Δεν βρέθηκε να υπάρχει καμία σχέση μεταξύ ιδιοκτησίας κουνελιών και ορροθετικότητας.

Βοοειδή

Δεν βρέθηκε να υπάρχει καμία σχέση μεταξύ ιδιοκτησίας βοοειδών και ορροθετικότητας.

Αιγοπρόβατα

Ανεβρέθηκε ότι η ιδιοκτησία αιγοπροβάτων σχετίζεται στατιστικά σημαντικά με την ορροθετικότητα ($1,62 < RR = 1,81 < 2,01$, $P < 0,001$).

Επιπλέον οι ιδιοκτήτες αιγοπροβάτων που εпараσιτούντο από κρότωνα είχαν ακόμα μεγαλύτερο κίνδυνο να ήταν ορροθετικοί σε σχέση με τους ιδιοκτήτες αιγοπροβάτων που δεν εпараσιτούντο με κρότωνα ($1,71 < RR = 1,9 < 2,1$, $P < 0,001$).

7. Διατροφικές συνήθειες

Καμία σημαντικά στατιστική σχέση δεν βρέθηκε μεταξύ των ατόμων που καταναλώνουν φρέσκο άβραστο γάλα και ορροθετικότητας.

8. Αποβολές ζώων

Οι ιδιοκτήτες αιγοπροβάτων που ανέφεραν στο ιστορικό ότι είχαν αποβολές στα αιγοπρόβατα είχαν στατιστικά μεγαλύτερο κίνδυνο να είναι ορροθετικοί συγκριτικά με εκείνους που δεν ανέφεραν ότι είχαν αποβολές στα ζώα τους ($1,13 < RR = 2,01 < 3,57$, $P < 0,05$).

Για να αποκλειστούν οι συγχυτικοί παράγοντες και οι αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στους παράγοντες κινδύνου, εξετάστηκαν όλοι ταυτόχρονα με τη χρήση μοντέλου πολλαπλής παλινδρόμησης (Logistic Regression Analysis). Τα αποτελέσματα της εξέτασης φαίνονται στον πίνακα 11.

Πίνακας 11: Πολυπαραγοντική παλίνδρομη ανάλυση (Logistic Regression Analysis). Παράγοντες κινδύνου που μπορεί να σχετίζονται με την ορροθετικότητα *C.burnettii*

	<i>P value</i>	<i>OR</i>
ΗΛΙΚΙΑ	0.001	0.6
ΦΥΛΛΟ	-	-
ΔΙΑΜΟΝΗ	0.000001	2.8
ΕΠΑΓΓΕΛΜΑ	0.000001	3.3
ΚΗΠΟΣ + ΚΟΠΡΙΑ	0.04	1.6
ΑΙΓΕΣ / ΠΡΟΒΑΤΑ	0.00001	1.9
ΑΠΟΒΟΛΕΣ –ΑΙΓΟΠΡΟΒΑΤΑ	0.0001	2.01
ΤΣΙΜΠΟΥΡΙΑ/ΑΙΓΟΠΡΟΒΑΤΑ	0.00009	1.7
ΑΓΕΛΑΔΕΣ	-	-
ΛΑΓΟΙ	-	-
ΜΗ ΠΑΣΤΕΡΙΩΜΕΝΟ ΓΑΛΑ	-	-

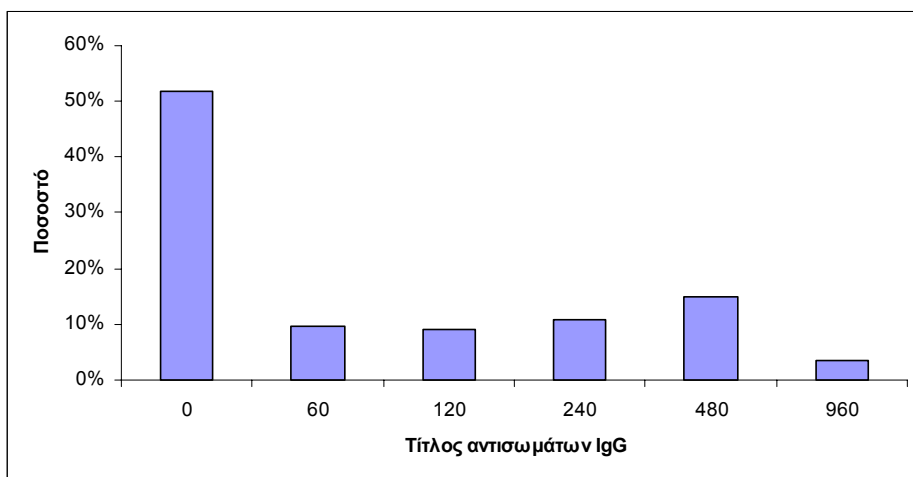
ΟΡΡΟΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΖΩΙΚΟΥ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥ

Στα πλαίσια της Πρώτης Φάσης λήφθηκε ορρός από 417 αίγες, 482 πρόβατα και 74 βοοειδή από τα ίδια χωριά και πόλεις από τα οποία έγινε δειγματοληψία στους ανθρώπους. Η μέση ηλικία των αιγών ήταν 3,6 χρόνια (σταθερή απόκλιση 1,3), των προβάτων 3,3 χρόνια (σταθ. απόκλ. 1,2) και των βοοειδών 4,4 χρόνια (σταθ. απόκλ. 1,1).

Αίγες

Από το σύνολο των 417 αιγών σε 201 (48,2%) ανιχνεύθηκαν IgG αντισώματα με τίτλο $\geq 1/60$. Με τίτλο $\geq 1/120$ ανιχνεύθηκαν 160 αίγες (29,3%) ενώ με τίτλο $\geq 1/240$ ανιχνεύθηκαν 122 (18,5%). Η ποσοστιαία αναλογία των ανευρεθέντων αντισωμάτων στις αίγες απεικονίζεται στο Διάγραμμα 15.

Διάγραμμα 15. Ποσοστιαία αναλογία ανευρεθέντων τίτλων αντισωμάτων IgG στην *C.burnettii* στις αίγες



Οι ορροί από πρόβατα λήφθηκαν από αριθμό 127 κοπαδιών από όλη την Κύπρο. Από το σύνολο των κοπαδιών ανευρέθηκαν 59 κοπάδια με τουλάχιστον ένα πρόβατο θετικό.

Οι ορροί από αίγες λήφθηκαν από αριθμό 120 κοπαδιών από όλη την Κύπρο.

Από το σύνολο αυτό των κοπαδιών ανεβρέθησαν 85 κοπάδια με τουλάχιστον μία αίγα θετική.

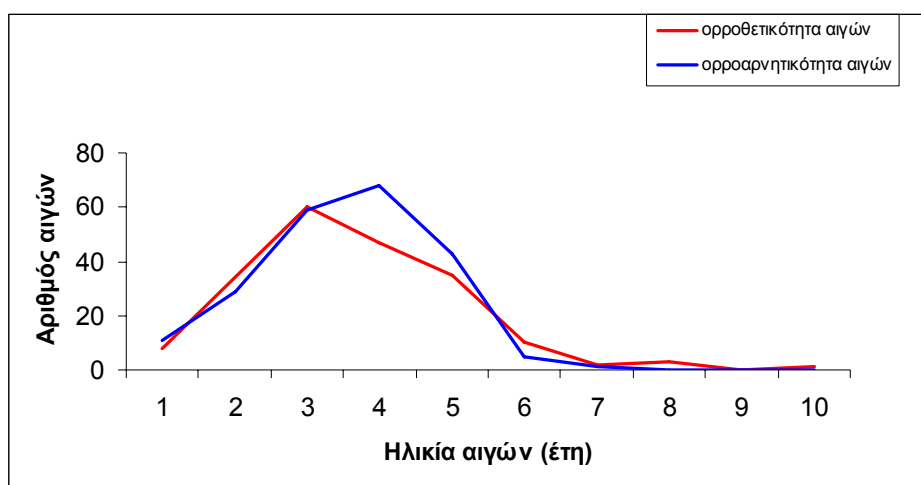
Παράγοντες κινδύνου για ορροθετικότητα

Αναλύοντας τα στοιχεία που λήφθηκαν από το ερωτηματολόγιο από τους ιδιοκτήτες των ζώων δεν ανεβρέθηκε συσχέτιση της ορροθετικότητας με την κατάσταση των υποστατικών καθώς και με το συνολικό αριθμό των ζώων ανά υποστατικό. Επίσης δεν ανεβρέθηκε συσχέτιση ανάμεσα στο ιστορικό αποβολών, αγκαλαξίας και παρασίτωσης από κρότωνες στις αίγες.

Η μέση ηλικία των ορροθετικών ήταν ελαφρά μεγαλύτερη (2,2 χρόνια) σε σχέση με τις ορροαρνητικές (2,1 χρόνια) χωρίς η διαφορά να είναι στατιστικά σημαντική.

Η κατανομή ηλικίας των ορροθετικών και ορροαρνητικών αιγών απεικονίζεται στο διάγραμμα 16.

Διάγραμμα 16: Κατανομή ηλικίας των οροθετικών και ορροαρνητικών αιγών



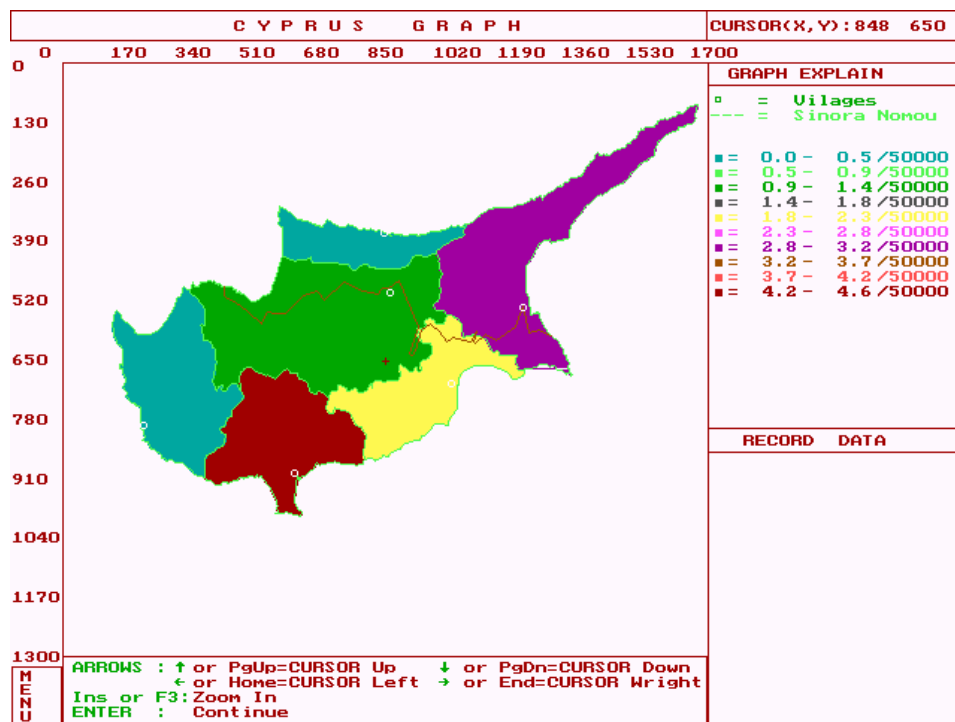
Όπως φαίνεται στον πίνακα 12 και στο σχήμα 11 (Χάρτης Κύπρου) οι

περιοχές της Αμμοχώστου και της Λεμεσού παρουσιάζουν την υψηλότερη ορροθετικότητα.

Πίνακας 12: Ορροθετικότητα αιγών ανά περιοχή

Περιοχή	Σύνολο	Ορροθετικά	Ποσοστό
Λευκωσία	76	41	53,9%
Λεμεσός	131	71	54,2%
Λάρνακα	78	36	46,2%
Αμμόχωστος	12	8	66,7%
Πάφος	120	45	37,5%

Σχήμα 11: Γεωγραφική απεικόνιση οροθετικότητας των αιγών σε επίπεδο χώρας-περιοχής

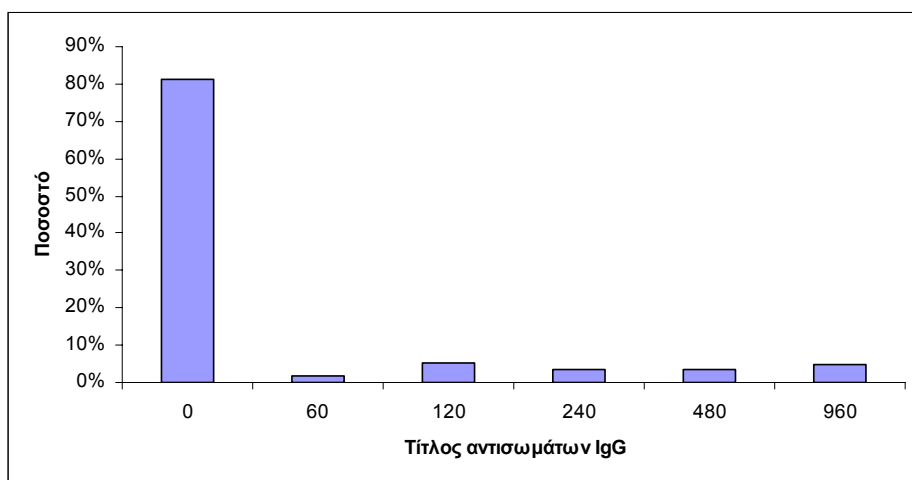


Πρόβατα

Από το σύνολο των 482 προβάτων, σε 91 (18,9%) ανιχνεύθηκαν IgG αντισώματα με τίτλο $\geq 1/60$. Με τίτλο $\geq 1/120$ ανιχνεύθηκαν 82 (17%) ενώ με τίτλο $\geq 1/240$ ανιχνεύθηκαν 57 (11,8%).

Η ποσοστιαία αναλογία ανευρεθέντων αντισωμάτων στα πρόβατα απεικονίζεται στο Διάγραμμα 17.

Διάγραμμα 17: Ποσοστιαία αναλογία ανευρεθέντων τίτλων αντισωμάτων IgG στην *C.burnettii* στα πρόβατα

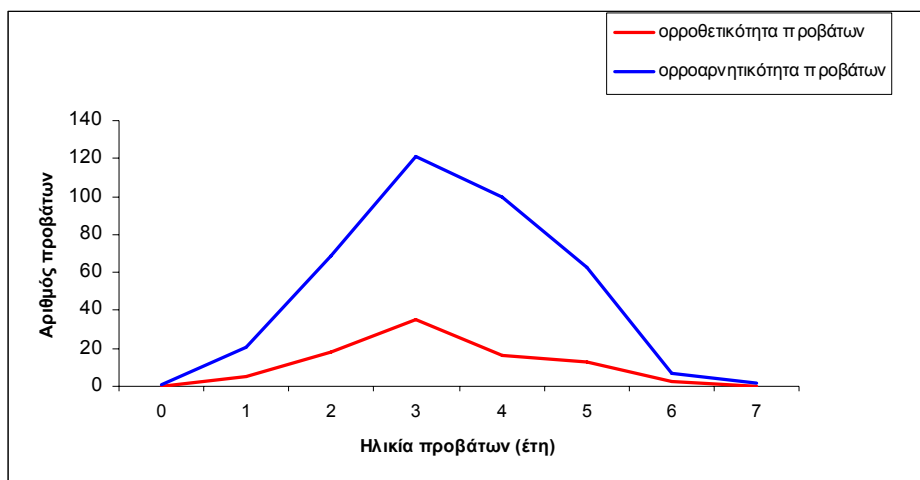


Παράγοντες κινδύνου για ορροθετικότητα

Αναλύοντας τα στοιχεία που λήφθηκαν από το ερωτηματολόγιο από τους ιδιοκτήτες των ζώων δεν ανεβρέθηκε συσχέτιση της ορροθετικότητας με την κατάσταση υποστατικών καθώς και με το συνολικό αριθμό των ζώων ανά υποστατικό. Επίσης δεν ανεβρέθηκε συσχέτιση ανάμεσα στο ιστορικό αποβολών, αγκαλαξίας ή παρασίτωσης από τους κρότωνες στα πρόβατα.

Δεν ανεβρέθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ της μέσης ηλικίας των ορροθετικών και της μέσης ηλικίας των ορροαρνητικών όπως φαίνεται και στο Διάγραμμα 18.

Διάγραμμα 18: Κατανομή ηλικίας των ορροθετικών και ορροαρνητικών προβάτων

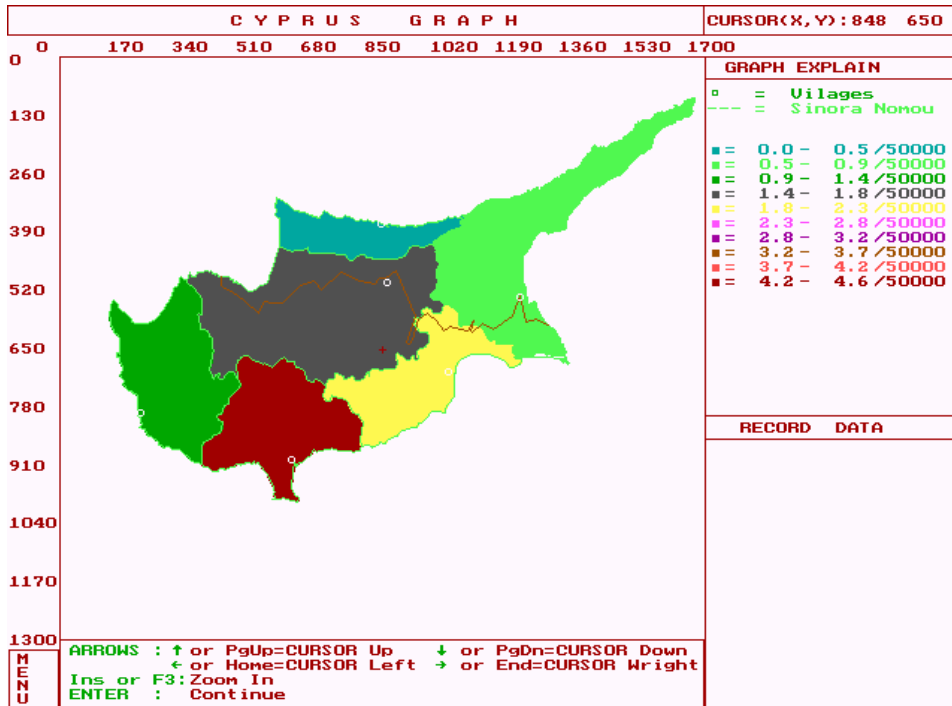


Όπως φαίνεται στον πίνακα 13 και στο σχήμα 12 η περιοχή της Λεμεσού έχει την υψηλότερη ορροθετικότητα.

Πίνακας 13: Ορροθετικότητα προβάτων ανά περιοχή

Περιοχή	Σύνολο	Ορροθετικά	Ποσοστό
Λευκωσία	122	30	24,6%
Λεμεσός	66	18	27,3%
Λάρνακα	119	27	22,7%
Αμμόχωστος	94	9	9,6%
Πάφος	80	7	8,8%

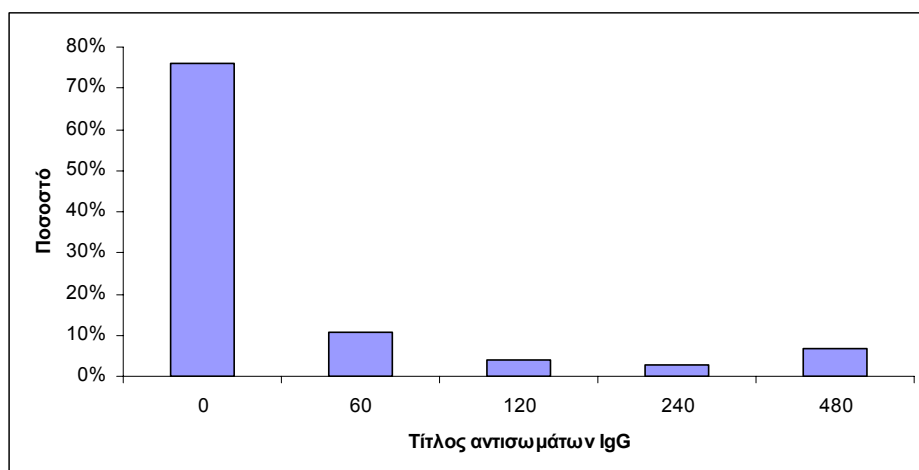
Σχήμα 12: Γεωγραφική απεικόνιση ορροθετικότητας προβάτων σε επίπεδο Χώρας-περιοχής



Βοοειδή

Από το σύνολο των 75 βοοειδών σε 18 (24%) ανιχνεύθηκαν IgG αντισώματα με τίτλο $\geq 1/60$. Με τίτλο $\geq 1/120$ ανιχνεύθηκαν 10 βοοειδή (9,3%) ενώ με τίτλο $\geq 1/240$ ανιχνεύθηκαν 7 (6,7%). Η ποσοστιαία αναλογία των ανευρεθέντων αντισωμάτων στα βοοειδή απεικονίζεται στο Διάγραμμα 19.

Διάγραμμα 19: Ποσοστιαία αναλογία ανευρεθέντων τίτλων αντισωμάτων IgG στην *C.burnettii* στα βοοειδή



Στον πίνακα 14 απεικονίζεται η ορροθετικότητα ανά περιοχή.

Πίνακας 14: Ορροθετικότητα βοοειδών ανά περιοχή

Περιοχή	Σύνολο	Ορροθετικά	Ποσοστό
Λευκωσία	30	7	23,3%
Λεμεσός			
Λάρνακα	15	3	20,0%
Αμμόχωστος	15	7	46,7%
Πάφος	15	1	6,7%

Παράγοντες κινδύνου για ορροθετικότητα

Αναλύοντας τα στοιχεία που λήφθηκαν από τα ερωτηματολόγια από τους ιδιοκτήτες των ζώων δεν βρέθηκε στατιστικώς σημαντική συσχέτιση με την κατάσταση υποστατικών, τη στειρότητα, την ηλικία και τον αριθμό των ζώων κατά εκτροφή.

Είδος ζώου

Όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα, η ορροθετικότητα στα πρόβατα είναι σαφώς μικρότερη από την ορροθετικότητα στις αίγες ($0,32 < RR = 0,39 < 0,48$, $p < 0,0001$). Παράλληλα, η ορροθετικότητα των βοοειδών επίσης ανεβρέθηκε να είναι σημαντικά χαμηλότερη της ορροθετικότητας των αιγών ($0,33 < RR = 0,50 < 0,75$, $p < 0,0001$). Ακόμη, η ορροθετικότητα στα κοπάδια προβάτων ανεβρέθηκε σαφώς μικρότερη από την ορροθετικότητα των κοπαδιών των αιγών ($0,4 < RR = 0,51 < 0,61$, $P < 0,001$).

ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ *C.BURNETTII* ΣΕ ΚΡΟΤΩΝΕΣ

Από τους 141 κρότωναes που συλλέγηκαν από τα αιγοπρόβατα ανιχνεύθηκε *C.burnettii* σε 11 (7,8 %) με τη μέθοδο nested PCR. Από τους 11 κρότωναes οι 7 ανήκαν στο γένος *Rhipicephalus* και οι 4 στο γένος *Hyaloma*.

Συνδέοντας τα αποτελέσματα της ανίχνευσης της *C.burnettii* στους κρότωναes με τα αποτελέσματα του ορολογικού ελέγχου των ζώων από τα οποία συλλέγηκαν οι κρότωναes, ανεβρέθηκε υψηλότερη ορροθετικότητα (33%) ανάμεσα στα ζώα που είχε ανιχνευθεί *C.burnettii* στους κρότωναes τους σε σύγκριση με τα ζώα που δεν είχε ανιχνευθεί στους κρότωναes τους *C.burnettii*. Η διαφορά αυτή δεν ήταν στατιστικά σημαντική λόγω του μικρού δείγματος κροτώνων.

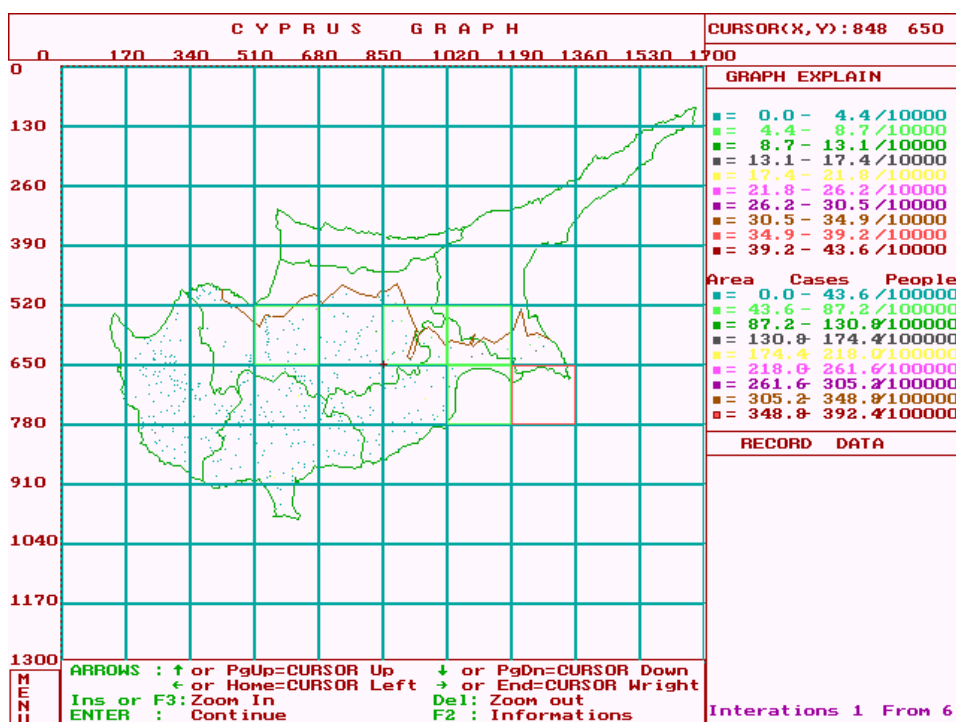
ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΜΗΧΑΝΟΓΡΑΦΗΜΕΝΗΣ ΧΑΡΤΟΓΡΑΦΗΣΗΣ ΣΕ ΕΠΙΠΕΔΟ ΧΩΡΑΣ

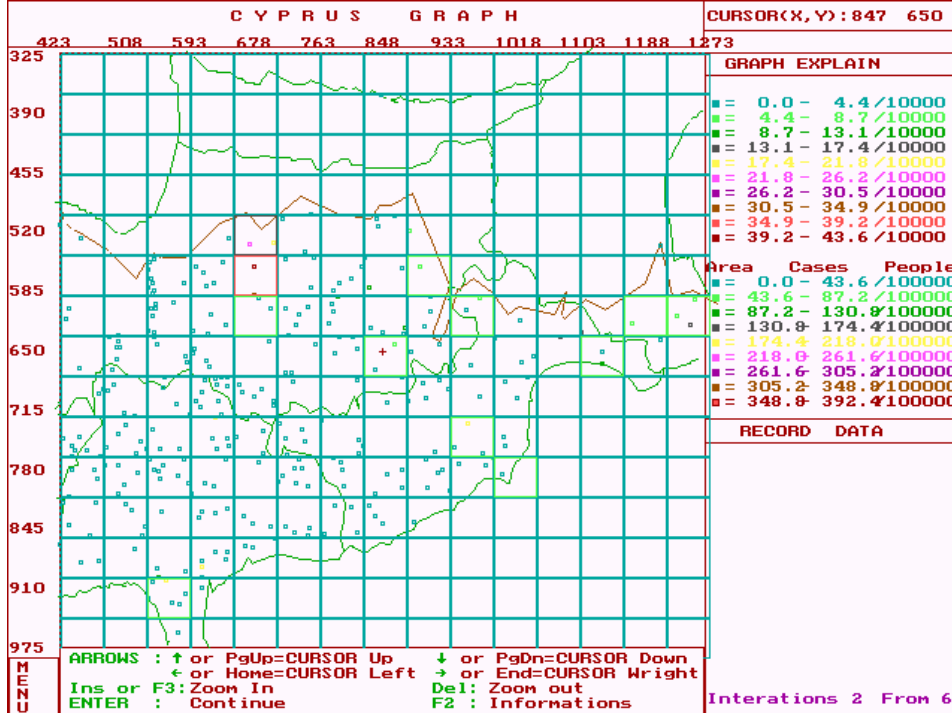
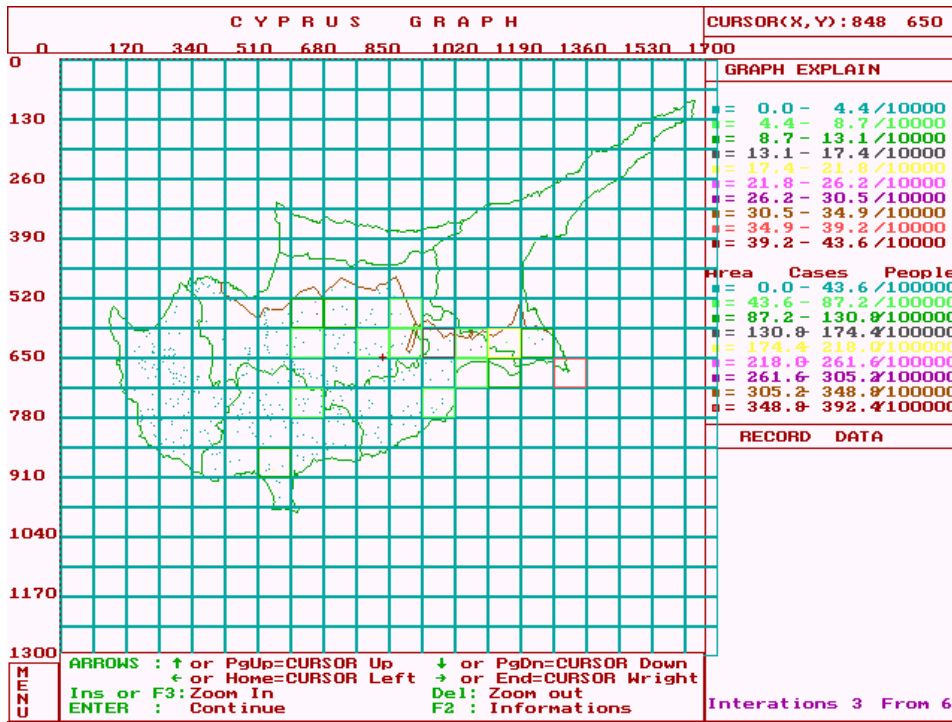
Χρησιμοποιώντας Μηχανογραφημένους Χάρτες της Κύπρου σε επίπεδο χώρας στον οποίο περιλαμβάνονταν τα χωριά, έγιναν πολλαπλές απεικονίσεις της ορροθετικότητας του πληθυσμού ανά χωριό λαμβάνοντας υπόψη τόσο τα αντισώματα IgG, IgM και IgA.

Παράλληλα, έγιναν ταυτόχρονα απεικονίσεις της ορροθετικότητας στα ζώα ανά χωριό καθώς και απεικονίσεις των περιοχών που ανιχνεύθηκε *C.burnettii* σε κρότωνες.

Χρησιμοποιώντας αυξομειούμενα και μετακινούμενα τετράγωνα με ταυτόχρονη μεγέθυνση όπως φαίνεται στα σχήματα 13, 14, και 15 τα χωριά Παραμάλι και Κωτσιάτης εντοπίστηκαν σαν περιοχές υψηλού κινδύνου και επιλέγηκαν για τη συνέχεια του προγράμματος.

Σχήματα 13, 14, 15: Γεωγραφική απεικόνιση οροθετικότητας χωριών σε επίπεδο χώρας με αυξομειούμενα και μετακινούμενα τετράγωνα





Χρησιμοποιώντας τα τετράγωνα υπολογίζεται σε κάθε τετράγωνο η ορροθετικότητα. Χρησιμοποιώντας το χ^2 καλής εφαρμογής ελέγχεται αν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στο συγκεκριμένο τετράγωνο και στα υπόλοιπα τετράγωνα. Υπάρχει δυνατότητα αυξομείωσης των τετραγώνων καθώς και μεγέθυνσης του χάρτη έτσι ώστε να είναι δυνατός ο έλεγχος για την ανεύρεση περιοχής υψηλού κινδύνου σε όλη την Κύπρο. Με τη μεθοδολογία αυτή ανεβρέθησαν τα δύο χωριά Κωτσιάτης και Παραμάλι.

ΦΑΣΗ ΔΕΥΤΕΡΗ

ΟΡΡΟΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΣΕ ΑΝΘΡΩΠΟΥΣ ΚΑΙ ΖΩΑ ΣΕ ΠΕΡΙΟΧΕΣ ΥΨΗΛΟΥ ΚΙΝΔΥΝΟΥ

Στα δύο χωριά Κωτσιάτης και Παραμάλι που είχαν επιλεγεί με βάση τα αποτελέσματα της Πρώτης Φάσης σαν περιοχές υψηλού κινδύνου, κλήθηκε όλος ο πληθυσμός να συμμετέχει στη μελέτη. Επίσης, αριθμός ζώων που υπολογίστηκε με τη μεθοδολογία τυχαίας δειγματοληψίας χρησιμοποιώντας σαν αναμενόμενο επιπολασμό αυτόν που υπολογίστηκε στην Πρώτη Φάση και τον αριθμό των ζώων σε κάθε κοπάδι, συμμετείχε στη μελέτη.

ΚΩΤΣΙΑΤΗΣ

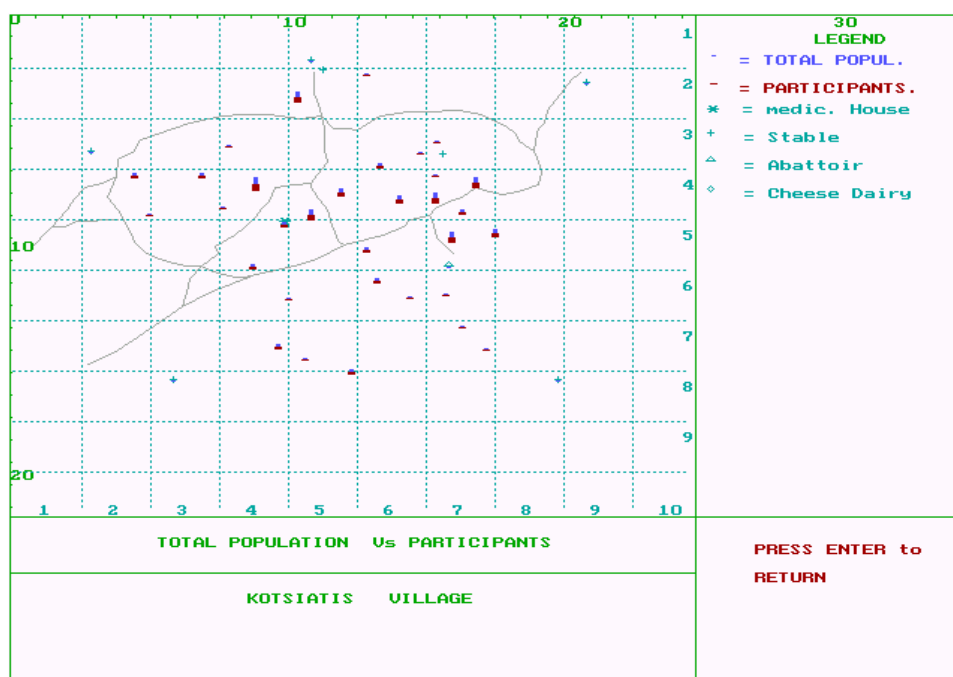
Ανθρώπινος πληθυσμός

Ο συνολικός πληθυσμός του χωριού Κωτσιάτης ήταν 150 κάτοικοι. Τελικά κατορθώθηκε 79 κάτοικοι να συμμετέχουν στη μελέτη εκ των οποίων 15 ήταν παιδιά.

Το ποσοστό συμμετοχής στη μελέτη (response rate) ήταν 52,46%. 47 από τους 79 συμμετέχοντες κατοίκους (59,5%) βρέθηκαν να είναι ορροθετικοί με τίτλο αντισωμάτων $\geq 1/60$.

Η γεωγραφική κατανομή των ορροθετικών κατοίκων Κωτσιάτη σε επίπεδο μικρής κατανομής (επίπεδο χωριού) απεικονίζεται στο σχήμα 16.

Σχήμα 16: Γεωγραφική κατανομή ορροθετικών συμμετεχόντων στο χωριό Κωτσιάτης



Χρησιμοποιώντας τα αυξομειούμενα τετράγωνα και το χ^2 καλής εφαρμογής δεν ανεβρέθηκε περιοχή με συγκέντρωση ορροθετικών ατόμων στον Κωτσιάτη.

Ζωικός πληθυσμός

Έγινε συλλογή ορρών από 55 αίγες και 119 πρόβατα. Από τις 55 αίγες οι 31 (56,4%) βρέθηκαν ορροθετικές με τίτλο αντισωμάτων $\geq 1/60$. Από τα 119 πρόβατα, 36 (30,3%) βρέθηκαν ορροθετικά με τίτλο αντισωμάτων $\geq 1/60$.

ΠΑΡΑΜΑΛΙ

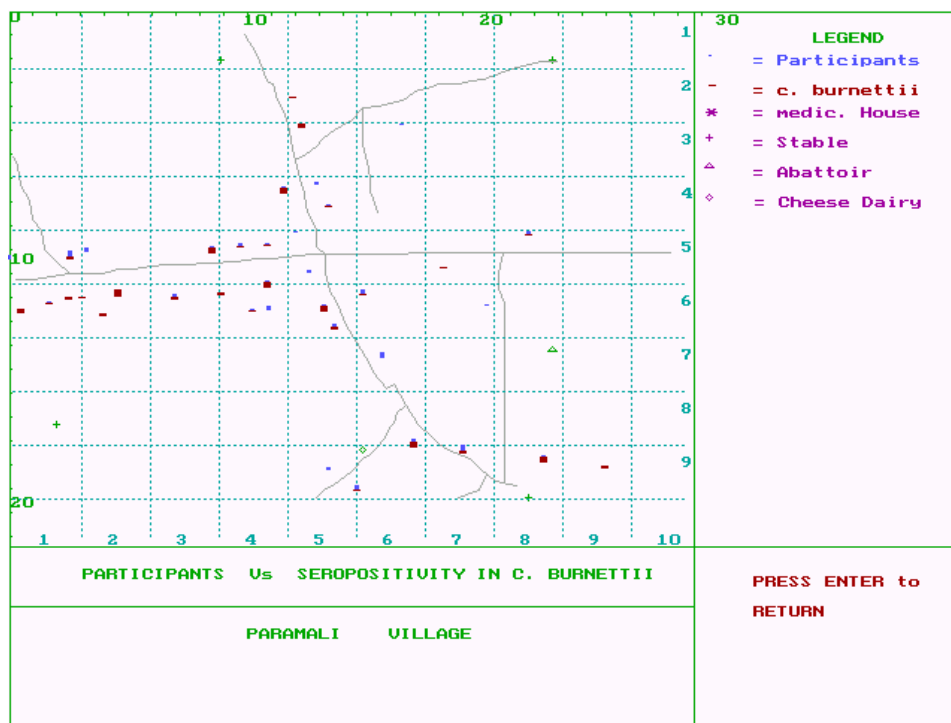
Ανθρώπινος πληθυσμός

Ο συνολικός πληθυσμός του χωριού Παραμάλι ήταν 198 κάτοικοι. Τελικά κατορθώθηκε η συμμετοχή 121 κατοίκων στη μελέτη εκ των οποίων 21 ήταν παιδιά. Το ποσοστό συμμετοχής στη μελέτη (response rate) ήταν 61,8%.

64 από τους 121 συμμετέχοντες (52,9%) βρέθηκαν να είναι ορροθετικοί με τίτλο αντισωμάτων $\geq 1/60$.

Η γεωγραφική κατανομή των ορροθετικών κατοίκων Παραμαλιού σε επίπεδο μικρής κατανομής (επίπεδο χωριού) απεικονίζεται στο σχήμα 17.

Σχήμα 17: Γεωγραφική κατανομή ορροθετικών συμμετεχόντων στο χωριό Παραμάλι



Χρησιμοποιώντας τα αυξομειούμενα τετράγωνα και το χ^2 καλής εφαρμογής δεν ανεβρέθηκε περιοχή με συγκέντρωση ορροθετικών ατόμων στο Παραμάλι.

Ζωικός πληθυσμός

Έγινε συλλογή ορρών από 46 αίγες, 137 πρόβατα και 26 βοοειδή.

Από τις 46 αίγες οι 21 (45,7%) βρέθηκαν ορροθετικές με τίτλο αντισωμάτων $\geq 1/60$. Από τα 137 πρόβατα, 29 (21,2%) βρέθηκαν ορροθετικά με τίτλο

Comment [51]:

αντισωμάτων $\geq 1/60$.

Από τα 26 βροοειδή, 5 (19,2%) βρέθηκαν ορροθετικά με τίτλο αντισωμάτων $\geq 1/60$.

ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ ΟΡΡΟΘΕΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟ ΠΛΗΘΥΣΜΟ ΤΩΝ ΠΕΡΙΟΧΩΝ ΥΨΗΛΟΥ ΚΙΝΔΥΝΟΥ

Ηλικία

Η μέση ηλικία των ορροθετικών βρέθηκε 44,7 χρόνια και ήταν στατιστικώς σημαντικά υψηλότερη από τη μέση ηλικία των ορροαρνητικών, 33,5 χρόνια.

Η ορροθετικότητα στα παιδιά βρέθηκε 27,8 χρόνια (10/36), στατιστικώς σημαντικά χαμηλότερη από αυτή των ενηλίκων η οποία ήταν 61,5% (96/156) ($0,40 < RR = 0,53 < 0,71$).

Επάγγελμα

Από το σύνολο των 200 συμμετεχόντων η κατηγορία του επαγγέλματος ήταν γνωστή για τους 165. Από τα 34 άτομα που είχαν επάγγελμα της κατηγορίας ΕΡΓ1, οι 31 (91,2%) βρέθηκαν ορροθετικοί. Από τους 31 που ανήκαν στην κατηγορία ΕΡΓ2 οι 25 (80,6%) βρέθηκαν ορροθετικοί ενώ από τους 100 που ανήκαν στην κατηγορία ΕΡΓ3 οι 41 (41%) βρέθηκαν ορροθετικοί.

Είναι φανερό ότι όσοι ανήκουν στην κατηγορία ΕΡΓ1 διατρέχουν σαφώς μεγαλύτερο κίνδυνο να γίνουν ορροθετικοί σε σύγκριση με την κατηγορία ΕΡΓ2 και ΕΡΓ3 ($P < 0,000001$).

Φύλο

Δεν αναφέρθηκε συσχέτιση της ορροθετικότητας με το φύλο ($P = 0,68$).

Κήπος, Κοπριά

Από τους 148 συμμετέχοντες που δήλωσαν ότι είχαν κήπο, οι 87 ανεβρέθηκαν ορροθετικοί (58,8%) σε σύγκριση με 12 από 26 (46,2%) που

δήλωσαν ότι δεν είχαν κήπο. Η διαφορά αυτή δεν είναι στατιστικώς σημαντική ($P=0,32$).

Αναλύοντας όμως την πληροφορία της χρήσης κοπριάς στους κήπους, βρέθηκαν ορροθετικοί 70 από τους 104 (67,3%) σε σύγκριση με 20 από τους 58 (34,5%) που δεν χρησιμοποιούσαν κοπριά. Είναι φανερό ότι η χρήση κοπριάς είναι σημαντικός παράγοντας κινδύνου για ορροθετικότητα ($1,34 < RR = 1,95 < 2,85$, $P < 0,001$).

Ιδιοκτησία ζώων

Αιγοπρόβατα

Από τους 77 που δήλωσαν επαφή με αιγοπρόβατα, οι 58 (75,3%) βρέθηκαν ορροθετικοί σε σύγκριση με 43 από τους 102 (42,2%) που δεν είχαν επαφή με αιγοπρόβατα.

Η επαφή με αιγοπρόβατα είναι σημαντικός παράγοντας κινδύνου για την ορροθετικότητα ($1,38 < RR = 1,79 < 2,32$, $P < 0,0001$).

Ποντικοί

Συγκρίνοντας την ορροθετικότητα σε αυτούς που δήλωσαν την ύπαρξη ποντικών στο περιβάλλον τους με αυτούς που δεν δήλωσαν την ύπαρξη ποντικών στο περιβάλλον τους φαίνεται μία συσχέτιση της ύπαρξης ποντικών με την ορροθετικότητα ($0,71 < RR = 0,83 < 0,96$, $P = 0,01$).

Κάνοντας στρωματοποιημένη ανάλυση και λαμβάνοντας υπόψη την επαφή με αιγοπρόβατα, η διαφορά αυτή εξαφανίζεται ($P = 0,39$).

Ιδιοκτησία άλλων ζώων

Σκύλος

Καμία σχέση δεν βρέθηκε να υπάρχει μεταξύ ιδιοκτησίας σκύλου και ορροθετικότητας καθώς και με προβλήματα υγείας των σκύλων (ύπαρξη κροτώνων ή άλλα προβλήματα).

Γάτος

Επίσης δεν βρέθηκε να υπάρχει συσχέτιση με την ιδιοκτησία γάτου ή γάτου με προβλήματα υγείας και ορροθετικότητας.

Κουνέλια

Δεν βρέθηκε να υπάρχει καμία σχέση μεταξύ ιδιοκτησίας κουνελιών και ορροθετικότητας.

Βοοειδή

Δεν βρέθηκε να υπάρχει καμία σχέση μεταξύ ιδιοκτησίας βοοειδών και ορροθετικότητας.

Διατροφικές συνήθειες

Καμία σημαντικά στατιστική σχέση δεν βρέθηκε μεταξύ των ατόμων που καταναλώνουν φρέσκο άβραστο γάλα και ορροθετικότητας.

Αποβολές ζώων

Οι ιδιοκτήτες αιγοπροβάτων που ανέφεραν στο ιστορικό ότι είχαν αποβολές στα αιγοπρόβατα είχαν στατιστικά μεγαλύτερο κίνδυνο να είναι ορροθετικοί συγκριτικά με εκείνους που δεν ανέφεραν ότι είχαν αποβολές στα ζώα τους ($1,13 < RR = 2,01 < 3,57, P < 0,05$).

Για να αποκλειστούν οι συγχυτικοί παράγοντες και οι αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στους παράγοντες κινδύνου, εξετάστηκαν όλοι ταυτόχρονα με τη χρήση μοντέλου πολλαπλής παλινδρόμησης (Logistic Regression Analysis). ($1,2 < RR = 2,2 < 3,7, P < 0,01$)

ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ

Δεν ανεβρέθηκε συσχέτιση της ορροθετικότητας με συμπτώματα πνευμονίας ή πυρετού αγνώστου αιτιολογίας.

Παράγοντες κινδύνου ορροθετικότητας στο ζωικό πληθυσμό των περιοχών υψηλού κινδύνου

Είδος ζώου

Παρατηρήθηκε σημαντικά αυξημένος κίνδυνος ορροθετικότητας στις αίγες σε σύγκριση με τα αιγοπρόβατα ($1,30 < RR = 1,86 < 2,67$, $P < 0,001$).

Ηλικία

Η μέση ηλικία των ορροθετικών ζώων υπολογίστηκε 3,5 χρόνια η οποία ήταν ελαφρώς μεγαλύτερη από τη μέση ηλικία των ορροαρνητικών χωρίς η διαφορά να είναι στατιστικώς σημαντική ($P = 0,19$).

Παρασίτωση από κρότωνα

Στο ιστορικό που λήφθηκε από τους ιδιοκτήτες των ζώων δεν δόθηκε η πληροφορία για τέτοια παρασίτωση.

Αριθμός των ζώων και κατάσταση υποστατικών

Δεν αναφέρθηκε συσχέτιση ανάμεσα στον αριθμό των ζώων και στην κατάσταση των υποστατικών.

Ενισχυμένη επιτήρηση πυρετού Q στις περιοχές υψηλού κινδύνου

Από το χωριό Κωτσιάτης εντάχθηκαν στο πρόγραμμα της ενισχυμένης επιτήρησης 32 ορροαρνητικοί κάτοικοι ενώ από το χωριό Παραμάλι εντάχθηκαν 57 ορροαρνητικοί κάτοικοι.

Οι συνεργαζόμενοι ιατροί πραγματοποίησαν 12 κατ' οίκον μηνιαίες επισκέψεις στους συμμετέχοντες αναζητώντας ύποπτες ή πιθανές περιπτώσεις πυρετού Q με βάση τον ορισμό που αναφέρεται στη μεθοδολογία.

Παράλληλα, υπήρχε άριστη συνεργασία με τους ιατρούς που επανδρώνουν τα αγροτικά ιατρεία οι οποίοι ειδοποιούσαν τους συνεργαζόμενους ιατρούς σε περίπτωση που παρουσιαζόταν ύποπτη ή πιθανή περίπτωση πυρετού Q σε άτομα που συμμετείχαν στην ενισχυμένη επιτήρηση.

Οκτώ από τους 89 αρχικούς συμμετέχοντες στην παρακολούθηση δεν ανεβρέθηκαν σε δύο συνεχόμενες μηνιαίες επισκέψεις και αποκλείστηκαν από τη συνέχιση του προγράμματος.

Κατά τη διάρκεια της ετήσιας παρακολούθησης ανεβρέθηκαν συνολικά και στα δύο χωριά δεκατρείς ύποπτες περιπτώσεις πυρετού Q από τις οποίες επιβεβαιώθηκαν εργαστηριακά οι δύο.

Δεν κατέστη δυνατό να απομονωθεί η *C.burnettii* από τις δύο βεβαιωμένες περιπτώσεις.

Στο τέλος της ετήσιας παρακολούθησης ελήφθη ορρός για επανέλεγχο αντισωμάτων από 81 συμμετέχοντες οι οποίοι στην πρώτη εξέταση ήταν ορροαρνητικοί. Οι 36 από τους 81 (45,5%) παρουσίασαν αντισώματα IgG έναντι της *C.burnettii* με τίτλο $\geq 1/60$ ενώ με τίτλο $\geq 1/120$ ανεβρέθηκαν 20 από τους 81 συμμετέχοντες (25,3%). Παράλληλα, ανεβρέθηκαν 19 συμμετέχοντες από τους 81 (24,8%) να έχουν και αντισώματα IgM με τίτλο $\geq 1/25$. Επίσης, 8 συμμετέχοντες (10,1%) είχαν αντισώματα IgA $\geq 1/25$.

Από τα δύο χωριά εντάχθηκαν στο πρόγραμμα παρακολούθησης 49 ορροαρνητικές αίγες, 191 ορροαρνητικά πρόβατα και 21 ορροαρνητικά βοοειδή. Συνεργαζόμενοι κτηνίατροι πραγματοποίησαν 12 μηνιαίες

επισκέψεις στις μονάδες με ορροαρνητικά ζώα αναζητώντας ύποπτες περιπτώσεις πυρετού Q με βάση τον ορισμό που αναφέρεται στη μεθοδολογία.

Τέσσερις από τις συμμετέχοντες αίγες, 9 πρόβατα και 2 βοοειδή που δεν ανεβρέθηκαν έστω και σε μία μηνιαία επίσκεψη αποκλείστηκαν από τη συνέχιση του προγράμματος.

Κατά τη διάρκεια της ετήσιας παρακολούθησης ανεβρέθηκαν συνολικά και στα δύο χωριά 3 ύποπτες περιπτώσεις από αίγες, 4 από πρόβατα και κανένα από τα βοοειδή. Από τις περιπτώσεις αυτές μία επιβεβαιώθηκε εργαστηριακά σε αίγα από την οποία και απομονώθηκε *C.burnettii*.

Στο τέλος της ετήσιας παρακολούθησης λήφθηκε ορρός για επανέλεγχο αντισωμάτων από 45 αίγες, 175 πρόβατα και 19 βοοειδή που ήταν ορροαρνητικά κατά την πρώτη εξέταση. Δέκα αίγες (24,3%), 21 πρόβατα (12%) και 2 βοοειδή (10,5%) βρέθηκαν να έχουν αντισώματα $IgG \geq 1/60$.

ΦΑΣΗ ΤΡΙΤΗ

ΕΝΙΣΧΥΜΕΝΗ ΕΠΙΤΗΡΗΣΗ ΠΥΡΕΤΟΥ Q ΣΕ ΟΛΗ ΤΗΝ ΚΥΠΡΟ

Ανθρώπινος πληθυσμός

Η ενισχυμένη επιτήρηση διήρκησε 1 χρόνο και σε αυτή περιλήφθηκαν νοσοκομεία, κέντρα υγείας παροχής πρωτοβάθμιας περίθαλψης, ιδιωτικές κλινικές και ιδιώτες ιατροί.

Με βάση τα κριτήρια που αναφέρθηκαν στη μεθοδολογία κατά τη διάρκεια της ενισχυμένης επιτήρησης ανεβρέθηκαν 82 περιπτώσεις οι οποίες χαρακτηρίστηκαν ύποπτες για πυρετό Q.

Από τις ύποπτες περιπτώσεις έγινε ορολογικός έλεγχος και επί πλέον σε 20 περιπτώσεις έγινε δεύτερος ορολογικός έλεγχος (paired sera) σε 15 ημέρες από την πρώτη δειγματοληψία.

Ακόμα, σε 20 περιπτώσεις έγινε δυνατή η λήψη πλάσματος για εφαρμογή της μεθόδου shell vial με στόχο την απομόνωση *C.burnettii*.

Τελικά, 9 περιπτώσεις χαρακτηρίστηκαν σαν βεβαιωμένες από τις οποίες σε 3 έγινε απομόνωση της *C.burnettii*.

Ζωικός πληθυσμός

Η ενισχυμένη επιτήρηση περιέλαβε τοπικούς Κτηνιατρικούς σταθμούς, Επαρχιακά Κτηνιατρικά Γραφεία και ιδιωτικές κτηνιατρικές κλινικές.

Με βάση τα κριτήρια που αναφέρθηκαν στη μεθοδολογία κατά τη διάρκεια της ενισχυμένης επιτήρησης ανεβρέθηκαν 100 περιπτώσεις από αίγες και 76 από πρόβατα οι οποίες χαρακτηρίστηκαν ύποπτες. Από τις ύποπτες αυτές περιπτώσεις έγινε ορολογικός έλεγχος, λήψη πλάσματος για εφαρμογή της μεθόδου shell vial και μικροσκοπικός έλεγχος των πλακούντων και των εμβρύων.

Από τις 100 ύποπτες περιπτώσεις στις αίγες οι 8 χαρακτηρίστηκαν σαν βεβαιωμένες ενώ από τις 76 ύποπτες περιπτώσεις στα πρόβατα οι 4 χαρακτηρίστηκαν σαν βεβαιωμένες (τίτλος αντισωμάτων 1/120-1/480) και σε

δύο από τις 8 αίγες απομονώθηκε *C.burnettii* με την τεχνική shell vial.

Ανθρώπινος πληθυσμός

Για πρώτη φορά καταγράφηκαν βεβαιωμένες περιπτώσεις πυρετού Q στην Κύπρο στο γενικό πληθυσμό. Ο αριθμός των κρουσμάτων που καταγράφηκε (2 περιπτώσεις σε ένα χρόνο) μπορεί να χαρακτηριστεί ιδιαίτερα μικρός σε σύγκριση με την οροθετικότητα που αποτυπώθηκε στην οροεπιδημιολογική μελέτη της πρώτης φάσης (52,7%). Παράλληλα, όπως φαίνεται και από τα αποτελέσματα της επιτήρησης στις περιοχές υψηλού κινδύνου και από τα αποτελέσματα του επανελέγχου των αρνητικών ατόμων (Δεύτερη φάση) σημαντικό ποσοστό των ατόμων που έρχονται σε επαφή με την *C.burnettii* δεν νοσούν ή παρουσιάζουν πολύ ήπια συμπτωματολογία.

Επίσης, για πρώτη φορά απομονώθηκε *C.burnettii* από ασθενείς με πυρετό Q στην Κύπρο.

Ζωικός πληθυσμός

Η ανεύρεση περισσότερων βεβαιωμένων περιπτώσεων σε αίγες παρά σε πρόβατα κατά τη διάρκεια της ενισχυμένης επιτήρησης του ζωικού πληθυσμού σε όλη την Κύπρο επιβεβαιώνει τα αποτελέσματα της πρώτης και της δεύτερης φάσης όπου βρέθηκε σημαντικά υψηλότερη οροθετικότητα στις αίγες παρά στα πρόβατα. Αυτό είναι συμβατό με την γενικά παραδεκτή νοσηρότητα που παρατηρείται στις αίγες από λοιμογόνους παράγοντες σε σύγκριση με τα πρόβατα.

SUMMARY

Q Fever in human and animals is endemic in almost all the Mediterranean region. In Cyprus although previous serosurveys revealed low seropositivity for *C.burnettii* among human and animal population, no previous study on the epidemiology of Q Fever existed. It was a need for a study to be undertaken to investigate all the epidemiological aspects related to the above disease using as tools the Geographical Information System and Molecular Biology Techniques in order to increase the power of the study.

The main objectives of the study were:

1. Descriptive epidemiological study of Q Fever in Cyprus in both humans, animals and ticks in order to estimate the magnitude of the disease.
2. Analytical epidemiological study in high risk regions in order to investigate all the epidemiological aspects which are related to the disease transmission to humans.
3. Surveillance of Q Fever in humans and animals to detect acute cases of the disease and assess the pathogenicity of *C.burnettii*.

The whole study was divided in 3 phases.

Phase 1. In this phase of the study the following were included:

- Seroepidemiological study in humans and animals
- Detection of *C.burnettii* in ticks
- Computerized mapping program of Cyprus

The main objectives were:

- Estimate the seropositivity in human and animal population
- Asses the risk factors of seropositivity
- Detection of endemic areas
- Detection of “high risk as regions”

To estimate the needed sample for the serosurvey the EPI-INFO program and the Stratified Population Survey Sampling Method was used. The sample was estimated using expected prevalence as found in other studies in the Mediterranean region and 95% confidence interval. Ticks were also collected from animal population. A detailed questionnaire was used to obtain from animal owners regarding possible risk factors for seropositivity. Immunofluorescence Assay (IFA) was used to examine sera for antibodies against *C.burnettii*. Shell Vial Technique was applied to isolate intracellular presence of *C.burnettii* while PCR, nested PCR and RFLP were used to detect *C.burnettii* from ticks. Using the Computerized Mapping Program (CMP) a country map was created with the facility of zoom of the selected areas with all the information needed for the study allowing the visualization of the seropositivity.

The seropositivity against *C.burnettii* for the whole human population of Cyprus was estimated 52.7% using 1/60 titre as a cut of IgG antibodies while 7.5% had a titre 1/25 for IgM antibodies. Goats' seropositivity was estimated 48.1% sheep 18.4% and bovine 24%. Eleven out of 141 ticks were found positive for *C.burnettii*.

Seropositivity was found higher among the adults and in agricultural areas. Moreover, it was related with occupation. Also a strong association was revealed between animal contacts (goat and sheep)

and their seropositivity to *C.burnettii*. The relative risk was higher when animal abortion or tick infestation was mentioned.

Phase 2. During this phase after the detection of two high-risk regions analytical epidemiological study in human and animals was conducted. Moreover, surveillance of clinical cases in human and animals was established for the two high-risk regions and the computerized mapping program of Cyprus was used in local distribution. The main objectives were:

- to assess risk factors for conducting the disease
- to detect clinical cases in human and animals
- to assess the clinical spectrum of the disease
- to estimate the ratio between clinical cases and seropositivity

Analytical epidemiological study in the villages Kotsiatis and Paramali (high risk regions) was conducted. The total population of Kotsiatis was 150 inhabitants while the population of Paramali was 198 inhabitants. All population of the two villages was asked to participate in the study. About 79 individuals from Kotsiatis and 121 from Paramali participated in the study. 10% of the animals owned by the participants were randomly sampled. The size of the random sample was calculated using the results of the first phase. Detailed questionnaires were also used to obtain information.

The negative individuals, humans and animal of the two villages under study, were followed up for one year by monthly visits to detect clinical cases of Q Fever. Moreover, all participants and animals under study were tested at the end of the follow up period to estimate how many became seropositive without clinical symptoms.

The seropositivity of the human population of Kotsiatis was estimated 59.5% and for the population of Paramali 52.9% while the animal population's seropositivity was 43.3% for the animals of Kotsiatis and 28.7% for the animals of Paramali. 13 individuals from the two villages were suspected for Q Fever while only two were laboratory confirmed. The 2nd serological test after one year proved that a significant percentage of the participants became seropositive. Important factor for the transmission from animals to humans and from animals to humans for *C.burnettii* proved to be the tick infested goats and sheep.

Phase 3. During the third phase, surveillance of Q Fever was implemented in the whole island in order to detect human and animal cases. Case definitions for suspected cases were prepared and disseminated to the hospitals all over Cyprus in order to collect the suspected cases of Q Fever to be tested serologically and by shell vial technique. The enhanced surveillance lasted one year. Following the case definition in hospitals, 120 individuals were classified as suspected for Q Fever and 3 of them were Laboratory confirmed as Q Fever. *C.burnettii* was isolated by shell vial technique. *C.burnettii* was also isolated from two goats and one sheep, which aborted during the surveillance period.

Conclusions:

- High seropositivity in humans
- High seropositivity in goat and sheep. Significantly higher in goats.
- Detection of *C.burnettii* in a relatively high percentage of ticks
- Ticks infestation of goats and sheep are important in the epidemiology of Q Fever in Cyprus
- Clinical cases of Q Fever were not previously diagnosed because of decreased clinical suspicion
- The seropositivity estimated in epidemiological studies is not indicative of the incidence of acute cases of Q Fever since the majority of the seropositive humans and animals are subclinical cases
- Using the Computerized Mapping Program the "high risk region" can be detected and surveillance can be achieved

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Adesiyun AA, Jagun AG, Kwaga LK, et al. Shedding of *C.burnettii* in milk by Nigerian dairy and dual purposes cows. *Int. J. Zoonoses*. 1985;**12**(1):1-5
2. Aitken D, Bogel K, Cracea E, et al. Q fever in Europe: Current Aspects of Aetiology, Epidemiology, Human Infection, Diagnosis and Therapy. *Infection*. 1987;**15**:323-37
3. Alkan WJ, Alkaly L, Klingberg W, et al. A study of Q fever in Central Israel. *Scand. J Infect. Dis*. 1973;**5**:17-21
4. Amano K, Williams JC. Chemical and immunological characterization of lipopolysaccharides from phase I and II *Coxiella burnettii*. *J. Bacteriol*. 1984;**160**:994-1002
5. Amano K, Williams JC. Sensitivity of *Coxiella burnettii* peptidoglycan to lysozyme hydrolysis and correlation of sacculus rigidity with peptidoglycan-associated proteins. *K.Bacteriol*. 1984;**160**:989-993
6. Amano K, Williams JC, McCaul TF, Peacock MG. Biochemical and immunological properties of *Coxiella burnettii* cell wall and peptideglycan-protein complex fractions. *J. Bacteriol*. 1984;**160**:982-988
7. Amano K, Williams JC, Missler SR, Reinhold VN. Structure and biological relationships of *Coxiella burnettii* lipopolysaccharides. *J. Biol. Chem*. 1987;**262**:4740-4747
8. Anderson BE, Regnery RL, Carlone GM, Tzianabos T, McDade JE, Fu ZY, Bellini WJ. Sequence analysis of the 17-kilodalton-antigen gene from *Rickettsia rickettsii*. *J. Bacteriol*. 1987;**169**:2385-2390
9. Anderson BE, Tzianabos T. Comparative sequence analysis of a genus-common rickettsial antigen gene. *J. Bacteriol*. 1989;**171**:5199-5201
10. Azad AF, Webb L, Carl M, Dasch GA. Detection of rickettsiae in arthropod vectors by DNA amplification using the polymerase chain reaction. *Ann. N.Y. Acad*. 1990;**590**:557-563
11. Baca OG. Pathogenesis of Rickettsial infections emphasis on Q fever. *Eur. J. Epidemiol*. 1991;**7**:222-228

12. Baca OG, Akporiaye ET, Argon AS, Martinez IL, Robles MV Warner NL. Fate of phase I and phase II *Coxiella burnettii* in several macrophage-like tumor cell lines. *Infect. Immun.* 1981;**33**:258-266
13. Baca OG, Paretsky D. Partial chemical characterization of a toxic lipopolysaccharide from *Coxiella burnettii*. *Infect. Immun.* 1974;**9**:959-961
14. Baca OG, Paretsky D. Q fever and *Coxiella burnettii*: a model for host-parasite interactions. *Microbiol. Rev.* 1983;**47**:127-149
15. Badudieri B. Q fever: A zoonosis. *Adv Vet Sci* 1959;**5**:81-181
16. Belec L, Gresenguet G, Ekala MT, et al. *Coxiella burnettii* infection among subjects infected with HIV type I in the Central African Republic. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 1993;**12**(10):777-778
17. Biberstein E.L., Behymer D.E., Burhnell G., et al: A survey of Q fever (*Coxiella burnettii*) in California dairy cows. *Am. J. Res.* 1974;**35**:1577-1582
18. Bonetti B, Monaco S, Ferraru S, et al. Demyelinating polyradiculoneuritis following *Coxiella burnettii* infection (Q fever). *Ital. J. Neurol Sci.* 1991;**12**(4):415-417
19. Botros BA, Soliman AK, Salib AW, et al. *Coxiella burnettii* antibody prevalences among human populations in north-east Africa determined by enzyme immunoassay. *J. Trop. Med Hyg.* 1995;**98**(3):173-178
20. Bozeman FM, Humphries JW, Campbell JM. A new group of Rickettsia-like agents recovered from Guinea pigs. *Acta. Virol. (Praha).* 1968;**12**:87-93
21. Brown CC, Olander HJ, Castro AE, et al. Prevalence of antibodies in goats in northern-eastern Brasil to selected viral and bacterial agents. *Trop. Anim. Health. Prod.* 1989;**21**:167-169
22. Brenner DJ. Classification of Legionellaceae. *Isr. J. Med. Sci.* 1986;**22**:620-632
23. Brenner DJ, Feeley JC, Weaver RE. Family VII Legionellaceae, pp. 279-288 *In* Krieg NR, Holt JG (ed.). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 1. Williams and Wilkins, Baltimore, USA
24. Brenner DJ, Steigerwalt AG, McDade JE, Feeley JC, Mandel M. Classification of the legionnaires' disease bacterium: *Legionella pneumophila*, genus novum,

- species nova, of the family Legionellaceae, family nova. *Ann. Intern. Med.* 1978;**90**:656-658
25. Brezina Q. Phase variation phenomenon in *Coxiella burnettii*, pp. 221-235 *In* Kazar J, Ormsbee RA, Tarasevitch (ed.). *Rickettsia and rickettsial diseases*, Veda, Bratislava
26. Brouqui P. Les formes chroniques de la fièvre Q (Thesis). Marseille, 1990
27. Brouqui P, Dumler S, Raoult D. Immunohistologic demonstration of *Coxiella burnettii* in the valves of patients with Q fever endocarditis. *Am. J. Med.* 1994;**97**:451-458
28. Bru JP, Stahl JP, Gaillat J, et al. Enquete epidemiologic de la fièvre dans une commune rurale. *Lyon. Med.* 1983;**249**:549-461
29. Burnet FM, Freeman M. Experimental studies on the virus of «Q» fever. *Med. J. Austral.* 1937;**2**:299-305
30. Burnet FM, Freeman M. Note on a series of laboratory infections with the rickettsia of Q fever. *Med. J. Austral.* 1939;**1**:11-12
31. Cartun RN, Pederson WCA. An immunocytochemical technique offering increase sensitivity and a lower cost with streptavidin horseradish-peroxidase conjugate. *J. Histotechnol.* 1989;**12**:273-277
32. Caminopetros. Q fever, a respiratory human epidemic disease in the Mediterranean area, determined a milk-borne infection from goats and sheep, pp. 441-xxx *In* Proceedings of the fourth international congresses on tropical medicine and malaria. Washington
33. Caminopetros J. La Q fever en Grèce: le lait source de l' infection pour l' homme et les animaux. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 1948;**23**:107-118
34. Christie AB. Q fever, p. 800 *In* Christie AB (ed.). *Infectious diseases: Epidemiology and clinical practice*, Churchill Livingstone, New York
35. Connolly JH, Coyle PV, Adgey AA, et al. Clinical Q fever in Northern Ireland 1962-1989. *Ulster. Med. J.* 1990;**59(2)**:137-144
36. Cour Boceda MI, Gonzalez Coadrado S, et al. *Coxiella burnettii*: serologic study in various populations. *An. Med. Interna.* 1990;**7(10)**:513-516

37. Davis GE, Cox HR. A filter-passing infectious agent isolated from ticks. Isolation from *Dermacentor andersoni*, reactions in animals, and filtration experiments. *Public Health Rep.* 1938;**53**:2259-2267
38. Davoust B, Raoult D, Toulze M, et al. Sondage serologique. *Rev. Med. Vet.* 1986;**137**:521-524
39. De Ruiz HL. Q fever in Colombia, S.A. A serological survey of human and bovine populations. *Zentralbl. Veterinarmed [B]*. 1977;**24**:287-292
40. Derrick EH. «Q» fever, a new fever entity: clinical features, diagnosis and laboratory investigation. *Med. J. Austral.* 1937;**2**:281-299
41. Dupont HT, Bronqui P, Faugere B, et al. Prevalence of antibodies to *Coxiella burnettii*, *Rickettsia conorii*, and *rickettsia typhi* in seven African countries. *Clin. Infect. Dis.* 1995;**21(5)**:1126-1133
42. Dupuis G, et al. Immunoglobulin Responses in Acute Q fever. *Journal of Clinical Microbiology.* 1985;**4**:484-487
43. Dupuis G, Peter O, Peacock M, Burgdorfer W, Haller E. Immunoglobulin responses in acute Q fever. *Nature.* 1985;**22**:484-487
44. Dupuis G., et al. Aspects cliniques observes lors d'une epidemie de 415 cas de fièvre Q. *Schweiz. Med. Wochenschr.* 1985;**115**:814-818
45. Dupuis G, Peter O, Mottiez MC, et al. Seroprevalence de la fièvre Q humaine en Suisse. *Schweiz. Med. Wochenschr.* 1986;**116**:494-498
46. Dupuis G, Petite J, Peter O, et al. An important outbreak of human Q fever in a Swiss Alpine valley. *Int. J. Epidemiol.* 1987;**16**:282-287
47. Dyer RE. Similarity of Australian «Q» fever and a disease caused by infectious agent isolated from ticks in Montana. *Public Health Rep.* 1939;**54**:1229-1237
48. Dyer RE, Topping NH, Bengston IA. An institutional outbreak of pneumonitis. II. Isolation and identification of the causative agent. *Public Health Rep.* 1940;**55**:1945-1954
49. Editorial. Experimental Q fever in man. *Br. Med. J.* 1950;**1**:1000
50. Editorial. Comment on Q fever transmitted by blood transfusion-United States. *Can. Dis. Wkly. Rep.* 1977;**3**:210

51. Ellis ME, Smith CC, Moffat MA. Chronic or fatal Q fever infection: a review of 16 patients seen in North-East Scotland (1967-80). *Q. J. Med.* 1983;**52**:54-66
52. Eklund CM, Parker RR, Lackman DB. Case of Q fever probably contacted by exposure to ticks in nature. *Public Health Rep.* 1947;**62**:1413
53. Elwell LP, Shipley PL. Plasmid-mediated factors associated with virulence of bacteria to animals. *Annu. Rev. Microbiol.* 1980;**34**:465-496
54. Embley TM. The linear PCR reaction: a simple and robust method for sequencing amplified rRNA genes. *Lett. Appl. Microbiol.* 1991;**13**:171-174
55. Fan MY, Walker DH, Yu SR, et al. Epidemiology and ecology of rickettsial diseases in the Peoples of Republic in China. *Rev. Infect. Dis.* 1987;**9**:823-840
56. Felsenstein J. Phylogenies from molecular sequences: inference and reliability. *Annu. Rev. Genet* 1988;**22**:521-565
57. Fergusson RJ, Shaw TR, Kitchin AH, Matthews MB, Inglis JM, Peutherer. Subclinical chronic Q fever. *Q. J. Med.* 1985;**57**:669-676
58. Fiset P, Woodward TE. Q fever, pp. 435-448 *In* Evans AS, Feldman HA (ed.). *Bacterial Infections of Humans*, Phenum Medical Book Company, New York. 1982
59. Fitch WM, Margoliash E. Construction of phylogenetic trees: a method based on mutational distances as estimated from cytochrome c sequences is of general applicability. *Science.* 1967;**155**:279-284
60. Fox GE, Pechman KR, Woese CR. Comparative cataloging of 16S ribonucleic acid: molecular approach to procaryotic systematics. *Int. J. Systematic Bacteriol.* 1977;**27**:44-57
61. Frazier ME, Mallavia LP, Samuel JE, Baca OG. DNA probes for the identification of *Coxiella burnettii* strains. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1990;**590**:445-458
62. Frothingham R, Wilson KH. Sequence-based differentiation of strains in the *Mycobacterium avium* complex. *J. Bacteriol.* 1993;**175**:2818-2825
63. Garrity GM, Brown A, Vickers RM. The effects of streptomycin or dihydrostreptomycin binding to 16S RNA or to 30S ribosomal subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1980;**71**:3814-3818

64. Gimenez DF. Staining rickettsiae in yolk-sac cultures. *Stain Technol.* 1964;**39**:135-140
65. Goelz SE, Hamilton SE, Vogelstein B. Purification of DNA from formaldehyde fixed and paraffin embedded human tissue. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1985;**130**:118-126
66. Hackstadt T. Antigenic variation in the phase I lipopolysaccharide of *Coxiella burnettii* isolates. *Infect. Immun.* 1986;**52**:337-340
67. Hackstadt T, Peacock MG, Hitchcock PJ, Cole RL. Lipopolysaccharide variation in *Coxiella burnettii*: intrastrain heterogeneity in structure and antigenicity. *Inf. Immun.* 1985;**48**:359-365
68. Hackstradt T, Williams JC. Biochemical stratagem for obligate parasitism of eukaryotic cells by *Coxiella burnettii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1981;**78**:3240-3244
69. Hall JC, Richmond JS, Owen Caul E., et al. Laboratory outbreak of Q fever acquired from sheep. *The Lancet* 1982;1004-1006
70. Harman JB. Q fever in Great Britain; clinical account of eight cases. *The Lancet* 1949;**2**:1028-1030
71. Heard SR, Ronalds CJ, Health RB. *Coxiella burnettii* infection in immunocompromised patients. *J. Infection* 1985;**11**:15-18
72. Heinzen RA, Frazier ME, Mallavia LP. Nucleotide sequence of *Coxiella burnettii* superoxide dismutase. *Nucl. Acid. Res.* 1990;**18**:6437
73. Heinzen RA, Mallavia LP. Cloning and functional expression of the *Coxiella burnettii* citrate synthase gene in *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 1987;**55**:848-855
74. Heinzen R, Stiegler GL, Whiting LL, Schmitt SA, Mallavia LP, Frazier ME. Use of the pulsed field gel electrophoresis to differentiate *Coxiella burnettii* strains. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1990;**590**:504-513
75. Hendrix LR, Samuel JE, Mallavia LP. Identification and cloning of a 570-kDa *Coxiella burnettii* immunoreactive protein. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1990;**590**:534-540

76. Hendrix LR, Samuel JE, Mallavia LP. Differentiation of *Coxiella burnettii* isolates by analysis of restriction-endonuclease-digested DNA separated by SDS-PAGE. *J. Gen. Microbiol.* 1991;**137**:269-276
77. Hornibrook JW, Nelson KR. An institutional outbreak of pneumonitis. Epidemiologic and clinical studies. *Public Health Rep.* 1940;**55**:1936-1954
78. Hillary IB, Meenan PN. Q fever in Republic of Ireland. *Ir. J. Med. Sci.* 1976;**145**:10-17
79. Hornibrook JW, Nelson KR. Institutional outbreak of pneumonitis. I. Epidemiologic and clinical studies. *Public Health Rep.* 1940;**55**:1936-1944
80. Htwe KK, Yoshida T, Hayashi S, et al. Prevalence of antibodies to *Coxiella burnettii* in Japan. *J. Clin. Microbiol.* 1993;**31(3)**:722-723
81. Huebner RJ, Bell JA. Q fever studies in Southern California. Summary of current results and a discussion of possible control measures. *J. Am. Med. Assoc.* 1951;**145**:301-305
82. Impraim CC, Saiki RK, Erlich HA, Teplitz RL. Analysis of DNA extracted from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues by enzymatic amplification and hybridization with sequence-specific oligonucleotides. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1987;**142**:710-716
83. Jerrells TR. Mechanisms of immunity to rickettsia species and *Coxiella burnettii*, pp. 79-100 *In* Walker DH (ed.), *Biology of rickettsial diseases*, vol. II. CRC Press, Boca Raton, Florida. 1988
84. Jerrells TR, Li H, Walker DH. In vivo and in vitro role of gamma interferon in immune clearance of *Rickettsia* species. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1988;**239**:193-200
85. Jonson JE, Kardull PJ. Laboratory acquired Q fever. A report of fifth cases. *Am. J. Med.* 1966;**41**:391-403
86. Kanfer E, Farrag N, Price C, MacDonald D, Coleman J, Barrett AJ. A Q fever following bone marrow transplantation. *Bone. Marrow. Transplant.* 1988;**3**:165-166
87. Kaplan MM, Bertagna P. The geographical incidence of Q fever. *Bulletin of the WHO.* 1955;**13**:829-860

88. Kazar J. Immunity in Q fever. Czechoslovakia. Acta. Virol. (Praha). 1988;**32**:358-368
89. Kelly DJ, Marana DP, Stover CK, Oaks EV, Carl M. Detection of Rickettsia tsutsugamushi by gene amplification using polymerase chain reaction techniques. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1990;**590**:564-571
90. Khavkin T, Tabibzadeh SS. Histologic, immunofluorescence, and electron microscopic study of infectious process in mouse lung after intranasal challenge with Coxiella burnetii. Infect. Immun. 1988;**56**:1792-1799
91. Koster FT, Williams JC, Goodwin JS. Cellular immunity in Q fever: modulation of responsiveness by a suppressor T cell-monocyte circuit. J. Immunol. 1985;**135**:1067-1072
92. Koster FT, Williams JC, Goodwin JS. Cellular immunity in Q fever: specific lymphocyte unresponsiveness in Q fever endocarditis. J. Infect. Dis. 1985;**152**:1283-1289
93. Krauss H, Schmeer N, Schiefer HG. Epidemiology and significance of Q fever in the Federal Republic of Germany. Zentralbl. Bacteriol. Microbiol. Hyg. [a], 1987;**267**:42-50
94. Kruszewska D, Wirzbanowska-Tylewska S. Influence of Coxiella burnetii infection of male mice on their offspring. Acta Virol (Praha) 1991;**35**:79-82
95. Kruszewska D, Lembowicz K, Tylewska-Wierzbanowska S. Possible sexual transmission of Q fever among humans. Clin. Infect. Dis. 1996;**22(6)**:1087-1088
96. Langley JM, Marrie TJ, Covert A, et al. Poker player's pneumonia. An urban outbreak of Q fever following exposure to a parturient cat. N. Engl. J. Med. 1988;**319**:354-356
97. Loudon MM, Thompson EN. Severe combined immunodeficiency syndrome, tissue transplant, leukaemia, and Q fever. Arch. Dis. Child. 1988;**63**:207-209
98. Luoto L, Pickens EG. A resume of recent research seeking to define the Q fever problem. Am. J. Hyg. 1961;**74**:43-57

99. Mallavia LP, Samuel JE, Fraquier ME. 1985 pp. 137-145 *In* Kazar J (ed.). Rickettsia and Rickettsial Diseases-Proceedings of the Third International Symposium, Slovak Academy of Sciences ed., Bratislava
100. Mallavia LP, Whiting LL, Minnick MF, Heinzen R, Reschke D, Foreman M, Baca G, Frazier ME. Strategy for detection and differentiation of *Coxiella burnettii* strains using the polymerase chain reaction. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1990;**590**:572-581
101. Marasca R. Fièvre Q: specificite de souche dans la reponse serologique etudiee en western-blot. *Medecine thesis, Marseille (Thesis).* Marseille, 1990
102. Merechi N, Becker F, Baca OG, Paretsky D. Changes in liver and L-cell plasma membranes during infection with *Coxiella burnettii*. *Infect. Immun.* 1978;**19**:272-280
103. Marmion RA, Stoker MQP. Q fever in Britain: epidemiology of an outbreak. *The Lancet.* 1959;**2**:611-616
104. Marmion BP, Stoker MGP, Walker CBV. Q fever in Great Britain: epidemiological information from a serological survey of health adults in Kent and East Anglia. *J. Hyg.* 1956;**54**:118-140
105. McCaul TF, Williams JC. Development cycle of *Coxiella burnettii*: Structure and morphogenesis of vegetative and sporogenic differentiations. *J Bacteriol.* 1981;**147**:1063-1076
106. Marrie TJ, Van Buren J, Fraser J, et al. Seroepidemiology of Q fever among domestic animals in Nova Scotia. *Am. J. Public Health.* 1985;**75**(7):763-766
107. Marrie TJ, Haldane EV, Noble MA, et al. Causes of atypical pneumonia: results of 1 year prospective study. *Can. Med. Assoc. J.* 1981;**125**:1118-1123
108. Marrie TJ. Epidemiology of Q fever. In: Marrie TJ. ed. *Q fever Vol. I.* Boca Raton Florida CRC Press. 1990;49-70
109. Marrie TJ, Van Buren J, Faulkner RS, et al. Seroepidemiology of Q fever in Nova Scotia and Prince Edward Island. *Can. J. Microbiol.* 1984;**30**:129-134

110. Marrie TJ. Q fever, 1989-1987-Nova Scotia. *Can. Dis. Wkly Rep.* 1988;**14**:69-70
111. Marrie TJ, Durant H, Williams JC, et al. Exposure to parturient cats: a risk factor for acquisition of Q fever in Maritime. *Canada Infect. Dis.* 1988;**158**:101-108
112. McDade JE. *Rickettsiae* In Balows A, Hausler WJJ, Herrmann KL, Isenberg HD, Shadomie HJ (ed.). *Manual of clinical Microbiology*, 5th ed. American Society for Microbiology, Washington, DC. 1991
113. Minnick MF, Heinzen RA, Douthart R, Mallavia LP, Frazier ME. Analysis of QpRS-specific sequences from *Coxiella burnettii*. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1990;**590**:514-522
114. Minnick MF, Heinzen RA, Frazier ME, Mallavia LP. Characterization and expression of the *cbbE'* gene of *Coxiella burnettii*. *J. Gen. Microbiol.* 1990;**136**:1099-1107
115. Minnick MF, Small CL, Frazier ME, Mallavia LP. Analysis of the *cbbE'* plasmid gene from acute disease causing isolates of *Coxiella burnettii*. *Gene.* 1991;**103**:113-118
116. Montejo Baranda M, Corral carranceja J, Aguirre Errasti C. Q fever in the Basque Country: 1981-1984. *Rev. Infect. Dis.* 1985;**7**:700-701
117. Morita C, Katsuyama J, Yanase T, et al. Seroepidemiological survey of *Coxiella burnettii* in domestic cats in Japan. *Microbiol. Immunol.* 1994;**38(12)**:1001-1003
118. O'Rourke AT, Peacock M, Samuel JE, Frazier ME, Natvig DO, Mallavia LP, Baca O. Genomic analysis of phase I and II *Coxiella burnettii* with restriction endonucleases. *J. Gen. Microbiol.* 1985;**131**:1543-1546
119. Oliphant JW, Gordon DA, Meis A, et al. Q fever in laundry workers presumably transmitted from contaminated clothing.
120. Palmer SR, Young SE. Q fever endocarditis in England and Wales, 1975-1981. *The Lancet.* 1982;**2**:1448-1449
121. Peacock MG, Ormsbee RA, Johnson KM. *Rickettsioses of Central America.* *An. J. Trop. Med. Hyg.* 1971;**20**:941-949

122. Pebody RG, Wall PG, Ryan MJ, et al. Epidemiological features of *Coxiella burnettii* infection in England and Wales: 1984-1994
123. Pinsky RL, Fishbein DB, Greene CR, et al. An outbreak of cat-associated Q fever in the United States. *J. Infect. Dis.* 1991;**164**(1):202-204
124. Powell O. «Q» fever: clinical features in 72 cases. *Aust. Ann. Med.* 1960;**9**:214-223
125. Philip CB. Comments on the name of the Q fever organism. *Public Health Rep.* 1948;**63**:58-59
126. Q fever. In: Christie AB. *Infectious Diseases, Epidemiology and Clinical Practice.* Churchill Livingstone: Edinburgh; 1974;876-891
127. Raoult D. Host Factors in the Severity of Q fever. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1990;**590**:33-38
128. Raoult D, Levy PY, Harle JR, Etienne J, Massip P, Goldstein F, Micoud M, Beytout J, Gallais H, Remy G, Capron JP. Chronic Q fever: Diagnosis and follow up. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1990;**590**:51-60
129. Raoult D, Vestris G, Enea M. Isolation of 16 strains of *Coxiella burnettii* from patients by using a sensitive centrifugation cell culture system and establishment of strains in HEL cells. *Nature* 1990;**28**:2482-2484
130. Raoult D, Toga B, Chaudet H, et al. Rickettsial antibody in southern France: antibodies to *Rickettsia conorii* and *Coxiella burnettii* among urban, suburban and semi-rural blood donors. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1987;**81**:80-81
131. Regnery R. Use of DNA probes for differentiation of spotted fever group and other rickettsiae. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1990;**590**:422-429
132. Regnery RL, Fu ZY, Spruill CL. Flying squirrel-associated *Rickettsia prowazekii* (epidemic typhus rickettsiae) characterized by a specific DNA fragment produced by restriction endonuclease digestion. *Nature.* 1986;**23**:189-191
133. Regnery RL, Spruill CL. 1984. Extend of genetic heterogeneity among human isolates of *Rickettsia prowazekii* as determined by restriction endonuclease analysis of rickettsial DNA, pp. 297-300 *In* Schlessinger D, Levine L (ed.). *Microbiology - 1984*, American Society for Microbiology, Washington, DC

134. Regnery RL, Spruill CL, Wood DO. 1985. Analysis of rickettsial DNA by hybridization with cloned rickettsial DNA probes, pp. 62-71 *In* Kazar J (ed.). Rickettsiae and Rickettsial Diseases: Proceedings of the Third International Symposium, Publishing House of the Slovak Academy of Sciences, Bratislava.
135. Regnery RL, Tzianabos T, Esposito JJ, McDade JE. Strain Differentiation of Epidemic Typhus Rickettsiae (*Rickettsia prowazekii*) by DNA Restriction Endonuclease Analysis. *Current Microbiology* 1983;**8**:355-358
136. Rehacek J, Kocianova E, Konacova E. Contamination in areas of Slovakia with strains of *Coxiella burnettii* imported from abroad. *Vet. Med. (Praha)* 1996;**41**(6)
137. Reilly S, Northwood JL, Caul EO. Q fever in Plymouth, 1972-88. A view with particular reference to neurological manifestations. *Epidemiol. Infect.* 1190;**105**:391-408
138. Robert C, et al. Role for Antibody in *Coxiella burnettii* Infection. *Infection and Immunity*. 1981;**31**:2::641-645
139. Roman MJ, Coriz PD, Baca OG. A proposed model to explain persistent infection of host cells with *Coxiella burnettii*. *J. Gen. Microbiol.* 1986;**132**:1415-1422
140. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*. 1985;**230**:1350-1354
141. Salmon MM, Howells B, Glencross EJG, et al. Q fever in an urban area. *The Lancet*. 1982;**1**:1002-1004
142. Samuel JE, Frazier ME, Kahn ML, Thomashow LS, Mallavia LP. Isolation and characterization of a plasmid from phase I *Coxiella burnettii*. *Infect. Immun.* 1983;**41**:488-493
143. Samuel JE, Frazier ME, Mallavia LP. Correlation of plasmid type and disease caused by *Coxiella burnettii*. *Infect. Immun.* 1985;**49**:775-779
144. Sanger F, Brownlee GG, Barrell BG. A two-dimensional fractionation procedure for radioactive nucleotides. *J. Mol. Biol.* 1965;**13**:373-398
145. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain -terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1977;**74**:5463-5467

146. Sanzo JM, Garcia-Calabuig MA, Audicana A, et al. Q fever: prevalence of antibodies to *Coxiella burnettii* in the Basque country. *Int. J. Epidemiol.* (England) 1993;**22(6)**:1183-1188
147. Savinelli EA, Mallavia LP. Comparison of *Coxiella burnettii* plasmids to homologous chromosomal sequences present in a plasmidless endocarditis-causing isolate. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1990;**590**:523-533
148. Sawyer LA, Fishbein DB, McDade JE. Q fever: Current Concepts. *Rev. Infect. Dis.* 1987;**9**:935-946
149. Saz JV, Bacellar F, Merino FJ, et al. Seroprevalence of *Coxiella burnettii* and *Rickettsia conorii* infection in the province of Sofia. *Enferm. Infect. Microbiol. Clin.* 1993;**11(9)**:469-473
150. Schramek S, Mayer H. Different sugar compositions lipopolysaccharides isolated from phase I and pure phase II cells of *Coxiella burnettii*. *Infect. Immun.* 1982;**38**:53-57
151. Selvaggi MT, Rezza V, Scagnelli M, et al. Investigation of a Q fever outbreak in Northern Italy. *Eur. J. Epidemiol.* 1996;**12(4)**:403-408
152. Scott GH, Williams JC. Susceptibility of *Coxiella burnettii* to chemical disinfectants. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1990;**590**:291-296
153. Shibata DK, Arnheim N, Martin WJ. Detection of human papilloma virus in paraffin-embedded tissue using the polymerase chain reaction. *J. Exp. Med.* 1988;**167**:225-230
154. Shibata DK, Martin WJ, Arnheim N. Analysis of forty-year-old paraffin-embedded thin-tissue sections: a bridge between molecular biology and classical histology. *Cancer. Res.* 1988;**48**:4564-4566
155. Schulze K, Schwalen A, Klein RM, et al. A Q fever pneumonia epidemic in Dusseldorf. *Pneumonologie* 1996;**50(7)**:469-473
156. Sidwell RW, Thorpe BD, Gebhardt LP. Studies of latent Q fever infections. I. Effects of whole body X irradiation upon latently infected guinea pigs, white mice and deer mice. *Am. J. Hyg.* 1964;**79**:113-114
157. Sidwell RW, Thorpe BD, Gebhardt LP. Studies of latent Q fever infections. II Effects of multiple cortisone injections. *Am. J. Hyg.* 1964;**79**:320-327

158. Smith DJW, Brown HE, Derrick EH. Further series of laboratory infections with the rickettsia of Q fever. *Med. J. Austral.* 1939;**1**:13-20
159. Spelman DW. Q fever: a study of 111 consecutive cases. *Med. J. Aust.* 1982;**1**:547-553
160. Stein A, Raoult D. 1990. Phenotypic and genotypic heterogeneity of 8 new human *Coxiella burnettii* isolates, pp. 197-203 *In* Kazar J, Raoult D (ed.). *Rickettsiae and Rickettsial Diseases. Third International Symposium of Rickettsiae and Rickettsial Diseases*, Slovak Academy of Sciences, Bratislava 10-14 September.
161. Siegeman-Igra Y, Kaufman O, Keysary A, et al. Q fever endocarditis in Israel and a worldwide review. *Scand. J. Infect. Dis.* 1997;**29**(1):41-49
162. Stanford CF, Connolly JH, Ellis WA, et al. Zoonotic infections in Northern Ireland farmers. *Epidemiol. Infect.*, 1990;**105**:565-70
163. Stein A, Raoult D. Detection of *Coxiella burnettii* by DNA amplification using Polymerase Chain Reaction. *Nature* 1992;**30**:2462-2466
164. Stein A, Raoult D. Phenotypic and genotypic heterogeneity of 8 new human *Coxiella burnettii* isolates. *Acta. Virol. (Praha)* 1992;**36**:7-12
165. Stein A, Raoult D. A simple method for amplification of DNA from paraffin-embedded tissues. *Nucl. Acid. Res.* 1992;**20**:5237-5238
166. Stein A, Raoult D. 1993. Lack of pathotype specific gene in human *Coxiella burnettii*. *Microbial Pathogenesis*, in press
167. Stein A, Saunders NA, Taylor AG, Raoult D. 1993. Phylogenetic homogeneity of *Coxiella burnettii* strains as determined by 16S ribosomal RNA sequencing. *FEMS Microbiology Letters*, in press.
168. Stocker MG, Fiset P. Phase variation of the nine mile and other strains of *Coxiella burnettii*. *Can. J. Microbiol.* 1956;**2**:310-321
169. Stoenner HG, Lackman DB. The biologic properties of *Coxiella burnettii* isolated from rodents collected in Utah. *An. J. Hyg.* 1960;**71**:45-51
170. Somma-Moreira RE, Caffarena RM, Somma S, et al. Analysis of Q fever in Uruguay. *Rev. Infect. Dis.* 1987;**9**:386-387

171. Suarez-Estrada J, Rodrigues-Babrosa JI, Gutierrez-Martvn CB, et al. Seroepidemiological survey of Q fever in Leon province, Spain. *Eur. J. Epidemiol.* 1996;**12(3)**:245-250
172. Tatlock H. A rickettsia-like organism recovered from guinea pigs. *Proc. Soc. Expt. Biol. Med.* 1944;**57**:95-99
173. Thiele D, Willems H. Is plasmid based differentiation of *Coxiella burnettii* in «acute» and «chronic» isolates still valid? *Eur. J. Epidemiol.* 1994;**10(4)**:427-434
174. Tigertt WD, Benenson AS. Studies on Q fever in man. *Trans. Assic. Am. Phys.* 1956;**69**:98-105
175. Tigertt WD, et al. Airborne Q fever. *Bacteriol. Rev.* 1961;**25**:285-293
176. Tellez A, Sainz C, Echevarrua C, et al. Q fever in Spain: acute and chronic cases, 1981-1985. *Rev. Infect. Dis.* 1988;**10**:198-202
177. Tellez A, Martin A, Anda P, et al. Study of *Coxiella burnettii* human and animal seroprevalence in a rural population in Madrid community. *Eur. J. Epidemiol.* 1989;**5**:444-446
178. Thibon M, Villiers V, Souque P, et al. High incidence of *Coxiella burnettii* markers in a rural population in France. *Eur. J. Epidemiol.* 1996;**12(5)**:509-513
179. Tissot Dupont H. Aspects épidémiologiques de la Fièvre Q dans le Sud de la France (1982-1990) [Thesis]. Marseille, 1991
180. Tissot Dupont H, Raoult D, Brouqui P, Janbon F, et al. Epidemiologic features and clinical presentation of acute Q fever in hospitalized patients: 323 French cases. *Am. J. Med.* 1992;**93**:427-434
181. Tselentis Y, Gikas A, Kofteçidisi D, et al. Q fever in the Greek Island of Crete. Epidemiology, Clinical and Therapeutic Data from 98 cases. *Clinical Infectious Diseases.* 1995;**20**:1311-1316
182. Tringali G, Mansueto S. Epidemiology of Q fever in Italy and other Mediterranean countries. *Zentrabl. Bacteriol. Microbiol. Hyg. [a]* 1987;**267**:20-25
183. Turck WPG, et al. Chronic W fever. *J. Med.* 1976;**45**:193-217
184. Turko J, Thompson HA, Winkler HH. Interferon-gamma inhibits growth of *Coxiella burnettii* in mouse fibroblasts. *Infect. Immun.* 1984;**45**:781-783

185. Tzianabos T, Anderson BE, McDade JE. Detection of *Rickettsia rickettsii* DNA in clinical specimens by enzymatic amplification using polymerase chain reaction technology. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1990;**590**:553-556
186. Van Niel CB. 1946. The classification and natural relationships of bacteria, pp. 285-301 pp. *In* Heredity and variation in microorganisms, vol. XI. Cold Spring Harbor, New York, USA
187. Vellend H, Salit IE, Spence L, et al. Q fever-Ontario. *Can. Dis. Wkly Rep.* 1982;**8**:171
188. Vodkin MH, Williams JC. A heat shock operon in *Coxiella burnettii* produces a major antigen homologous to a protein in both *Mycobacteria* and *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 1988;**170**:1227-1234
189. Walker DH. 1988. Pathology of Q fever, pp. 17-28 *In* Walker DH (ed.). *Biology of rickettsial diseases*, vol. II CRC Press, Boca Raton, Florida
190. Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R. Chelex R 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Bio-Techniques* 1991;**10**:506-534
191. Webb L, Carl M, Malloy DC, Dasch GA, Azad AF. Detection of murine typhus infection in fleas by using the polymerase chain reaction. *Nature* 1990;**28**:530-534
192. Weisburg WG, Dobson ME, Samuel JE, Dasch GA, Mallavia LP, Baca O, Mandelco I, Sechrest JE, Weiss E, Woese CR. Phylogenetic diversity of the Rickettsiae. *J. Bacteriol.* 1989;**171**:4202-4206
193. Weiss E, Dasch GA. 1981. The family rickettsiaceae: pathogens of domestic animals and invertebrates; nonpathogenic arthropod symbiotes, pp. 2161-2171 *In* Starr MP, Stolp H, Trüper HG, Balows A, Schlegel HG (ed.), *the prokaryotes. A handbook in habitats, isolation, and identification of Bacteria*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New York.
194. Weiss E, Moulder JW. 1984. Order I Rickettsiales, Gieszczkiewicz 1939, pp. 687-701 *In* Kreig NR, Holt JG (ed.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Vol. 1. The Williams and Willkins, Baltimore

195. Welsh HH, Lennette EH, Abinanti FR, Winn JF. Air-borne transmission of Q fever: the role of parturition in the generation of infective aerosols. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1957;**70**:528-535
196. Wilson HG, et al. Q fever endocarditis in Queensland. 1976;**53**:680-684
197. Woese CR. Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* 1987;**51**:222-270
198. Woese CR, Maniloff J, Zablen LB. Phylogenetic analysis of the mycoplasmas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1980;**77**:494-498
199. Woese CR, Stackebrandt E, Macke TJ, Fox GE. A pathogenetic definition of the major aubacterial taxa. *Sustem. Appl. Microbiol.* 1985;**6**:143-151
200. Woese CR, Stackebrandt E, Weisburg WG, Paster BJ, Nealson KH, Fox GE. The phylogeny of purple bacteria: the alpha subdivision. *System. Appl. Microbiol.* 1984;**5**:315-326
201. Woese CR, Weisberg WG, Hahn CM, Paster BJ, Zablen LB, Lewis BJ, Macke TJ, Ludwig W, Stackebrandt E. The phylogeny of purple bacteria: the gamma subdivision. *System. Appl. Microbiol.* 1985;**6**:25-33
202. Woese CR, Weisburg WG, Paster BJ, Hahn CM, Tanner RS, Krieg NR, Koops HP, Harms H, Stackebrandt E. The phylogeny of purple bacteria: the beta subdivision. *System. Appl. Microbiol.* 1984;**5**:327-336
203. Worswick D, Marmion BP. Antibody Responses in Acute and Chronic Q fever and in Subjects Vaccinated against Q fever. *J. Med. Microbiology.* 1985;**19**:281-296
204. Zuckerman E, Pauling L. Molecules as documents of evolutionary history. *J. Theoret. Biol.* 1965;**8**:357-366
205. Spicer AJ, Crowther RW, Vella EE, et al. Q Fever and animal abortion in Cyprus. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1977;**71**:16-20
206. Babalis T, Tselentis Y, Roux V, Psaroulaki A, Raoult D, Am. *Trop. Med. Hug.* 1994;**50**:365-372
207. Chaniotis B, Psaroulaki A, Chaliotis G, Gojalo Garcia G, Cozantinos T, Tselentis Y. *An. Trop. Med. And Par.* 1995;**89**:1-3
208. Polydorou K. Q Fever in Cyprus: a short review. *Br. Vet. J.* 1981;**137**: 470-77

209. Ch.Hadjichristodoulou, E.Soteriadis, G.Goutziana, M.Loukaidou, Th. Babalis, M.Antoniou, J.Delagrammaticas, Y.Tselentis. Surveillance of brucellosis in a rural area of Greece: Application of the Computerized Mapping Programme. Eur. J. Epidemiol. 1999;**15**:277-83
210. Ch.Hadjichristodoulou, Ch.Hadjitheodorou, E.Soteriades, G.Panagakos, I.Kastritis, G.Goutziana, E.Charvalos, Y.Tselentis. Epidemiological study of brucellosis in eight Greece villages using a Computerized Mapping Programme. Eur. J. Epidemiol. 1999;**15**:671-680