

**ΑΛΕΞΑΝΔΡΕΙΟ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ
ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΖΩΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ**



ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΜΕ ΘΕΜΑ

“ΠΑΡΑΦΥΜΑΤΙΩΣΗ”



ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ : κα ΜΑΖΑΡΑΚΗ ΚΥΡΙΑΚΗ

ΣΠΟΥΔΑΣΤΡΙΑ : ΣΠΥΡΑΚΗ ΑΘΑΝΑΣΙΑ

ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ, 2010

*Αφιερώνεται στην αδελφή μου
Ελένη.*

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

ΠΡΩΤΟ ΜΕΡΟΣ

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ

	Σελίδες
1. Ιστορικό	10
2. Ταξινόμηση	10
3. Μορφολογία	13
4. Καλλιεργητικές Ιδιότητες	14
5. Βιοχημικές Ιδιότητες	16
6. Ανθεκτικότητα έναντι φυσικών και χημικών παραγόντων	18
7. Γενετική Ανάλυση	18

ΠΑΡΑΦΥΜΑΤΙΩΣΗ

1. Ορισμός	21
2. Παθογένεια	21
3. Συμπτώματα	23
4. Παθολογικές Αλλοιώσεις	24
5. Ανοσία	25
6. Επιζωοτιολογία	28
6α. Γεωγραφική Εξάπλωση	28
6β. Παραφυματίωση στην Ελλάδα	29
7. Είδος Ξενιστού	31

8. Διάγνωση	31
8.1. Μέθοδοι Εργαστηριακής Διάγνωσης	32
8.2. Έμμεσοι Μέθοδοι	36
9. Θεραπεία	37
10. Έλεγχος και Πρόληψη του Νοσήματος	38
11. Εμβολιασμοί	39
12. Σχόλια στους Εμβολιασμούς	41
13. Σχέση με τη Δημόσια Υγεία	42
14. Οικονομικές Επιπτώσεις από τη Νόσο	44

ΔΕΥΤΕΡΟ ΜΕΡΟΣ

Η ΕΡΕΥΝΑ ΜΑΣ

1. Εισαγωγή	45
2. Βασικός Σχεδιασμός Έρευνας	46
3. Υλικά και Μέθοδοι	47
3α. Υλικά	47
3β. Μέθοδοι	51
4. Ιστορικό και Δειγματοληψίες από Εκτροφές Αιγών και Προβάτων με Παραφυματίωση	55
5. Απομόνωση	67
6. Αποτελέσματα	68
7. Χρόνος Επώασης Στελεχών Μαρ.	73
8. Μορφολογία Αποικιών	73
9. Συζήτηση	76
10. Συμπεράσματα	78

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΦΩΤΟΓΡΑΦΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η παραφυματίωση είναι μια χρόνια λοιμώδης νόσος και συγκεκριμένα εντερίτιδα, που χαρακτηρίζεται από διαλλείπουσα διάρροια και προοδευτική απίσχναση. Προσβάλλει κυρίως τα μηρυκαστικά (βοοειδή, αιγοπρόβατα) αλλά έχει εμφανιστεί και στα ελάφια και περιστασιακά σε άλλα είδη, τόσο άγρια όσο και υπό αιχμαλωσία όπως σε καμήλες και βούβαλους (βλ. *Chiodini, 1984*). Ο παθογόνος παράγοντας είναι γνωστός ως βάκιλλος *Johnes's* ή *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (Map) ο οποίος εντοπίζεται και δρα στον εντερικό βλεννογόνο.

Η ασθένεια περιγράφηκε πρώτη φορά από τους Johnes και Frothingham το 1895 στην Δρέσδη, την οποία την θεώρησαν ως κάποια περίεργη μορφή φυματίωσης, πιθανόν εξαιτίας του αερόβιου τύπου του βακίλλου και το *M. paratuberculosis* επιβεβαιώθηκε ως αιτιολογικός παράγοντας το 1910.

Η ασθένεια του *Johnes's* εμφανίζεται σε πολλά μέρη του κόσμου, κυρίως σε ήπια κλίματα αλλά ενίοτε και σε τροπικά. Προσβάλλει ιδιαίτερα νεαρά ζώα, αλλά καμία ηλικία δεν αποτελεί εξαίρεση. Εφόσον όμως η περίοδος επώασης είναι επιμήκης -σχεδόν μέχρι 18 μήνες- είναι ασυνήθιστη σε ζώα μικρότερα των 2 ετών.

Στην Ελλάδα η παραφυματίωση είναι γνωστή από το 1968, είναι ένα από τα σπουδαιότερα χρόνια νοσήματα των μικρών μηρυκαστικών στη χώρα μας, που προκαλεί σημαντικές οικονομικές απώλειες, διότι: α) μειώνεται σημαντικά το σωματικό βάρος του προσβεβλημένου ζώου, με αποτέλεσμα τη σημαντική μείωση της αξίας του παραγόμενου σφάγιου και β) μειώνεται η παραγωγικότητα των κλινικά νοσούντων ζώων τόσο ως προς τη γαλακτοπαραγωγή, όσο και ως προς την ικανότητα πάχυνσης των νεογνών.

Εκτός από τις οικονομικές απώλειες λόγω θανάτων, τα μολυσμένα ζώα παρουσιάζουν μειωμένη γονιμότητα και αυξημένη ευαισθησία σε άλλες μολύνσεις.

Η ασθένεια τα τελευταία χρόνια έχει βρεθεί σε ολόκληρη τη χώρα με αποτέλεσμα να έχει προσβληθεί μεγάλο ποσοστό του αίγειου και πρόβειου πληθυσμού. Τα ποσοστά αυτά εμφανίζουν αυξητικές τάσεις, γεγονός που επιδρά αρνητικά στους κτηνοτρόφους για τη συνέχιση και αύξηση των δραστηριοτήτων τους.

Ακριβείς εκτιμήσεις οικονομικών απωλειών από παραφυματίωση δεν έχουν γίνει. (*ΕΘ.Ι.ΑΓ.Ε. 2002*).

Η παραφυματίωση είναι μια ασθένεια που δεν επιδέχεται θεραπεία και η αντιμετώπισή της είναι δυνατή μόνο με υγειονομικά μέτρα και με μέτρα προληπτικής κτηνιατρικής. Για τον έλεγχο και την πρόληψη του νοσήματος θα πρέπει να ανακοπεί η εξάπλωση της νόσου, να προστατευτούν οι υγιείς εκτροφές και να εξυγιανθούν οι ήδη μολυσμένες.

Ο εμβολιασμός θεωρείται απαραίτητος για την εξυγίανση των μολυσμένων εκτροφών και την προστασία των υγείων.

Σκοπός της έρευνας ήταν η καλλιέργεια και μελέτη των στελεχών *M. paratuberculosis* που απομονώθηκαν από αιγοπρόβατα.

Στο πρώτο μέρος της εργασίας γίνεται βιβλιογραφική ανασκόπηση σχετικά με την ταξινόμηση, μορφολογία και χαρακτηριστικά του Map. Περιγράφεται η παραφυματίωση και οι διαγνωστικές μέθοδοι της νόσου. Τέλος, γίνεται αναφορά στη πρόληψη και τον έλεγχο της νόσου καθώς και στη σχέση με τη δημόσια υγεία.

Στο δεύτερο μέρος περιγράφονται τα υλικά και οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια της έρευνας και καταγράφονται και σχολιάζονται τα αποτελέσματα : 1.της απομόνωσης στελεχών Mar σε τρία θρεπτικά υποστρώματα, 2.της σύγκρισης των τριών υποστρωμάτων όσον αφορά τον αριθμό των στελεχών Mar που απομονώθηκαν στο καθένα καθώς και το χρόνο απομόνωσης στο κάθε υπόστρωμα και 3.τέλος της μορφολογίας και του αριθμού των αποικιών.

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

Map : Mycobacterium avium subsp. Paratuberculosis

ΕΘ.Ι.ΑΓ.Ε : Εθνικό Ίδρυμα Αγροτικής Έρευνας

C.F.T. : Complement Fixation (Σύνδεση συμπληρώματος)

AGIT : Ανοσοδιάχυση σε άγαρ

ELISA : Ανοσοενζυμική μέθοδος

RMP : Tifampin

CFA : Clofazimine

SM : Streptomycin

PZA : Purazinamide

OADC : Oleid Acid, Bovine Albumin Fract V, Dextrose and Beef Catalase

Z.N. : Ziehl-Neelsen

Herrold's : Herrold's egg yolk medium

HPC : Hexadecylpyridium Chloride

L.J. : Lowenstein-Jensen

M7H11 : Middlebrook 7H11

PCR : Polymerase chain reaction (Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης)

NaCl : Χλωριούχο Νάτριο

NaOH : Καυστικό Νάτριο

Κ.Πρ. (χ.Δ.) : Κόπρανα Προβάτου (χωρίς Διάρροια)

Κ.Πρ. (με Δ.) : Κόπρανα Προβάτου (με Διάρροια)

Κ.Αγ. (ελ.Δ.) : Κόπρανα Αίγας (ελαφρώς Διαρροϊκά)

Κ.Αγ. (χ.Δ.) : Κόπρανα Αίγας (χωρίς Διάρροια)

Κ.Εδ. : Κόπρανα Έδαφος

Λεπ.Εντ.Αιγ. : Λεπτό Έντερο Αίγας

Εντ.Αιγ. (δίπλα Ελ. Βαλβ.) : Έντερο Αίγας (δίπλα στην Ειλεοτυφλική Βαλβίδα)

Μεσ. Λεμφ.Αιγ. : Μεσεντέριο Λεμφογάγγλιο Αίγας

Κ.Αιγ. : Κόπρανα Αίγας

Κ.Κρ. (χ.Δ.) : Κόπρανα Κριού (χωρίς Διάρροια)

Κ.Κρ. (με Δ.) : Κόπρανα Κριού (με Διάρροια)

Εντ.Αιγ. : Έντερο Αίγας

Κ.Αιγ. (με Δ.) : Κόπρανα Αίγας (με Διάρροια)

Μ.Λ. : Μεσεντέριο Λεμφογάγγλιο

spp : species

ΠΡΩΤΟ ΜΕΡΟΣ

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ

1. ΙΣΤΟΡΙΚΟ

Το 1826, ο Aroval ανέφερε μια μορφή εντερίτιδας που παρατηρήθηκε σε βοοειδή με χρόνια διάρροια. Οι Hansen και Nielsen το 1881 παρατήρησαν σε βοοειδή που πέθαναν από εντερίτιδα, πάχυνση και πτύχωση του βλεννογόνου του εντέρου.

Το 1895, οι Johne και Frothingham παρατήρησαν οξεάντοχους βακίλλους σε τμήμα εντέρου και περιέγραψαν τη νόσο. Λόγω της παρουσίας των οξεάντοχων βακίλλων θεώρησαν ότι η νόσος είναι ατυπική μορφή φυματίωσης.

Το 1906, ο Bang ανέφερε ότι δεν ήταν φυματίωση και την ονόμασε ψευδοφυματιώδη εντερίτιδα ή νόσο του Johne.

Ο Bang ενοφθάλμισε το μυκοβακτήριο στα πειραματόζωα, το διαφοροποίησε από εκείνα της φυματίωσης ανθρώπειου, βόειου και ορνίθιου τύπου και το ονόμασε *Mycobacterium paratuberculosis*. Ο ίδιος ερευνητής το 1910, παρασκεύασε φυματίνη από μυκοβακτήριο ορνίθιου τύπου. Στον φυματινισμό που έγινε σε άρρωστα από παραφυματίωση βοοειδή παρατηρήθηκε μια αντίδραση ανάλογη του φυματινισμού με τη φυματίνη του Koch.

Μεταξύ των ετών 1902 και 1908, η ψευδοφυματιώδης εντερίτιδα των βοοειδών αναφέρθηκε στη Γαλλία, Ολλανδία, Γερμανία, Βέλγιο, Δανία, Ελβετία και Η.Π.Α.

Ο Twort το 1910, απομόνωσε το παθογόνο μικροοργανισμό και τον ονόμασε *Mycobacterium enteritidis chronicae pseudotuberculosis bovis* Johne.

Αργότερα η νόσος έγινε γνωστή ως παραφυματίωση ή νόσος του Johne και ο αιτιολογικός παράγοντας ως *Mycobacterium paratuberculosis*.

Το όνομα *Mycobacterium johnei* χρησιμοποιήθηκε στο παρελθόν σαν συνώνυμο του *M. paratuberculosis*, αλλά στη συνέχεια δεν χρησιμοποιείται (*Chiodini, 1984*).

2. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ

Το *M. paratuberculosis* είναι βακτήριο που ανήκει στην οικογένεια *Mycobacteriaceae* με μόνο γένος το *Mycobacterium*.

Τα μυκοβακτήρια, σύμφωνα με την έκδοση των Topley και Wilsons (1984), μπορούν να ταξινομηθούν σε 4 ομάδες, από τις οποίες, από άποψη κτηνιατρικής παθολογίας, ενδιαφέρουν η 1^η και η 4^η.

1^η ομάδα : Μυκοβακτηρίδια της φυματίωσης (The tubercle bacilli)

α) *M. tuberculosis* (ανθρώπιος τύπος)

β) *M. bovis* (βόειος τύπος)

γ) *M. avium* (ορνίθιου τύπος)

δ) *M. microti* ή *murine*

Στην ομάδα αυτή κατατάσσονται και τα μυκοβακτήρια των ψυχρόαιμων ζώων.

2^η ομάδα : Φυματιοειδή Μυκοβακτήρια (The tuberculoid bacilli)

Άτυπα ή ανώνυμα ή ομάδες του Ruynon.

Χωρίζονται σε 4 υποομάδες με κριτήρια την παραγωγή ή όχι χρωστικής, παρουσία ή απουσία φωτός, αν είναι ταχείας ανάπτυξης ή αν είναι σαπροφυτικά.

Υποομάδα I.

Φωτοχρωμογόνα (photochromogens).

Οι αποικίες έχουν κίτρινο χρώμα, όταν η καλλιέργεια γίνεται στο φως.

Το *M. cansasii* προκαλεί στον άνθρωπο φυματίωση των πνευμόνων, ελαφρότερης μορφής από το *M. tuberculosis*.

Υποομάδα II.

Σκοτοχρωμογόνα (scotochromogens).

Όταν η καλλιέργεια γίνεται στο σκοτάδι οι αποικίες έχουν κίτρινο χρώμα. Τα *M. scrofulaceum*, *M. gordonae*, *M. flavescens* και *M. szulozai* προκαλούν ψυχρά αποστήματα στον άνθρωπο.

Υποομάδα III.

Μη χρωμογόνα (Non chromogens). Δεν παράγουν χρωστική.

α) *M. xenopi* ή *M. litlorde*.

β) *M. intracellulare* ή στέλεχος Battey.

γ) *M. ulcerans*.

Προκαλούν πνευμονική φυματίωση στον άνθρωπο και ελκωτική δερματίτιδα.

Υποομάδα IV.

Ταχείας αναπτύξεως (Rapid growers). Το *M. fortuitum* προκαλεί στον άνθρωπο υποδόρια ή δερματικά αποστήματα.

3^η ομάδα : Μυκοβακτήρια σαπροφυτικά οξεάντεχα (The saprophytic acidfast bacilli).

M. phlei, *M. smegmatis*. Δεν είναι παθογόνα.

4^η ομάδα : Περιλαμβάνει τα : *M. leprae*, *M. paratuberculosis*.

Τα βραδέως αναπτυσσόμενα μυκοβακτήρια σύμφωνα με τους Goodfellow και Wayne (1982) μπορούν να ταξινομηθούν σε 8 ομάδες.

1^η ομάδα : *M. tuberculosis*

Η ομάδα *M. tuberculosis* περιλαμβάνει τα :

α) *M. tuberculosis*

β) *M. bovis*

γ) *M. africanum*

δ) *M. microti*

2^η ομάδα : *M. avium*

Η ομάδα *M. avium* αποτελείται από :

α) *M. avium*

β) *M. intracellulate*

γ) *M. xenopi*

3^η ομάδα : M. scrofulaceum

Η ομάδα M.scrofulaceum περιλαμβάνει τα :

α) M. scrofulaceum

β) M. simiae

Λόγω ορισμένων κοινών ιδιοτήτων των δύο ανωτέρω ομάδων, μερικοί ερευνητές πρότειναν μια κοινή ομάδα των M. avium - intracellulate – scrofulaceum (MAIS).

4^η ομάδα : M. gordonae

Η ομάδα M. gordonae περιλαμβάνει τα :

α) M. gordonae

β) M. szulgai

γ) M. asiaticum

5^η ομάδα : M. kansasii

Η ομάδα M. kansasii περιλαμβάνει τα :

α) M. kansasii

β) M. gastri

6^η ομάδα : M.terrae

Η ομάδα M. terrae περιλαμβάνει τα :

α) M. terrae

β) M. monchromogenicum

γ) M. triviale

7^η ομάδα : Είδη μυκοβακτηρίων που δεν έχουν ειδικές διατροφικές ανάγκες

Σε αυτή την ομάδα ανήκουν τα :

α) M. marinum

β) M. ulcerans

γ) M. malmoense

8^η ομάδα : Είδη μυκοβακτηρίων που έχουν ανάγκη ειδικών παραγόντων ανάπτυξης

Σε αυτή την ομάδα ανήκουν :

α) M. paratuberculosis

β) M. haemophilum

γ) M. lepraemurium

δ) M. leprae

Στο 3^ο Διεθνές Συμπόσιο για τη παραφυματίωση (*Φλώριδα Η.Π.Α., 1991*), προτάθηκε αλλαγή στην ταξινόμηση μετά από γενετική, αντιγονική και φαινοτυπική ανάλυση των στελεχών M. paratuberculosis, M. avium και wood-pigeon μυκοβακτηρίων (*Thorel, 1991*). Τα 3 ανωτέρω υποείδη ανήκουν στο ίδιο είδος. Λόγω της πρώτης περιγραφής του M. avium, προτάθηκε το όνομα του είδους να είναι M. avium. Τα υποείδη ταξινομούνται ως εξής :

α) M. avium subsp. avium

β) M. avium subsp. paratuberculosis

γ) Για τα wood-pigeon μυκοβακτήρια προτάθηκε το M. avium subsp. silvaticum. (*Δημαρέλη-Μαλλή, 1994*).

3. ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ

Το *M. paratuberculosis* είναι βακτήριο λεπτό, ευθύ ή με ελαφριά κάμψη, οξείαντοχο, ακίνητο, Gram+, αυστηρά αερόβιο. Δαν σχηματίζει σπόρους. Έχει διαστάσεις 0,5 x 1,5μm.



Τα μυκοβακτήρια έχουν απλή δομή κυτταρικού τοιχώματος και πλασματικής μεμβράνης.

Στις αλλοιώσεις των οργάνων παρατηρείται σε άθροισμα ή μεμονωμένα μέσα στα μακροφάγα.

Το πάχος του κυτταρικού τοιχώματος είναι 20nm. Η δομή του μυκοβακτηριακού τοιχώματος μπορεί να περιγραφεί σαν ένα πεπτιδογλυκίδιο στο οποίο είναι συνδεδεμένες αλυσίδες πολυσακχαριδικές με μυκολικά οξέα.

Τα πολυσακχαρίδια σχηματίζονται από N-acetylglucosamine και τειχοϊκό οξύ.

Τα μυκοσίδια C (πεπτιδογλυκολιπίδια) βρίσκονται στην εξωτερική στοιβάδα του κυτταρικού τοιχώματος. Οι ομάδες αυτές των σακχαριδίων είναι υπεύθυνες για ειδικές ορολογικές ιδιότητες (Thorel, 1991). Η μορφολογία των αποικιών (λείες ή ρυτιδώδεις) εξαρτάται από τα μυκοσίδια C. Η ταυτοποίηση των μυκοσιδίων έχει γίνει με τη χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας σε σύγκριση με τα μυκοσίδια στελεχών αναφοράς. Τα μυκοσίδια C προφυλάσσουν τα βακτήρια από τις προσπάθειες των κυττάρων να τα καταστρέψουν.

Τα wood-pigeon μυκοβακτήρια και το *M. paratuberculosis* συμπεριλαμβανομένων και των μυκοβακτηρίων που απομονώνονται από τη νόσο του Crohn δεν παράγουν μυκοσίδιο C in vitro (Thorel, 1991) ενώ το *M. avium* παράγει. Ο ορότυπος 2 του *M. avium* και το στέλεχος αναφοράς 18 παράγουν το ίδιο μυκοσίδιο C καθώς επίσης και ο ορότυπος 3 του *M. avium* και το στέλεχος αναφοράς 2103 (Thorel, 1991). Τα ευρήματα αυτά επιβεβαιώνουν προηγούμενες αναφορές ότι τα στελέχη 2103 και 18 ανήκουν στο *M. avium* Complex (Thorel, 1991).

Το *M. paratuberculosis* δεν παράγει in vitro μυκοσίδιο C, αλλά παράγει ένα πεπτιδολιπίδιο που μπορεί να εκτελεί την ίδια λειτουργία.

Το κυτταρόπλασμα των μυκοβακτηρίων περιέχει πολυφωσφορικά κοκκία και σταγονίδια λιπιδίων.

Τα ριβοσώματα των μυκοβακτηρίων δε διαφέρουν από τα τυπικά βακτηριακά ριβοσώματα (Δημαρέλη-Μαλλή, 1994).

4. ΚΑΛΛΙΕΡΓΗΤΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ

Το *M. paratuberculosis* είναι αυστηρά αερόβιο. Δεν καλλιεργείται στα χρησιμοποιούμενα για τα άλλα μυκοβακτήρια κλασικά υποστρώματα. Για την καλλιέργεια του απαιτείται ένας ουσιώδης παράγοντας αναγκαίος στο μεταβολισμό του μυκοβακτηρίου. Ο ειδικός αυτός παράγοντας ανάπτυξης είναι η μυκομπακτίνη (mycobactin – a hydroxamate iron chelatin), που είναι απαραίτητη για την *in vitro* ανάπτυξη του *M. paratuberculosis*. Η μυκομπακτίνη περιέχει σίδηρο, απαραίτητο για την ανάπτυξη του μυκοβακτηρίου (*Chiodini, 1984, 1988*).

Το 1910-1912 οι Twort και Jugram καλλιέργησαν το μυκοβακτήριο για πρώτη φορά στο υλικό DORSET με αυγό που περιείχε νεκρά μυκοβακτήρια ανθρώπινου τύπου και γλυκερίνη. Αργότερα οι ίδιοι πάντα ερευνητές χρησιμοποίησαν και άλλους τύπους μυκοβακτηρίων, για να υιοθετήσουν τελικά ως το πλέον κατάλληλο για εξαγωγή μυκομπακτίνης το *Mycobacterium phlei*. Το *M. phlei* είναι ένα σαπρόφυτο μυκοβακτήριο. Από το εκχύλισμά του εξάγεται η μυκομπακτίνη *p*.

Σήμερα, χρησιμοποιείται η μυκομπακτίνη *j* που εξάγεται από το *M. paratuberculosis*. Συγκρίνοντας την μυκομπακτίνη *p* και *j*, η *j* μειώνει το χρόνο επώασης του μυκοβακτηρίου κατά 2-6 εβδομάδες (*Merkal et al., 1982*).

Επίσης στελέχη που δεν αναπτύσσονται παρουσία μυκομπακτίνης *p* μπορούν να αναπτυχθούν με μυκομπακτίνη *j* (*Chiodini, 1984*).

Η μυκομπακτίνη *j* αυξάνει τον αριθμό των αποικιών κατά 10%-50% σε σύγκριση με την *p* (*Merkal et al., 1982, 1984*).

Εκτός από το *M. paratuberculosis* υπάρχουν και άλλα μυκοβακτήρια που αναπτύσσονται παρουσία μυκομπακτίνης όπως το *M. silvaticum* (wood-pigeon μυκοβακτήρια) και ορισμένα στελέχη του *Mycobacterium spp.* που απομονώνονται από περιστατικά της νόσου του Crohn (*Thorel, 1984*).

Το *M. paratuberculosis* καλλιεργείται στα εξής υποστρώματα (*Merkal et al., 1964 – Merkal & Curran, 1974 – Jorgensen, 1984*) :

1. Herrold's egg yolk
2. Lowenstein – Jensen
3. Stonebrink's
4. Middlebrook's 7H11 με middlebrook OADC εμπλουτιστικό.
5. Dubos broth με tween 80 και oleic albumin complex INH.

Πριν από την σπορά του παθολογικού υλικού στα υποστρώματα, το υλικό υφίσταται μια κάθαρση με NaOH ή με benzalkonium chloride. Τελευταία το benzalkonium chloride έχει αντικατασταθεί με το hexadecylpyridium chloride (HPC), το οποίο χρησιμοποιούμενο σε πυκνότητα 0,75% αυξάνει τις πιθανότητες απομόνωσης του *M. paratuberculosis* και μειώνει τις πιθανότητες μόλυνσης από άλλους μικροοργανισμούς (*Chiodini, 1984*).

Το *M. paratuberculosis* αναπτύσσεται πολύ αργά στους 37°C. Οι πρώτες αποικίες εμφανίζονται από την 5^η έως την 14^η εβδομάδα μετά τον ενοφθαλμισμό. Οι περισσότερες εμφανίζονται κατά τη διάρκεια της 8^{ης} εβδομάδας. Στην αρχή οι πρώτες αποικίες στο υπόστρωμα Herrold's είναι πού μικρές (1mm), άχρωμες, ημιδιαφανείς και κυκλικές. Η επιφάνεια είναι λεία και γυαλιστερή, αλλά με την πάροδο του χρόνου γίνεται θαμπή και μεγαλύτερη σε μέγεθος (4-5mm). Το ίδιο συμβαίνει και με τη σύσταση της αποικίας η οποία, ύστερα από λίγο καιρό είναι δυνατό να αλλάξει από λεία σε ρυτιδώδη. Αυτό εξαρτάται από το υπόστρωμα που καλλιεργείται. Στα υλικά καλλιέργειας π.χ. Middlebrook's 7H11 και Waston-Reid's, οι αποικίες αποκτούν ρυτιδώδη υφή (*Thorel, 1984*).

Τα μυκοβακτήρια των αποικιών του *M. paratuberculosis* από πρωτοκαλλιέργεια είναι οξεάντοχα, αερόβια, δε σχηματίζουν σπόρους, δεν παράγουν τοξίνες (Thorel, 1984).

Το sodium pyruvate ενισχύει την ανάπτυξη του *M. paratuberculosis* (Merkal, 1974). Σύμφωνα με τα βιβλιογραφικά δεδομένα, 4,1 gr/lit υποστρώματος βοηθούν στην ανάπτυξη του μυκοβακτηρίου (κατά προσέγγιση 10% περισσότερες θετικές καλλιέργειες). Με τη προσθήκη του sodium pyruvate εμφανίζονται μεγαλύτερες αποικίες 1-2 εβδομάδες νωρίτερα, αλλά ο αριθμός των αποικιών παραμένει ίδιος στο τέλος της περιόδου επώασης. Ο Jorgensen (1982) αναφέρει ότι το sodium pyruvate προστιθέμενο στο υπόστρωμα Lowenstein – Jensen αυξάνει το μέγεθος και τον αριθμό των αποικιών (90% περισσότερες). Υψηλότερες συγκεντρώσεις του sodium pyruvate δεν έχουν εκτιμηθεί.

Η γλυκερόλη και η γλυκόζη είναι απαραίτητες για την ικανοποιητική ανάπτυξη του *M. paratuberculosis*.

Το *M. paratuberculosis* δεν αναπτύσσεται σε υποστρώματα με λέκιθο αυγών και στο 7H11 υπόστρωμα με τις συνήθεις συγκεντρώσεις σιδήρου χωρίς μυκομπακτίνη. Πολλά στελέχη του *M. paratuberculosis* θα μπορούσαν να αναπτυχθούν χωρίς μυκομπακτίνη, με την προσθήκη 1% κιτρικού εναμμώνιου σιδήρου (Merkal, 1974).

Το pH των υποστρωμάτων πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 7,3-7,5. Η ανάπτυξη του μυκοβακτηρίου μειώνεται σημαντικά σε pH μεγαλύτερο του 7,5 και μικρότερο του 7,1.

Το μεγαλύτερο πρόβλημα στις καλλιέργειες του μυκοβακτηρίου είναι οι βακτηριακές και μυκητιακές επιμολύνσεις, ιδιαίτερα στις καλλιέργειες των κοπράνων. Το ποσοστό των σωλήνων που μπορεί να μολυνθεί στις καλλιέργειες κοπράνων κυμαίνεται από 10-30% και σε ορισμένες περιπτώσεις φτάνει ως και 100%. Οι συνηθέστερες μυκητιακές μολύνσεις προέρχονται από ζυγομύκητες τις δύο πρώτες εβδομάδες επώασης και από ασκομύκητες τις επόμενες.

Οι βακτηριακές επιμολύνσεις οφείλονται συνήθως στα βακτήρια *Bacillus* spp. *Alcaligenes* spp. και *Pseudomonas* spp.

Η προσθήκη αντιβιοτικών στα υποστρώματα προλαμβάνει την εμφάνιση βακτηριακών επιμολύνσεων. (Δημαρέλη-Μαλλή, 1994).

5. ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ

Οι απόψεις, όσον αφορά τις βιοχημικές ιδιότητες των στελεχών *M. paratuberculosis*, είναι σχεδόν ταυτόσημες.

Γενικά είναι παραδεκτό ότι οι βιοχημικές δοκιμές είναι περιορισμένης αξίας για την ταυτοποίηση του *M. paratuberculosis* λόγω της ποικιλίας των αντιδράσεων (*Chiodini, 1984*).

Ο *Chiodini (1985)* αναφέρει ότι η μελέτη 20 στελεχών *M. paratuberculosis* ως προς τις καλλιεργητικές και βιοχημικές ιδιότητές τους έδωσε τα εξής αποτελέσματα (πίνακας 1):

Πίνακας 1. Καλλιεργητικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά.

Μορφολογία αποικιών	Ρυτιδώδης
Παραγωγή χρώματος	Μη Χρωμογόνα
Εμφάνιση πρώτων αποικιών (εβδομάδες)	7-14
Ανάπτυξη σε Lowenstein-Jensen	-
Ανάπτυξη σε HEYM χωρίς μυκομπακτινική	-
Ανάπτυξη σε HEYM με μυκομπακτινική	+
Ανάπτυξη : 30°C	Μικρή
Ανάπτυξη : 37°C	Ιδανική
Ανάπτυξη : 42°C	-
Αντίδραση ουρίας	-
Παραγωγή νιασίνης	-
Αναγωγή νιτρικών	-
Υδρόλυση του Tween 80	-
Αναγωγή Tellurite	-
Αντίδραση αρυλσουλφατάσης	-
Παραγωγή καταλάσης 68°C	+/-

Από τα παραπάνω αποτελέσματα προκύπτει ότι το *M. paratuberculosis* δεν αντιδρά σε βιοχημικές δοκιμές. Η έλλειψη αντίδρασης πιθανόν να σχετίζεται με τη βραδεία ανάπτυξη του και το φραγμό της διαπερατότητας του κυτταρικού τοιχώματος (*Chiodini, 1986*).

Τα wood-pigeon μυκοβακτήρια (μυκοβακτήρια που έχουν στενή σχέση με το *M. paratuberculosis* και το *M. avium complex*) δεν μπορούν να διαφοροποιηθούν με τη χρήση βιοχημικών μεθόδων και πολλοί ερευνητές τα διαφοροποιούν μόνο με την παθολογική δράση στα ζώα.

Τα *M. avium*, *M. intracellulare* και *M. paratuberculosis* διαφοροποιούνται ανάλογα με το ρυθμό ανάπτυξης.

Η ορολογική μέθοδος και η χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (thin layer chromatography) χρησιμοποιούνται για την ταυτοποίηση των ειδών, αλλά αυτές οι μέθοδοι δύσκολα εφαρμόζονται στη ρουτίνα από τα περισσότερα εργαστήρια.

Τέλος κατά τον *Chiodini (1985)* βασικά κριτήρια ταυτοποίησης του *M. paratuberculosis* είναι ο ρυθμός ανάπτυξης και η εξάρτησή του από τη μυκομπακτινική.

Το 1979, ο Gunnarson μελέτησε τις βιοχημικές ιδιότητες στελεχών *M. paratuberculosis*, 4 εργαστηριακών και 50 στελεχών που απομονώθηκαν από αίγες και βρήκε τα παρακάτω αποτελέσματα (πίνακας 2):

Πίνακας 2. Βιοχημικές ιδιότητες στελεχών *M. paratuberculosis*.

Στέλεχος	Αναπαραγωγή Νιτρικών	Υδρόλυση του Tween 80	Αντίδραση Αρυλσουλφ.	Καταλάση 37°C	Καταλάση 68°C
<u>Α Εργ. Στ.</u>					
2E	-	-	-	-	-
316F	-	-	-	-	-
Teps	-	-	-	2mm	+
Str. 18	+	-	-	-	-
<u>Β Στ. αιγ.</u>					
38 στελ.	0	-	-	0	+
1 στελ.	0	-	-	0	+
1 στελ.	-	-	-	10mm	+
7 στελ.	(+)	-	-	10mm	+
1 στελ.	(+)	-	-	10mm	+
1 στελ.	(+)	-	-	10mm	-
1 στελ.	+	-	-	10mm	-

(συνέχεια πίνακα 2.)

Ο παραπάνω ερευνητής συμφώνησε με την άποψη του Chiodini ότι το *M. paratuberculosis* δεν αντιδρά σε βιοχημικές δοκιμές.

Τα ίδια συμπεράσματα προέκυψαν και από προηγούμενες έρευνες των Merkal (1966), Nemeto (1969) και Thorel (1976). Έτσι ο Gunnarson (1979) κατέληξε στο συμπέρασμα ότι οι βιοχημικές δοκιμές είναι περιορισμένης αξίας για την ταυτοποίηση και τη διαφοροποίηση του από τα άλλα μυκοβακτήρια.

Η Thorel (1984) σε βιοχημική μελέτη ταυτοποίησης στελεχών *M. paratuberculosis* βρήκε ότι τα στελέχη παράγουν θερμοευαίσθητη καταλάση, δεν ανάγουν τα νιτρικά και δεν παράγουν νιασίνη. Οι δοκιμές της αρυλσουλφατάσης και ουρεάσης είναι αρνητικές. Η δοκιμή της υδρόλυσης του Tween 80 είναι αρνητική για το *M. avium*, θετική για τα wood-pigeon μυκοβακτήρια και το *M. paratuberculosis* (Δημαρέλη-Μαλλή, 1994).

6. ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΕΝΑΝΤΙ ΦΥΣΙΚΩΝ ΚΑΙ ΧΗΜΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ

Το μυκοβακτήριο της παραφυματίωσης μπορεί να ζήσει εκτός του ζώου για μεγάλο χρονικό διάστημα. Έχει αποδειχθεί ότι μπορεί να παραμείνει ζωντανό για 163 ημέρες σε νερά ποταμών και 270 ημέρες σε νερά λιμνών (*Chiodini, 1984*).

Στα κόπρανα και στο χώμα μπορεί να επιβιώσει 11 μήνες, ενώ στα ούρα μόνο 7 ημέρες (*Jorgensen, 1977*).

Τα κόπρανα ενεργούν ως βακτηριοστατικοί παράγοντες και τα ούρα ως βακτηριοκτόνοι.

Το *M. paratuberculosis* είναι ανθεκτικό σε πολλά απολυμαντικά.

Το βακτήριο καταστρέφεται σε 10min σε διάλυμα φορμόλης (5%), κρεζολικά απολυμαντικά (1:32 αραιώση), φαινόλη (1:40 αραιώση), διχλωριούχος υδράργυρος (1:1000 αραιώση) και υποχλωριώδες ασβέστιο (1:50 αραιώση).

Η δράση αυτών των απολυμαντικών μελετήθηκε σε υδάτινα διαλύματα των μυκοβακτηρίων, η παρουσία κοπράνων ελαττώνει την επίδραση πολλών απολυμαντικών (*Chiodini, 1984*).

Ο Richards (*1989*), αναφέρει ότι το όξινο περιβάλλον του εδάφους (χαμηλό pH) ευνοεί την εμφάνιση και εξέλιξη της νόσου ενώ το αλκαλικό (υψηλό pH) βοηθά στον περιορισμό της νόσου.

Ένα άρθρο του Kopecky (*1977*), ενισχύει αυτήν την άποψη. Ο Kopecky αναφέρει ότι το 1948 στην Ολλανδία σε μια εκτροφή μολυσμένων βοοειδών με παραφυματίωση, το έδαφος είχε χαμηλή περιεκτικότητα σε ασβέστιο και όσο η περιεκτικότητα του ασβεστίου αυξανόταν (αλκαλικό) η νόσος εμφάνιζε κάμψη.

Επίσης αναφέρεται μια παρόμοια περίπτωση στη Γαλλία (*Δημαρέλη-Μαλλή, 1994*).

7. ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Πρόσφατες γενετικές μελέτες του *M. paratuberculosis* αναφέρουν ότι διάφορα στελέχη έχουν γενετικές ομοιότητες. Η Whipple (*1989*), μελέτησε στελέχη *M. paratuberculosis* που απομονώθηκαν από βοοειδή και αιγοπρόβατα και βρήκε ότι τα στελέχη ήταν όμοια με το βόειο στέλεχος αναφοράς ATCC 19698.

Παράλληλα ο Chiodini (*1990*) βρήκε, χρησιμοποιώντας το 5SrRNA probe σαν DNA αναφοράς, ότι στελέχη που απομονώθηκαν από βοοειδή, αιγοπρόβατα και ανθρώπους είναι σχεδόν ταυτόσημα.

Πρόσφατες δημοσιεύσεις αναφέρουν ότι το *M. paratuberculosis* δεν είναι ξεχωριστός είδος αλλά ένα υπο-είδος του *M. avium* (*Thorel, 1990*). Το γεγονός αυτό αποδόθηκε στην φαινοτυπική ομοιότητα μεταξύ των *M. avium* και *M. paratuberculosis* λόγω της διασταυρούμενης ανοσολογικής αντίδρασης και του ομόλογου DNA.

Με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR – polymerase chain reaction) βρέθηκε ότι η γενετική διαφορά των *M. paratuberculosis* και *M. avium* έγκειται στην ακολουθία IS900 (Sequence) που υπάρχει στο DNA του *M. paratuberculosis* και λείπει από το *M. avium*.

Η ακολουθία IS900 αποτελείται από 1451 ζεύγη βάσεων (bp) των οποίων το 66% είναι γουανική κυτοσίνη (G + C). Η ακολουθία IS900 βρέθηκε στον κλώνο PMB22 του *M. paratuberculosis*.

Η αντιγονική ανάλυση του *M. paratuberculosis* έδειξε ότι είναι στενά συνδεδεμένο με την ομάδα του *M. avium* (*M. avium* Complex – MAC).

Η φαινομενική αντιγονική ομοιότητα των εργαστηριακών στελεχών αναφοράς του *M. paratuberculosis* με την ομάδα *M. avium* θέτει το ερώτημα της σχέσης των δύο ειδών. Θα μπορούσε το *M. paratuberculosis* να είναι ένας βióτυπος του MAC ή είναι διαφορετικά είδη;

Από μελέτες της δομής του γενώματος του *M. paratuberculosis* βρέθηκε ότι 31 στελέχη *M. paratuberculosis*, με μια μόνο εξαίρεση, δεν παρουσίασαν διαφορές και έχουν το ίδιο γένωμα με το στέλεχος *M. paratuberculosis* 19698.

Το γένωμα του στελέχους *M. paratuberculosis* 18 ήταν παρόμοιο με τον ορότυπο 2 του *M. avium*. Μετά από έρευνες με την τεχνική υβριδισμού του DNA, βρέθηκε ότι υπάρχει συγγένεια υψηλού βαθμού μεταξύ των DNA του *M. paratuberculosis* και *M. avium*.

Σύμφωνα με τα ανωτέρω, αυτά τα είδη θα μπορούσαν να θεωρηθούν βióτυποι ειδών με το ίδιο γένωμα.

Ο Hampson et al. (1989) εξέτασε 55 στελέχη του *M. avium* που απομονώθηκαν από ασθενείς με AIDS. Τα στελέχη αυτά παρουσίασαν ορισμένες διαφορές από τα στελέχη του *M. paratuberculosis*.

Η παραπάνω έρευνα επεκτάθηκε και σε 200 στελέχη *M. avium* που απομονώθηκαν από ασθενείς με AIDS, χωρίς AIDS, από δείγματα περιβάλλοντος και διάφορων ζώων. Κανένα από αυτά τα στελέχη δεν περιείχε την ακολουθία IS900 που είναι χαρακτηριστική του *M. paratuberculosis*.

Το *M. paratuberculosis* δε φαίνεται να προσβάλλει ασθενείς με AIDS και δεν προκαλεί φυματίωση στους ανθρώπους, πτηνά ή άλλα ζώα.

Μπορεί το *M. avium* να προκαλέσει παραφυματίωση στα ζώα; Η απάντηση είναι διφορούμενη.

Ο McFadden και οι συνεργάτες του, ταυτοποίησαν ένα μικρό αριθμό στελεχών του *M. avium* (χωρίς IS900), που απομονώθηκαν από μηρυκαστικά με παραφυματίωση. Αυτά πιθανόν να αντιπροσωπεύουν ευκαιριακά μυκοβακτήρια, που εισέδυσαν σε ξενιστή με ανοσοκαταστολή από λοίμωξη με *M. paratuberculosis*.

Τα στελέχη του *M. avium* που απομονώθηκαν από περιστατικά παραφυματίωσης είναι διαφορετικά από τα στελέχη *M. avium* που προσβάλλουν ασθενείς με AIDS. Τα στελέχη αυτά, εξεταζόμενα με τη μέθοδο RFLP τύπου A/1 που περιλαμβάνει τα εξαρτώμενα από τη μυκομπακτήνη στελέχη που απομονώθηκαν από wood-pigeons και ελάφια, στελέχη που ποτέ δεν έχουν απομονωθεί από ασθενείς με AIDS.

Το "wood-pigeon bacillus" όπως μερικές φορές ονομάζεται, προκαλεί παραφυματίωση σε πειραματικές μολύνσεις στα μηρυκαστικά και φυματίωση στα πτηνά. Πρόσφατα απομονώθηκε αυτό το στέλεχος από δύο περιπτώσεις της νόσου του Crohn στον άνθρωπο.

Από τα παραπάνω προκύπτει ότι το *M. avium* μπορεί να διαιρεθεί σε δύο τύπους :

1. *M. avium* RFLP τύπος A

2. *M. avium* RFLP τύπος A/1

Ο τύπος A βρίσκεται συχνά σε ασθενείς με AIDS και δεν προκαλεί παραφυματίωση, ενώ ο RFLP A/1 τύπος που περιλαμβάνει το "wood-pigeon bacillus" βρίσκεται σε ζώα με φυματίωση, αλλά μπορεί επίσης να προκαλέσει παραφυματίωση στα ζώα.

Βέβαια η πλειονότητα των περιπτώσεων της παραφυματίωσης στα μηρυκαστικά προκαλείται από το *M. paratuberculosis* που περιέχει την ακολουθία IS900.

Οι Hurley et al. (1988), Saxegaard & Baess (1988) και Yoshimura & Graham (1988), χρησιμοποιώντας τον υβριδισμό του DNA προσδιόρισαν τις σχέσεις μεταξύ των *M. paratuberculosis* και *M. avium*.

Βάσει του ομόλογου DNA, απέδειξαν ότι τα *M. paratuberculosis*, *M. avium* και wood-pigeon μυκοβακτήρια ανήκουν στο ίδιο είδος.

Επίσης λόγω του ομόλογου DNA των μυκοβακτηρίων της νόσου του Crohn και του *M. paratuberculosis* τα στελέχη που απομονώνονται από τη νόσο του Crohn και το *M. paratuberculosis* είναι μέλη του MAI Complex.

ΠΑΡΑΦΥΜΑΤΙΩΣΗ

1. ΟΡΙΣΜΟΣ

Η παραφυματίωση είναι χρόνια λοιμώδης νόσος των μηρυκαστικών, που χαρακτηρίζεται από διαλείπουσα διάρροια και προοδευτική απίσχναση. Οφείλεται στο *Mycobacterium paratuberculosis*, το οποίο εντοπίζεται και δρα στον εντερικό βλενογόνο.



2. ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ

Ένα ζώο που μολύνεται από το *M. paratuberculosis* είναι δυνατόν να εμφανίσει λοίμωξη ή όχι. Αυτό θα εξαρτηθεί από τον αριθμό των βακτηρίων που θα πάρει και από την άμυνα του ζώου. Ο αριθμός των μυκοβακτηρίων που απαιτείται για τη λοίμωξη δεν είναι γνωστός, αλλά είναι δυνατό και μικρός αριθμός βακτηρίων να προκαλέσει λοίμωξη.

Το *M. paratuberculosis* δεν παράγει τοξίνη ή λοιμογόνους παράγοντες όμοιους με εκείνους του *M. tuberculosis* (Chiodini, 1984). Εισέρχεται στον εντερικό σωλήνα των ζώων διαμέσου των Μ – κυττάρων των πλακών του Peyer και των επιθηλιακών εντεροκυττάρων. Στη συνέχεια φαγοκυτταρώνεται από τα μακροφάγα (Chiodini, 1991). Το *M. paratuberculosis* δεν προκαλεί καταστροφή του κυττάρου που εγκαθίσταται. Το αποτέλεσμα της διείσδυσης του στον ιστό, δεν είναι η καταστροφή του ιστού αλλά μόνο ο πολλαπλασιασμός του. Η προσπάθεια των μακροφάγων να συλλάβουν τα μυκοβακτηρίδια και ο αμείωτος ενδοκυτταρικός πολλαπλασιασμός του καταλήγει στην απελευθέρωση διαλυτών παραγόντων που ενεργοποιούν φλεγμονώδη κύτταρα.

Κατά τη διάρκεια του τελικού σταδίου, τα μολυσμένα μακροφάγα μεταναστεύουν προκαλώντας βακτηριαμία. Αυτή η μετανάστευση οφείλεται στην απώλεια ανασταλτικών παραγόντων μετανάστευσης (Chiodini, 1984).

Η βακτηριαμμία μπορεί να επιτευχθεί πειραματικά με πολλαπλές ενδοφλέβιες εγχύσεις αντιγόνου.

Μυκοβακτήρια έχουν βρεθεί στους όρχεις, στο σπέρμα, στους βουβωνικούς αδένες, στον προστάτη, στους μαστικούς αδένες, στη μήτρα και στα έμβρυα. Αυτό σημαίνει ότι παρατηρείται και ενδογενής μόλυνση.

Τα μυκοβακτήρια αθροίζονται μέσα στις κοτυληδόνες του πλακούντα και μπορεί να προκαλέσουν πλακουντίτιδα και αποβολή. Ορισμένες φορές οι μικροοργανισμοί μολύνουν το έμβρυο (*Chiodini, 1984*).

Αν και το *M. paratuberculosis*, μπορεί να απομονωθεί σε περισσότερα από 85% των εμβρύων που προέρχονται από μολυσμένα ζώα, η ενδομήτρια μετάδοση της νόσου δε φαίνεται να είναι σημαντικός παράγοντας φυσικής λοίμωξης. Σε εκτροφές βοοειδών που μελετήθηκαν από τον Merkal, 75% των μολυσμένων ζώων προέρχονταν από μη μολυσμένες μητέρες.

Μόσχοι που έχουν γεννηθεί από μητέρες προσβεβλημένες από παραφυματίωση, είναι περισσότερο ανθεκτικοί στη μόλυνση κατά τη νεαρά ηλικία, λόγω του υψηλού αριθμού των μητρικών αντισωμάτων που έχουν.

Μόσχοι και αμνοερίφια μικρότερα των 30 ημερών είναι πιο ευαίσθητα στη μόλυνση, ενώ με την πάροδο του χρόνου η αντίσταση στη μόλυνση αυξάνεται. Βοοειδή και αιγοπρόβατα ηλικίας ενός έτους είναι ανθεκτικά στη μόλυνση.

Ακόμη και πειραματικές μολύνσεις με υψηλές δόσεις μυκοβακτηρίου απέτυχαν να αναπαράγουν τη νόσο σε ενήλικα ζώα. Ο μηχανισμός αντίστασης των ενήλικων ζώων στη νόσο δεν έχει μελετηθεί πλήρως. Ενδεχομένως να οφείλεται σε αύξηση των ενεργοποιημένων μονοπύρηνων φαγοκυττάρων στα ενήλικα και των εκλεκτικών T- κατασταλατικών κυττάρων (*Chiodini, 1991*).

Το γάλα θεωρείται ότι είναι πηγή μόλυνσης αφού 7% των κλινικά αρρώστων ζώων απεκκρίνουν *M. paratuberculosis* με το γάλα. Η επιμόλυνση του γάλακτος από τα κόπρανα αναμφίβολα συντελεί στη μετάδοση και μόλυνση περισσότερο απ'ότι η απέκκριση του μυκοβακτηρίου από το γάλα.

Ανεξάρτητα από τον τρόπο μόλυνσης, το *M. paratuberculosis* εγκαθίσταται και πολλαπλασιάζεται μόνο στον γαστρεντερικό σωλήνα και στα μεσεντέρια λεμφογάγγλια.

Τα κλινικά άρρωστα ζώα μπορεί να απεκκρίνουν περισσότερο από 10^9 μυκοβακτήρια ανά γραμμάριο κοπράνων. Καθημερινά ένα μολυσμένο ζώο μπορεί να απεκκρίνει 9×10^9 μυκοβακτήρια (*Δημαρέλη-Μαλλή, 1994*).

3. ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ

Κλινική μορφή παραφυματίωσης έχει παρατηρηθεί σε βοοειδή ηλικίας από 4 μηνών έως και 15 χρονών (*Chiodini, 1989*).

Η κλινική μορφή σε νεαρά ζώα είναι σπάνια και παρατηρείται μόνο σε εκτροφές με υψηλό ποσοστό μόλυνσης και κακές συνθήκες υγιεινής.

Το πρώτο κλινικό σύμπτωμα είναι συνήθως διαλείπουσα ή σταθερή διάρροια. Σε περίπτωση διαλείπουσας διάρροιας μπορεί η διάρροια να σταματήσει για βδομάδες ή ακόμη και μήνες. Συχνά η διάρροια μειώνεται κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, συνεχίζεται όμως με εντονότερο ρυθμό μετά τον τοκετό.

Η όρεξη και η θερμοκρασία συνήθως διατηρούνται φυσιολογικές. Σε ορισμένες περιπτώσεις παρατηρείται διαλείπων πυρετός (*Chiodini, 1984*).

Το ζώο σταθερά χάνει βάρος, το τρίχωμα είναι ανορθωμένο και το δέρμα ξηρό.

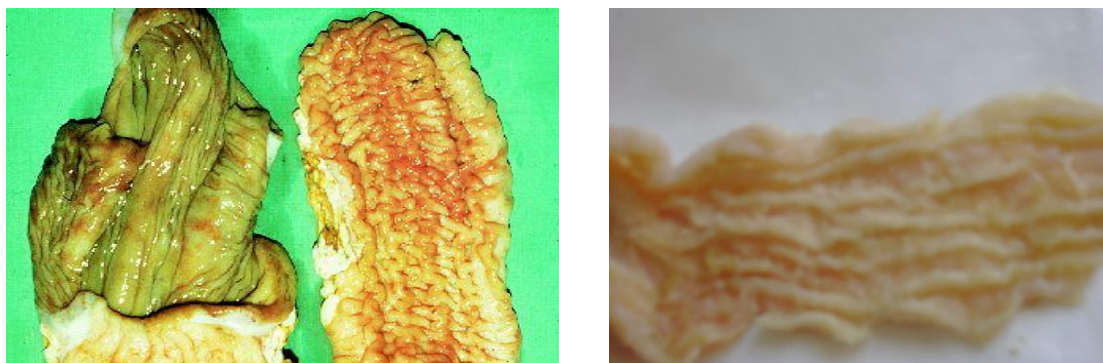
Κατά τη διάρκεια του τελικού σταδίου της νόσου η όρεξη χάνεται, τα διαρροϊκά κόπρανα περιέχουν αίμα, παρατηρείται απίσχναση, εξασθένηση του ζώου και θάνατος.

Το κλινικό στάδιο της νόσου μπορεί να διαρκέσει 3 έως 6 μήνες ή και περισσότερο (*Chiodini, 1984*).

Το στάδιο της κλινικής νόσου εξελίσσεται γρηγορότερα στα αιγοπρόβατα απ'ότι στα βοοειδή.

Κατά τη διάρκεια του κλινικού σταδίου της νόσου παρατηρούνται ορισμένες βιοχημικές μεταβολές του αίματος όπως υπασβεστιαιμία, υποκαλσιαιμία, υποφωσφαταιμία και αύξηση της αλκαλικής φωσφατάσης του ορού.

4. ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΕΣ ΑΛΛΟΙΩΣΕΙΣ



Οι αλλοιώσεις εμφανίζονται από το δωδεκαδάκτυλο έως το απευθυσμένο αλλά πιο συχνά εμφανίζονται στο τελικό τμήμα του ειλεού. Οι πρώτες αλλοιώσεις εμφανίζονται στο τμήμα της ειλεοτυφλικής βαλβίδας.

Παρατηρείται πάχυνση του τοιχώματος της τελικής μοίρας του λεπτού εντέρου, της ειλεοτυφλικής βαλβίδας και της γειτονικής περιοχής του τυφλού. Ο υποβλεννογόνος και βλεννογόνος παρουσιάζουν πτύχωση. Τα μεσεντέρια λεμφογάγγλια είναι εξοιδημένα. Σε μερικές περιπτώσεις η πάχυνση του τοιχώματος στο παχύ έντερο δεν είναι έντονη και παρατηρούνται μόνο πετέχειες. Οι πρωτογενείς αλλοιώσεις περιορίζονται στο γαστρεντερικό σωλήνα και στα λεμφογάγγλια. Σε ζώα μολυσμένα με χρωμογόνα στελέχη (pigmented strains) *M. paratuberculosis*, ο βλεννογόνος μπορεί να έχει κιτρινωπό χρώμα.

Στα νεαρά ζώα μπορεί να μην παρατηρείται πάχυνση ή πτύχωση αλλά αιμορραγική εντερίτιδα. Αλλοιώσεις μπορεί να εμφανίζονται και σε άλλα όργανα. Το ήπαρ προσβάλλεται περισσότερο. Οι αλλοιώσεις περιορίζονται σε εστιακά κιοκκιώματα.

Ο βλεννογόνος του εντέρου διηθείται από μακροφάγα, με τα οποία προκαλούν πάχυνση του υποβλεννογόνου και στα μυϊκά στρώματα οι εντερικές λάχνες είναι διευρυμένες και παραμορφωμένες σε σχήμα ροπάλου. Συχνά εμφανίζονται και γιγαντοκύτταρα τύπου Langhan's. Τα μακροφάγα και τα γιγαντοκύτταρα συνήθως κατακλύζονται από οξεάντοχα βακτήρια. Λίγα οξεάντοχα βακτήρια ή και κανένα μπορεί να παρατηρηθούν στο μικροσκόπιο. Τα λεμφοκύτταρα είναι διάχυτα ή σε αθροίσματα. Η ιστολογική εξέταση πολλές φορές είναι αρνητική σε ζώα με υποκλινική λοίμωξη. Σ' αυτά τα ζώα οι αλλοιώσεις είναι εστιακές και περιέχουν λίγα γιγαντοκύτταρα ή μακροφάγα.

Πειραματικά, οι πρώτες ιστολογικές αλλοιώσεις που παρατηρούνται στα μοσχάρια είναι η εστιακή εμφάνιση γιγαντοκυττάρων μέσα στις πλάκες του Peyer και μέσα στις εντερικές λάχνες.

Σύμφωνα με πρόσφατα βιβλιογραφικά δεδομένα τα μακροφάγα ή τα επιθηλιοειδή κύτταρα σχηματίζουν κοκκιώματα διαφορετικού μεγέθους και αριθμού κυττάρων. Η αλλοίωση είναι εστιακή ή διάχυτη. Οι κοκκιωμάτωδεις αυτές αλλοιώσεις ταξινομούνται σε τρεις τύπους :

Τύπος I : Παρατηρούνται εστιακές αλλοιώσεις που περιέχουν μικρά κοκκιώματα αποτελούμενα από μικρό αριθμό επιθηλιοειδών κυττάρων που βρίσκονται στη

μεσοθυλάκιο ζώνη των πλακών του Peyer. Οι αλλοιώσεις αυτές παρατηρούνται σε δείγματα ειλεοτυφλικής βαλβίδας όπου πάντα βρίσκονται οι πλάκες του Peyer.

Τύπος II : Οι αλλοιώσεις που παρατηρούνται είναι όμοιες με του τύπου I, με τη διαφορά ότι τα κοκκιώματα εμφανίζονται στο χόριο που συνδέεται με τις πλάκες του Peyer.

Τύπος III : Παρατηρούνται διάχυτες κοκκιωματώδεις αλλοιώσεις ιδιαίτερα στο βλεννογόνο του ειλεού.

Ο 3^{ος} τύπος των αλλοιώσεων παρατηρείται κυρίως σε ζώα που έχουν κλινικά συμπτώματα της νόσου. Σε όλα τα δείγματα με αλλοιώσεις τύπου II και III παρατηρούνται άφθονα οξεάντοχα βακτήρια.

Σε δείγματα με αλλοιώσεις τύπου I παρατηρούνται ελάχιστα οξεάντοχα βακτήρια σε ποσοστό 30%.

Στα λεμφογάγγλια υπάρχουν εστίες μακροφάγων και ευκαιριακά γιγαντοκυττάρων. Συνήθως παρατηρούνται και οξεάντοχα βακτήρια. Αρχικά παρατηρείται ιστιοκυττάρωση. Αργότερα, αθροίσματα μακροφάγων αντικαθιστούν το φλοιό (*Chiodini, 1984*).

Στο ήπαρ υπάρχουν εστιακά κοκκιώματα, πολλαπλά γιγαντοκύτταρα τύπου Langhan's ή παρατηρείται περιχολαγγειίτιδα. Στο ήπαρ δεν παρατηρούνται οξεάντοχα βακτήρια (*Δημαρέλη-Μαλλή, 1994*).

5. ΑΝΟΣΙΑ

Ελάχιστες πληροφορίες υπάρχουν για την ανοσολογία της παραφυματίωσης.

Οι προσπάθειες για τη μελέτη της ανοσίας της νόσου επικεντρώθηκαν αρχικά στην εξέταση ανοσολογικών αντιδράσεων ως μέσο διάγνωσης της νόσου, παρά ως μέθοδοι μελέτης της ανοσίας αυτής καθ' αυτής.

Στην παραφυματίωση η κυτταρική ανοσία που διευκολύνει των ξενιστή να καταστρέψει τα μυκοβακτήρια, οφείλεται στη συσσώρευση και ενεργοποίηση των μακροφάγων. Μη ενεργοποιημένα μακροφάγα δε μπορούν να καταστρέψουν ενδοκυτταρικά βακτήρια.

Η κυτταρική ανοσία εκφράζεται από τα μακροφάγα με :

1. περιορισμό του βακτηριακού πολλαπλασιασμού.
2. προσέλκυση κυκλοφορούντων μακροφάγων στο σημείο που πολλαπλασιάζονται τα βακτήρια.
3. το σχηματισμό κοκκιωματώδους αλλοίωσης υπό την επίδραση μηχανισμών εξαρτωμένων από τα T κύτταρα και
4. επίδραση αποτελεσματικών μηχανισμών των ενεργοποιημένων μακροφάγων (*Chiodini, 1991*).

Στο σημείο της μόλυνσης τα εγκατεστημένα μακροφάγα πολλαπλασιάζονται και είναι υπεύθυνα για τον περιορισμό του βακτηριακού πολλαπλασιασμού. Στο σημείο της αλλοίωσης προσελκύονται και μονοπύρηννα φαγοκύτταρα. Αυτά τα φαγοκύτταρα είναι περισσότερο υπεύθυνα για την τοπική ανοσία από ότι τα εγκατεστημένα μακροφάγα (*Chiodini, 1991*).

Τα μυκοβακτήρια, φθάνοντας στις υποεπιθηλιακές στοιβάδες του εντέρου, προσλαμβάνονται από τα εντερικά φαγοκύτταρα. Σ' αυτού του είδους τα μακροφάγα, το μυκοβακτήριο μπορεί να καταστραφεί ή να αναχαιτισθεί ή να παλλαπλασιασθεί ενδοκυτταρικά. Εάν τα μυκοβακτήρια παλλαπλασιασθούν, τα εντερικά μακροφάγα καταστρέφονται και το βακτηριακό φορτίο προσλαμβάνεται από άλλα εντερικά μακροφάγα ή από μακροφάγα που μεταναστεύουν από τα κυκλοφορούντα μονοκύτταρα. Αρχικά τα μυκοβακτήρια που προσλαμβάνονται θα παλλαπλασιασθούν μέσα σε μη ενεργοποιημένα εντερικά μακροφάγα σ' ένα τρόπο συμβίωσης, όπου τα μυκοβακτήρια και τα μακροφάγα ζουν σε μια φαινομενική αρμονία (*Chiodini, 1991*).

Τελικά εμφανίζεται η κυτταρική ανοσία και σχηματίζεται μια κοκκιωματώδης αλλοίωση.

Η εξέλιξη της αλλοίωσης εξαρτάται από την ικανότητα των μακροφάγων, που εισέρχονται στον κοκκιωματώδη ιστό, να καταστούν ενεργοποιημένα να προσβάλουν τα μυκοβακτήρια και να τα καταστρέψουν. Όταν τα μακροφάγα, που περιέχουν τα μυκοβακτήρια, καταστραφούν, το βακτηριακό φορτίο τους προσλαμβάνεται από τα γειτονικά μακροφάγα. Εάν αυτά τα κύτταρα παρουσιάζουν υψηλό βαθμό ενεργοποίησης θα εμποδίσουν τα μυκοβακτήρια ή θα τα καταστρέψουν, με αποτέλεσμα να περιοριστεί η αλλοίωση. Εάν τα γειτονικά μακροφάγα δεν είναι πλήρως ενεργοποιημένα, τα μυκοβακτήρια θα συνεχίζουν να παλλαπλασιάζονται μέχρις ότου τα μακροφάγα νεκρωθούν. Αυτός ο κύκλος θα επαναληφθεί και η αλλοίωση θα παρουσιάσει εξέλιξη.

Εάν σε ειδικά ευαισθητοποιημένα T- κύτταρα βρεθούν βακτηριακά αντιγόνα, οι μηχανισμοί παλλαπλασιασμού θα προκαλέσουν τη συσσώρευση και ενεργοποίηση των μονοπύρηνων φαγοκυττάρων και την εμφάνιση κυτταρικής ανοσίας. Αυτοί οι μηχανισμοί παλλαπλασιασμού ελέγχονται από ιντερλευκίνες, βιολογικές ουσίες που δρουν σαν σηματοδότες μεταξύ των λευκοκυττάρων (*Chiodini, 1991*).

Ο τύπος των T- κυττάρων που θα ενεργοποιηθεί, εξαρτάται από τον τρόπο και τον τύπο των κυττάρων μέσα στον οποίο παρουσιάζεται το αντιγόνο μέσα στις φλεγμονώδεις αλλοιώσεις. Η παρουσία αντιγόνου ποτέ δεν οδηγεί στην αποκλειστική ενεργοποίηση των T- βοηθητικών κυττάρων.

Τα κατασταλτικά και τα κυτταροτοξικά T- κύτταρα ενεργοποιούνται κατά τη διάρκεια της ανοσολογικής αντίδρασης.

Ο ρόλος των κυτταροτοξικών T- κυττάρων στην ανοσολογική αντίδραση κατά του μυκοβακτηρίου δεν είναι γνωστός και πιθανόν να διαδραματίζει κάποιο ρόλο στη λύση των κυττάρων, προκαλώντας απελευθέρωση μυκοβακτηρίων από μη ενεργοποιημένα μακροφάγα για περαιτέρω φαγοκυττάρωση από πλήρως ενεργοποιημένα κύτταρα.

Η ισορροπία μεταξύ των διαφόρων T- κυττάρων προσδιορίζει την τελική ανοσολογική αντίδραση.

Η παρουσία και το ποσοστό των ανοσοσφαιρινών στα μυκοβακτηριακά αντιγόνα σχετίζεται με το βακτηριακό φορτίο του ατόμου. Καθώς το βακτηριακό φορτίο αυξάνεται, η ικανότητα ελέγχου αυτών των μικροοργανισμών και των αντιγόνων τους μειώνεται, με αποτέλεσμα να αρχίσει η ενεργοποίηση των B-κυττάρων. Η παρουσία της χυμικής ανοσίας γενικά προϋποθέτει αυξημένο βακτηριακό παλλαπλασιασμό και αδυναμία της κυτταρικής ανοσίας, έτσι ώστε να υπάρχει μια αντίστροφη σχέση κυτταρικής και χυμικής ανοσίας.

Η παραφυματίωση είναι μοναδική μεταξύ των μυκοβακτηριακών λοιμώξεων, που είναι λοίμωξη του γαστρεντερικού σωλήνα και ελέγχεται από το γαστρεντερικό βλεννογόνο ανοσοποιητικό σύστημα.

Η τοπική ανοσία του γαστρεντερικού συστήματος είναι ανεξάρτητη της γενικής ανοσίας και ρυθμίζεται από τη διέγερση του αντιγόνου στην επιθηλιακή επιφάνεια.

Η γαστρεντερική ανοσία μπορεί να θεωρηθεί μονάδα του ανοσοποιητικού συστήματος του ξενιστή, έχοντας την ικανότητα να είναι ανεξάρτητη και με πλήρη διαχωρισμό των ανοσοποιητικών κυττάρων.

Είναι γνωστό από το 1928, ότι τα βοοειδή και τα πρόβατα έχουν 2 τύπους των μορφολογικά ευδιάκριτων λεμφοεπιθηλιακών δομών, μέσα στο γαστρεντερικό σωλήνα. Αυτές οι δομές, γνωστές ως πλάκες του Peyer, αντιπροσωπεύουν σημαντικά λεμφοειδή τμήματα στο ανοσοποιητικό σύστημα του βλεννογόνου.

Όλα τα θηλαστικά έχουν πλάκες του Peyer στη νήστιδα, που είναι δευτερογενείς λεμφοειδείς ιστοί. Τα μηρυκαστικά έχουν επιπλέον λεμφοεπιθηλιακή δομή γνωστή ως πλάκες του Peyer του ειλεού, που αναπτύσσεται πριν από τη γέννηση και παρουσιάζει περισσότερη ομοιότητα με το θύμο, παρά με τους δευτερογενείς λεμφοειδείς ιστούς. Αναφέρεται ότι οι πλάκες του Peyer του ειλεού στα μηρυκαστικά μπορεί να είναι ένα πρωτογενές λεμφοειδές όργανο ανεξάρτητο του θύμου αδένου.

Οι πλάκες του Peyer αυξάνονται σε μέγεθος και αριθμό από τη γέννηση ως την ωριμότητα και μετά αρχίζουν να μειώνονται. Αυτά τα λεμφοειδή αθροίσματα περιέχουν τα M- κύτταρα (membrane/microfold).

Τα ειδικά M- κύτταρα βοηθούν στη μεταφορά του *M. paratuberculosis* στον εντερικό σωλήνα των ζώων.

Στα μηρυκαστικά υπάρχουν δύο κύριες ομάδες λεμφοκυττάρων που μπορούν να ρυθμίζουν την κυτταρική ανοσία :

1. Τα κλασσικά Τα λεμφοκύτταρα και
2. Τα πρόσφατα αναγνωρισμένα nonT/nonB λεμφοκύτταρα.

Τα nonT/nonB λεμφοκύτταρα, δεν είναι τα κλασσικά T ή B λεμφοκύτταρα, ταυτοποιούνται από την παρουσία ενός μοναδικού διαφοροποιητικού αντιγόνου N12. Τα nonT/nonB λεμφοκύτταρα αποτελούν το 30%-80% των κυκλοφορούντων λεμφοκυττάρων στα νεογέννητα μηρυκαστικά και 15%-30% στα ενήλικα ζώα.

Η ανοσοποίηση με *M. paratuberculosis* έχει ως αποτέλεσμα τον πολλαπλασιασμό των περιφερικών μονοπύρηνων κυττάρων του αίματος (PBMC : peripheral blood mononuclear cells). Η πρωτογενής αντίδραση είναι μικρή μετά από 30 ημέρες. Μετά από μια δεύτερη ανοσοποίηση, ακολουθεί αντίδραση δεκαπενταπλάσια περίπου της πρώτης εντός 30 ημερών. Ακολουθεί μια περίοδος ανεργίας περίπου 70 ημερών.

Μετά από περίοδο 5 ή 6 ημερών από την ανοσοποίηση, η κυτταρική ανοσία επανέρχεται και σταδιακά σταθεροποιείται.

Όσον αφορά τη χυμική ανοσία, τα συνδέοντα στο συμπλήρωμα αντισώματα εμφανίζονται 20-30 εβδομάδες μετά τη μόλυνση και με την πάροδο της νόσου μειώνονται. Οι ιζηματίνες που ανιχνεύονται με την ανοσοδιάχυση σε άγαρ εμφανίζονται 8-24 εβδομάδες μετά τον ενοφθαλμισμό. Σε ζώα που έχουν διάρροια και αδυνατίζουν, οι ιζηματίνες αυξάνονται με την πάροδο της νόσου, ενώ σε ζώα χωρίς κλινικά συμπτώματα και με μικρό αριθμό μυκοβακτηριδίων οι ιζηματίνες μειώνονται και στο τέλος εξαφανίζονται (*Merkal et al., 1968*).

Οι διάφορες κλάσεις των ανοσοσφαιρινών εμφανίζονται στον ορό του αίματος με τη σειρά που εμφανίζονται και στις άλλες μικροβιακές λοιμώξεις, IgM, IgG και IgA. Οι ανοσοσφαιρίνες IgM που εμφανίζονται πρώτες, εξαφανίζονται αρκετά νωρίς. Στο τελικό στάδιο της νόσου κυριαρχούν οι IgG. Οι υποκλάσεις των ανοσοσφαιρινών

IgG διακρίνονται με την ανοσοενζυμική μέθοδο της ELISA και δεν διακρίνονται με την σύνδεση συμπληρώματος.

Σε 20 βοοειδή με παραφυματίωση και 15 υγιή μετρήθηκαν, με την ανοσοενζυμική μέθοδο της ELISA οι ανοσοσφαιρίνες IgM, IgG και IgA. Στα 16 μολυσμένα βοοειδή (80%) βρέθηκε ένα σημαντικό ποσοστό ανοσοσφαιρινών IgG. Ένα ικανοποιητικό ποσοστό IgM βρέθηκε σε όλα τα μολυσμένα ζώα, καθώς επίσης και σε 8 υγιή (53%). Ζώα με παραφυματίωση έχουν ένα πολύ μικρό ποσοστό ανοσοσφαιρινών IgA.

6. ΕΠΙΖΩΟΤΙΟΛΟΓΙΑ

6α. Γεωγραφική Εξάπλωση

Από τη διεθνή βιβλιογραφία αποδεικνύεται ότι η παραφυματίωση είναι ευρύτατα διαδεδομένη σε όλες σχεδόν τις περιοχές της γης.

Χώρες στις οποίες έχει διαπιστωθεί σε μεγάλη έκταση είναι οι Η.Π.Α., Αυστραλία, Καναδάς, Γαλλία, Αγγλία, Ολλανδία, Ισπανία, Δανία, Νορβηγία, Ιταλία, Πορτογαλία, Κύπρος, Ελλάδα κ.α.

Η παραφυματίωση στην Αμερική περιγράφηκε για πρώτη φορά στην Πενσυλβάνια (Β. Αμερική) το 1908, αν και η νόσος είχε εμφανιστεί νωρίτερα. Στην Αγγλία, για περισσότερο από 200 χρόνια, το αίτιο πολλών θανάτων ήταν η παραφυματίωση. Μια έρευνα στην Αγγλία αναφέρει ότι η νόσος είναι ευρέως διαδεδομένη στα βοοειδή σε ποσοστό 18% (*Chiodini, 1984*).

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι οι χώρες οι οποίες φέρονται ότι έχουν υψηλότερο ποσοστό μόλυνσης, είναι εκείνες στις οποίες έχουν διεξαχθεί συστηματικές έρευνες. (*Δημαρέλη-Μαλλή, 1994*).

6β. Παραφυματίωση στην Ελλάδα

Η παραφυματίωση διαπιστώθηκε για πρώτη φορά στην Ελλάδα κατά το 1968 σε αίγα της φυλής Saanen και κατά το 1969 σε αμνό του αγροκτήματος του Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης (αρχεία Εργαστηρίου Παθολογικής Ανατομικής Κτηνιατρικής Σχολής Θεσσαλονίκης). Επίσης κατά τα έτη 1967-1968 η νόσος διαπιστώθηκε στο Κτηνιατρικό Μικροβιολογικό Εργαστήριο Θεσσαλονίκης σε ποιμνιο προβάτων του Νομού Θεσσαλονίκης (Σμοκοβίτης, 1970).



αίγα της φυλής Saanen

Η πρώτη επίσημη ανακοίνωση για την παραφυματίωση στην Ελλάδα έγινε από τους Λεοντίδη και συν. Στο 20^ο Παγκόσμιο Κτηνιατρικό Συνέδριο στη Θεσσαλονίκη το 1975. Είχαν εξετασθεί πτώματα και σπλάχνα 334 αιγών που προέρχονταν από 239 ποιμνία αιγών. Τα δείγματα εξετάστηκαν μακροσκοπικά και ιστολογικά σε περίοδο 8,5 ετών. Παραφυματίωση βρέθηκε σε 2 αίγες φυλής Saanen ηλικίας 10 και 2 ετών αντίστοιχα.

Στην αρχή το πρόβλημα ήταν σποραδικό και δεν είχε σημαντική επίδραση στην παραγωγικότητα των αιγοπροβάτων. Τελικά η εικόνα αυτή άλλαξε. Ο αριθμός των κοπαδιών των αιγοπροβάτων καθώς επίσης και ο αριθμός των ζώων που προσβάλλονται αυξήθηκε και η νόσος βρέθηκε στις περισσότερες περιοχές της Ελλάδας. Μέχρι το 1983 η νόσος είχε επιβεβαιωθεί στους 12 από τους 17 νομούς της Βόρειας και Κεντρικής Ελλάδας, σύμφωνα με επιζωοτιολογική έρευνα. Στο 3^ο Πανελλήνιο Κτηνιατρικό Συνέδριο στην Κέρκυρα το 1984, αναφέρθηκε ότι οι νομοί στους οποίους επιβεβαιώθηκε η νόσος, αυξήθηκαν στους 23 και η νόσος είχε βρεθεί σε όλη τη χώρα (Ηπειρωτική και νησιά).

Μέχρι τους πρώτους μήνες του 1988, η νόσος επιβεβαιώθηκε σε 36 από τις 52 περιοχές της χώρας, κυρίως στην Ηπειρωτική χώρα, καθώς και στα νησιά : Κρήτη, Κέρκυρα και Θάσο και σε μικρά νησιά του Σαρωνικού.

Η νόσος δεν είχε διαπιστωθεί μέχρι το 1991 στα βοοειδή, παρά τη στενή τους πολλές φορές επαφή με αιγοπρόβατα. Το 1992, ανακοινώθηκαν οι πρώτες περιπτώσεις που η νόσος διαπιστώθηκε σε τρεις αγελάδες, 2 εκτροφών του Νομού Φλωρίνης.

Αν και η παραφυματίωση είναι ένα νόσημα με σοβαρές οικονομικές απώλειες, δεν είναι επακριβώς γνωστό το ποσοστό μόλυνσης. Το πρόβλημα είναι πιο σοβαρό στις αίγες. Φαίνεται ότι οι αίγες είναι πιο ευαίσθητες από τα πρόβατα. Ο αριθμός των προσβεβλημένων ζώων είναι σημαντικά μεγαλύτερος σε κοπάδια αιγών σε σύγκριση με των προβάτων. Επίσης οι απώλειες των αιγών είναι σημαντικά μεγαλύτερες από ότι σε κοπάδια προβάτων. Οι παρατηρήσεις αυτές είναι πιο εμφανείς σε μικτά κοπάδια. Για παράδειγμα, σε ένα μικτό κοπάδι 350 αιγών και 100 προβάτων σε περίοδο 5 μηνών, προσβλήθηκαν 240 αίγες, από αυτές 180 πέθαναν και 60 νόσησαν, ενώ κανένα από τα πρόβατα δεν πέθανε ή δεν νόσησε.

Για την εμφάνιση της νόσου παίζουν ρόλο ορισμένοι προδιαθέτοντες στρεσοικοί παράγοντες. Τέτοιοι στρεσοικοί παράγοντες είναι :

1. η κακή διατροφή
2. οι ξαφνικές αλλαγές στη διατροφή
3. οι καιρικές μεταβολές και
4. οι συνεχείς μετακινήσεις.

Γενικά η κλινική εικόνα και τα παθολογικά ευρήματα, ήταν περισσότερο τυπικά στις αίγες από ότι στα πρόβατα.

Οι μακροσκοπικές αλλοιώσεις ορισμένων προβάτων δεν ήταν οι τυπικές της νόσου, ενώ η κλινική εικόνα που παρατηρήθηκε ήταν χαρακτηριστική και η εργαστηριακά διάγνωση ήταν θετική για παραφυματίωση.

Σε μια επιδημιολογική έρευνα που πραγματοποιήθηκε στην περιοχή της Θεσσαλονίκης, σε ποίμνια αιγοπροβάτων, εξετάστηκαν 44 ποίμνια προβάτων [και 35 ποίμνια αιγών (*Δημαρέλη-Μαλλή και συν., 1988*). Η επιλογή του αριθμού των ζώων που εξετάστηκε έγινε τυχαία, βάσει του στατιστικού πίνακα των Cannon & Roe (1982). Από τα 44 ποίμνια προβάτων, 23 βρέθηκαν θετικά στην αλλεργική δοκιμή της γιονίνης (52%) και 21 (48%) επιβεβαιώθηκαν με μια άλλη τουλάχιστον μέθοδο. Από τα 35 ποίμνια αιγών, 7 βρέθηκαν θετικά στην αλλεργική δοκιμή (20%) και 5 (14%) ποίμνια επιβεβαιώθηκαν με μια άλλη τουλάχιστον μέθοδο (*Δημαρέλη-Μαλλή και συν., 1991*).

Διερευνήθηκε μικροβιολογικά και με τεχνικές μοριακής βιολογίας η παραφυματίωση στις αίγες και στα πρόβατα, σε περιοχές της Κεντρικής Μακεδονίας, κατά τη διάρκεια των ετών 1987-2003. Εξετάστηκαν συνολικά 777 εκτροφές αιγών και 458 πρόβατων, που θεωρήθηκαν κλινικά ύποπτες για τη νόσο της παραφυματίωσης. Η διάγνωση βασίστηκε στη μικροσκοπική εξέταση Ziehl-Neelsen και στην απομόνωση του *M. paratuberculosis* και σε ορισμένες περιπτώσεις στην εφαρμογή της PCR. Θετικές βρέθηκαν 322 εκτροφές αιγών (41,4%) και 97 προβάτων (21,2%). (*Δημαρέλη-Μαλλή και συν., 2008*).

7. ΕΙΔΟΣ ΞΕΝΙΣΤΟΥ

Η παραφυματίωση, κατ'εξοχή νόσος των βοοειδών και αιγοπροβάτων, έχει αναφερθεί και σε άγρια ζώα και ζώα ζωολογικών κήπων (*Chiodini, 1983*).

Εκτός των μηρυκαστικών νοσούν από παραφυματίωση και τα μονογαστρικά.

Ιπποειδή, πειραματικά μολυσμένα με υψηλές δόσεις δεν νοσούν κλινικά, αλλά παραμένουν ασυμπτωματικοί φορείς. Αππεκρίνουν το μυκοβακτήριο και είναι εστίας μόλυνσης για τα ευαίσθητα μηρυκαστικά.

Τα πειραματόζωα που μπορεί να χρησιμοποιηθούν για τη διερεύνηση του νοσήματος είναι τα ποντίκια, οι ινδόχοιροι, τα κουνέλια και κρικητοί. Ο βράκιλλος του Johnne πολλαπλασιάζεται στους ξενιστές και μετά από μεγάλα χρονικά διαστήματα προκαλεί φλεγμονώδεις αλλοιώσεις στο γαστρεντερικό σύστημα και στα λεμφογάγγλια.

Τα hamsters είναι τα πιο ευαίσθητα πειραματόζωα για τον πολλαπλασιασμό του μυκοβακτηρίου.

Η παραφυματίωση έχει παρατηρηθεί και σε πιθήκους. Στέλεχος *M. paratuberculosis* έχει απομονωθεί από το γαστρεντερικό σύστημα πιθηκού, *Macaca arctoides*, που πέθανε από ειλεοκολίτιδα παρόμοια της παραφυματίωσης. (*Δημαρέλη-Μαλλή, 1994*).

8. ΔΙΑΓΝΩΣΗ

Η διάγνωση της παραφυματίωσης μπορεί να γίνει κλινικά, νεκροτομικά και εργαστηριακά.

Η κλινική διάγνωση είναι εύκολη στα βοοειδή, προβληματική όμως στα μικρά μηρυκαστικά, γιατί εύκολα συγχέεται με άλλα νοσήματα παραπλήσιας συμπτωματολογίας (παρασιτισμός, προϊούσα πνευμονία κ.ά.).

Νεκροτομικά η διάγνωση δημιουργεί προβλήματα, ιδιαίτερα στα αιγοπρόβατα, όπου η πάχυνση του εντερικού βλεννογόνου δεν είναι πάντοτε σταθερή.

Η εργαστηριακή διάγνωση κατά τον Larsen (*1973*), σ'ένα μολυσμένο κοπάδι μπορεί να περιλαμβάνει 4 κατηγορίες ζώων :

α) Ζώα κλινικώς νοσούντα

β) Ζώα που με τα κόπρανά τους αποβάλλουν το μυκοβακτήριο χωρίς κλινικά συμπτώματα

γ) Ζώα μολυσμένα που κλινικά δεν νοσούν, αλλά δεν αποβάλλουν το μυκοβακτήριο σε ποσότητα τέτοια που εύκολα να ανευρίσκεται στα κόπρανα

δ) Ζώα μη μολυσμένα

Σε ότι αφορά τη διάγνωση στα κλινικά νοσούντα ζώα, αυτή γίνεται μικροσκοπικά (κόπρανα, ξέσματα βλεννογόνου), με καλλιέργειες των ίδιων υλικών και ιστολογικά.

Για τη δεύτερη ομάδα των ζώων, που αντιπροσωπεύουν την πλειονότητα των κοπαδιών, η διάγνωση γίνεται επίσης μικροσκοπικά και με καλλιέργειες των ίδιων

υλικών όπως και προηγουμένως. Για την ομάδα αυτή, η διάγνωση θα γίνει κυρίως με ορολογικές μεθόδους.

Μεγαλύτερη δυσκολία συναντάει η διάγνωση στα ζώα της τρίτης ομάδας, χωρίς κλινικά συμπτώματα, που με τα κόπρανά τους αποβάλλουν λίγα μυκοβακτήρια. Είναι η κατηγορία των ζώων που συχνότερα συναντιούνται κατά τις αγοροπωλησίες και θεωρούνται δυναμικοί απεκκριτές μυκοβακτηρίων. Η σημασία των ζώων αυτών στο κοπάδι δεν πρέπει να υποβαθμίζεται.

Τέλος, η εκτίμηση της μόλυνσης βρίσκεται πάντοτε σε συσχετισμό με το στάδιο εξέλιξης της ασθένειας χωριστά για το κάθε ζώο.

Ακόμη εξαρτάται από τον τύπο των αντισωμάτων που είναι παρόντα στο εξεταζόμενο ζώο την δεδομένη περίοδο. (*Δημαρέλη-Μαλλή, 1994*).

8.1 ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗΣ ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ

8.1α. Μικροσκοπική

Διαπιστώνεται η παρουσία συναθροισμάτων ή και μεμονωμένων μυκοβακτηρίων σε ξέσματα βλεννογόνου από το απευθυσμένο ή και σε κόπρανα. Από τα υλικά αυτά γίνονται επιχρίσματα, τα οποία χρωματίζονται κατά Ziehl-Neelsen, για τη διαπίστωση της οξυαντοχής.

Η μικροσκοπική διάγνωση εμφανίζεται θετική σε προχωρημένο στάδιο της νόσου. Συνήθως είναι αρνητική στο προκλινικό στάδιο, γιατί η μικρή απέκκριση των μυκοβακτηρίων κατά την περίοδο αυτή καθιστά δύσκολη την ανεύρεση τους στα κόπρανα. Θα πρέπει επομένως να λαμβάνονται υπόψη εκείνα τα επιχρίσματα τα οποία χαρακτηρίζονται σαφώς θετικά.

Σύμφωνα με βιβλιογραφικά δεδομένα η μικροσκοπική εξέταση εμφανίζει ευαισθησία που κυμαίνεται από 38% έως 70% σε κλινική παραφυματίωση ενώ η ειδικότητα της μεθόδου είναι 94% (*Jorgensen, 1984*).

Ορισμένες φορές παρατηρούνται σε κόπρανα υγιών ζώων οξεάντοχα βακτήρια που μοιάζουν με το *M. paratuberculosis*.

Ο Merkal (1968), παρατήρησε οξεάντοχα βακτήρια που προσομοιάζουν με το *M. paratuberculosis* σε 83% των περιπτώσεων με κλινική παραφυματίωση, σε 91% των περιπτώσεων χωρίς κλινική παραφυματίωση και σε 76% των περιπτώσεων υγιών ζώων. (*Δημαρέλη-Μαλλή, 1994*).

8.1β. Καλλιέργειες

Η απομόνωση μπορεί να πραγματοποιηθεί από ξέσματα βλεννογόνου εντέρου, από κόπρανα ή ακόμα και από υλικά βιοψίας (τεμάχια λεμφογαγγλίων ή και τεμάχια εντέρου).

Για την απομόνωση του μυκοβακτηρίου από υλικά μολυσμένα με άλλα μικρόβια, απαιτείται ένας συνδυασμός από θρεπτικά υλικά και ουσίες για την κάθαρση (decontamination) των προς σπορά υλικών (Merkal, 1974 – Chioldini, 1984).

Σύμφωνα με τους Merkal, Smith κ.ά. για την καλλιέργεια του *M. paratuberculosis* απαιτείται ένας ουσιώδης παράγοντας αναγκαίος στο μεταβολισμό του μυκοβακτηρίου, η μυκομπακτίνη.

Το υλικό που αρχικά χρησιμοποιήθηκε από τον Merkal για την πρωτοκαλλιέργεια του μυκοβακτηρίου ήταν το υλικό HERROLD'S με κρόκο αυγού, πράσινο μαλαχίτου και εκχύλισμα λεμφογαγγλίων. Στη συνέχεια το υλικό αυτό τροποποιήθηκε προσθέτοντας εναώρημα του *M. phlei* σε γλυκερίνη.

Το *M. phlei*, όπως προαναφέρθηκε, περιέχει τον ουσιώδη εκείνο παράγοντα "τη μυκομπακτίνη", που είναι απαραίτητος στην ανάπτυξη του μυκοβακτηρίου της παραφυματίωσης. Πράγματι αποδείχτηκε στην πράξη ότι το τροποποιημένο υλικό Herold's υπερέχει σημαντικά του απλού στην απομόνωση του μυκοβακτηρίου από τις πρωτοκαλλιέργειες.

Σήμερα δεν χρησιμοποιείται η μυκομπακτίνη που παράγεται από το *M. phlei*, αλλά η μυκομπακτίνη j που παράγεται από το *M. paratuberculosis*.

Είναι γνωστό ότι η μόνη ειδική μέθοδος διάγνωσης ενός λοιμώδους νοσήματος είναι η απομόνωση και ταυτοποίηση του αιτιολογικού παράγοντα της νόσου.

Στην παραφυματίωση, σε περίπτωση ζωντανού ζώου, η διάγνωση τίθεται με καλλιέργεια κοπράνων ή τεμάχια βιοψίας (τεμάχιο εντέρου ή λεμφογαγγλίου). Για να αποβεί θετική η καλλιέργεια κοπράνων πρέπει 1g κοπράνων να περιέχει τουλάχιστον 100 μυκοβακτήρια (Merkal, 1973 – Jorgensen, 1982).

Σε κλινική μορφή παραφυματίωσης ο αριθμός των βακτηρίων που απεκκρίνεται σε 1g κοπράνων είναι τουλάχιστον 10^6 (Jorgensen, 1982). Σε αυτήν την περίπτωση η ευαισθησία της καλλιέργειας είναι 100%.

Ο Elskan et al., (1985), αναφέρει ότι η καλλιέργεια κοπράνων είναι περισσότερο ευαίσθητη από τις ορολογικές μεθόδους αλλά η διαλείπουσα απέκκριση του μυκοβακτηρίου στο προκλινικό στάδιο παραμένει ένα μεγάλο πρόβλημα.

Έχει αποδειχθεί ότι η καλλιέργεια από παθολογικό υλικό (έντερο, μεσεντέριο λεμφογάγγλιο) είναι η πιο αξιόπιστη και χρήσιμη μέθοδος, αν και χρονοβόρα, για τη διάγνωση μολυσμένων ζώων μετά το θάνατο.

Καλλιέργεια ιστών (εντέρου και μεσεντερίων λεμφογαγγλίων) μπορούν να διαγνώσουν το 92% των μολυσμένων αιγών, ενώ η ιστοπαθολογική και μικροσκοπική εξέταση μπορεί να διαγνώσει το 54% και 47% αντίστοιχα.

Σε 158 περιπτώσεις μολυσμένων αιγών σε περιοχή της Αυστραλίας που εξετάστηκαν με μικροσκοπική εξέταση, ιστοπαθολογική και καλλιέργεια ιστών μετά τη σφαγή, η καλλιέργεια ιστών ταυτοποίησε το 100% των περιπτώσεων, η ιστοπαθολογική το 82% και η μικροσκοπική εξέταση το 66%.

8.1γ. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης είναι μια *in vitro* μέθοδος με την οποία τμήματα του DNA γνωστού μήκους και αλληλουχίας, πολλαπλασιάζονται σε σημαντική ποσότητα με τη βοήθεια του ενζύμου Taq πολυμεράση από μικρή ποσότητα αρχικού DNA, δηλαδή μια *in vitro* μέθοδος σύνθεσης εκατομμυρίων αντιγράφων ακολουθίας νουκλεοτιδίων σε λίγες ώρες.

Αναφέρθηκε για πρώτη φορά από τον Saiki το 1985.

Η αλυσιδωτή αντίδραση περιλαμβάνει μια σειρά – 30 κύκλους – από επαναλαμβανόμενα στάδια επώασης σε 3 διαφορετικές θερμοκρασίες. Αρχικά το DNA θερμαίνεται (90-95°C) για να αποδιαταχθεί και να προκύψουν μονόκλωνα μόρια. Κατόπιν, σε κάποια χαμηλότερη θερμοκρασία (55-72°C), δύο κατάλληλες ολιγονουκλεοτιδικές DNA αφετηρίες (primers), οι οποίες είναι συμπληρωματικές με αλληλουχίες που βρίσκονται στους αντίθετους κλώνους του αρχικού DNA κοντά στην περιοχή που πρόκειται να πολλαπλασιασθεί, αφήνονται να ζευγαρώσουν με τον συμπληρωματικό τους κλώνο. Η θερμοκρασία αυτού του σταδίου εξαρτάται κυρίως από την αλληλουχία των ολιγονουκλεοτιδικών αφετηριών. Στο τρίτο στάδιο γίνεται σύνθεση DNA από την DNA πολυμεράση σε κάποια ενδιάμεση θερμοκρασία (70-72°C), η οποία είναι η άριστη θερμοκρασία δράσης του ενζύμου. Η σύνθεση γίνεται στην κατεύθυνση 5'-3' και ως μήτρα χρησιμοποιούνται και οι δύο κλώνοι του αρχικού DNA. Στους επόμενους κύκλους του πειράματος, ως μήτρα σύνθεσης DNA χρησιμοποιούνται και οι θυγατρικές αλυσίδες. Η διαδοχή των σταδίων αποδιάταξη, πρόσδεση των ολιγονουκλεοτιδικών αφετηριών και σύνθεση DNA επαναλαμβάνονται για 30 φορές. Η διάρκεια κύκλου κάθε σταδίου είναι μόνο μερικά δευτερόλεπτα. Επειδή τα προϊόντα ενός κύκλου πολλαπλασιασμού χρησιμοποιούνται ως μήτρα για τον επόμενο κύκλο. Κάθε επιτυχής κύκλος διπλασιάζει την ποσότητα του DNA, οπότε στο τέλος η ποσότητα του DNA αυξάνεται περίπου κατά 10^6 - 10^7 φορές.

Η αντίδραση μπορεί να γίνει σε τρία υδατόλουτρα, τα οποία ρυθμίζονται στις αντίστοιχες θερμοκρασίες ή σε ειδικές συσκευές.

Η χρησιμοποίηση της θερμοανθεκτικής DNA πολυμεράσης και ο αυτοματισμός της μεθόδου (αυτόματος ηλεκτρονικός κυκλοθερμαντής) βοήθησαν στην ανάπτυξη ποικίλων και πολυάριθμων εφαρμογών.

Αναμφίβολα, ένα μοναδικό πρωτόκολλο εργασίας δεν μπορεί να εφαρμοστεί σε όλες τις περιπτώσεις και πάντοτε χρειάζεται προσαρμογή και βελτίωση. Μια τυπική αντίδραση PCR περιέχει :

1. DNA (10^5 - 10^6 άθικτα μόρια)
2. Δύο ολιγονουκλεοτιδικές DNA αφετηρίες (primers 0,1-0,5μM η κάθε μία)
3. Τα τέσσερα δεοξυνουκλεοτιδία dATP, dTTP, dGTP, dCTP, σε ίσες ποσότητες (20-200μM $MgCl_2$) και
4. Taq πολυμεράση 1-2,5 μονάδες

Η Taq πολυμεράση εξάγεται από το μικρόβιο *Thermus aquaticus* και είναι θερμοανθεκτική.

Εάν η συγκέντρωση της πολυμεράσης είναι πολύ υψηλή, το προϊόν της PCR είναι μη ειδικό, εάν πάλι είναι πού χαμηλή το προϊόν δεν είναι αρκετό. Επίσης, υψηλές συγκεντρώσεις των primers δίνουν μη ειδικό προϊόν της PCR.

Ο χρόνος για κάθε στάδιο των 30 κύκλων αρχίζει να μετρά αφού το μίγμα αντίδρασης αποκτήσει την επιθυμητή θερμοκρασία. Ο χρόνος αποδιάταξης είναι συνήθως 30 δευτερόλεπτα στους 95°C. Ο χρόνος πρόσδεσης των ολιγονουκλεοτιδικών αφετηριών εξαρτάται από τη σύσταση τους σε νουκλεοτιδία, το

μήκος και τη συγκέντρωση τους και είναι συνήθως μερικά δευτερόλεπτα. Ο χρόνος σύνθεσης DNA εξαρτάται από το μήκος της αλληλουχίας που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί και από τη συγκέντρωση της, συνήθως 1 λεπτό, είναι αρκετός χρόνος για τη σύνθεση ενός τμήματος 1Kb.

Μετά το τέλος της αντίδρασης, μικρή ποσότητα του πολλαπλασιασμένου DNA αναλύεται με ηλεκτροφόρηση.

Μερικά προβλήματα που ενδέχεται να παρουσιαστούν κατά τον πολλαπλασιασμό είναι :

- Η μη ανίχνευση προϊόντος ή η πολύ μικρή απόδοση του επιθυμητού προϊόντος.
- Η παρουσία μη ειδικών ζωνών, που οφείλεται σε λανθασμένη σύνδεση των αφετηριών.
- Ο σχηματισμός από τις αφετηρίες διμερών τα οποία συναγωνίζονται για πολλαπλασιασμό με το επιθυμητό προϊόν.
- Τέλος, το πιο σοβαρό πρόβλημα της μεθόδου είναι η μόλυνση από άλλο DNA, απαιτούνται λοιπόν ιδιαίτερα αυστηρές προφυλάξεις.

Η PCR είναι μια τεχνική σύντομη, απλή και με πολλές εφαρμογές. Σήμερα μάλιστα είναι γνωστές πολλές παραλλαγές της βασικής μεθόδου. Ερευνητικά χρησιμοποιείται π.χ. για την παραγωγή ειδικών αλληλουχιών κλωνοποιημένου δίκλωνου DNA το οποίο θα χρησιμοποιηθεί ως ανιχνευτής, για την παραγωγή ανιχνευτών για μη κλωνοποιημένα γονίδια με πολλαπλασιασμό ειδικών τμημάτων cDNA, για τη δημιουργία cDNA βιβλιοθηκών από μικρές ποσότητες mRNA, για την παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων DNA προκειμένου να μελετηθεί η αλληλουχία των νουκλεοτιδίων του, για την ανίχνευση μεταλλάξεων.

Στην ιατρική, η μέθοδος παρέχει σημαντική βοήθεια :

- Στη διάγνωση και στο μαζικό έλεγχο γενετικών ασθενειών.
- Στη διαπίστωση του είδους των μεταλλάξεων που συμβαίνουν στο DNA καρκινικών κυττάρων.
- Στην επιλογή των κατάλληλων δοτών και δεκτών στις μεταμοσχεύσεις.
- Στην ανεύρεση της αλληλουχίας των νουκλεϊνικών οξέων παθογόνων μικροοργανισμών στα δείγματα ασθενών.
- Τέλος στην επίλυση ιατροδικαστικών προβλημάτων.

Η PCR έχει αρχίσει να εφαρμόζεται στη Μικροβιολογία, ως διαγνωστική μέθοδος σε ορισμένες περιπτώσεις, διότι εξασφαλίζει ταχύτητα, μεγάλη ειδικότητα και ευαισθησία. Λόγω αυτών των ιδιοτήτων της υπερτερεί έναντι των συμβατικών μεθόδων και χρησιμοποιείται είτε ως συμπληρωματική βελτιωμένη διαγνωστική μέθοδος, είτε προς αντικατάσταση μιας υπάρχουσας μεθόδου ή τέλος, ως νέα διαγνωστική μέθοδος.

Εφαρμόζεται στη διάγνωση μικροβιολογικών λοιμώξεων κατά τις οποίες η απομόνωση του μικροοργανισμού από παθολογικά υλικά είναι ανέφικτη ή προβληματική λόγω του μικρού του αριθμού σ'αυτά ή της βραδείας ανάπτυξης του σε καλλιεργητικά υλικά. Επίσης, με την τεχνική PCR γίνεται ταυτοποίηση και τυποποίηση των μικροοργανισμών ταυτόχρονα και με μεγαλύτερη ακρίβεια, διότι στηρίζονται στην αναγνώριση γενετικού υλικού και όχι φαινοτυπικών χαρακτηριστικών. Έτσι ο εντοπισμός της πηγής μόλυνσης για επιδημιολογικούς ή ερευνητικούς σκοπούς μπορεί να γίνει ταυτόχρονα σε μεγάλο αριθμό δειγμάτων και σε σύντομο χρονικό διάστημα.

Η PCR έχει εφαρμοστεί για την αναγνώριση πολλών μικροοργανισμών, βακτηρίων, παρασίτων και μυκήτων αλλά χρησιμοποιείται κυρίως για μικροοργανισμούς που οι συμβατικές μέθοδοι δεν είναι ικανοποιητικές. (Δημαρέλη-Μαλλή, 1994).

8.2 ΕΜΜΕΣΟΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Είναι γνωστό ότι ένα άρρωστο από παραφυματίωση ζώο αρχικά περνάει από μια φάση εγκατάστασης της υπερευαισθησίας και στη συνέχεια από μια δεύτερη φάση, στη διάρκεια της διαδρομής της οποίας παράγονται τα κυκλοφορούντα αντισώματα. Η πρώτη φάση ανταποκρίνεται στην προκλινική μορφή της νόσου, ενώ η δεύτερη στην κλινική. Έτσι έχουμε δυο μεγάλες ομάδες μεθόδων διάγνωσης :

1. Μέθοδοι που επιτρέπουν την αξιολόγηση των ανοσολογικών αντιδράσεων κυτταρικού τύπου :

- IN VIVO : Αλλεργική δοκιμή της γιονίνης.
- IN VITRO : α) Η δοκιμή της μεταναστεύσεως των μακροφάγων.
β) Δοκιμή πολλαπλασιασμού λεμφοκυττάρων.
γ) Μέθοδος ιντερφερόνης.

2. Μέθοδοι που επιτρέπουν την αξιολόγηση της ύπαρξης των κυκλοφορούντων αντισωμάτων από της εγκατάστασης της χυμικής ανοσίας :

- Σύνδεση συμπληρώματος (C.F.T.).
- Ανοσοδιάχυση σε άγαρ (AGIT).
- Ανοσοενζυμική μέθοδος ("ELISA").

Η αλλεργική δοκιμή της γιονίνης δεν είναι τόσο αξιόπιστη μέθοδος στις αίγες (Chiodini, 1984).

Η ενδοδερμική έγχυση γιονίνης δεν είναι ειδική, διότι σύμφωνα με τα βιβλιογραφικά δεδομένα ποσοστό μέχρι 50% μη μολυσμένων ζώων σε ένα μολυσμένο κοπάδι μπορεί να αντιδράσει στο αντιγόνο (Chiodini et al., 1984).

Η σύνδεση συμπληρώματος δεν παρουσιάζει ευαισθησία στη διάγνωση ελαφρά μολυσμένων ζώων. Η C.F.T. λόγω του υψηλού ποσοστού ψευδών θετικών και αρνητικών αντιδράσεων δε μπορεί να διαγνώσει όλα τα μολυσμένα ζώα.

Η ανοσοδιάχυση σε άγαρ παρουσιάζει μεγάλη ευαισθησία όταν τα ζώα εμφανίζουν κλινικά συμπτώματα. Η ευαισθησία κυμαίνεται από 54% έως 100%.

Το μειονέκτημα της μεθόδου είναι ότι δε μπορεί να διαγνώσει ζώα θετικά στην καλλιέργεια κοπράνων χωρίς κλινικά συμπτώματα. Όταν ένα ζώο είναι θετικό στην ανοσοδιάχυση σε άγαρ, είναι μολυσμένο με το μυκοβακτήριο του Johnne με πιθανότητα > 95%.

Σύμφωνα με βιβλιογραφικά δεδομένα η ELISA έχει μεγαλύτερη ευαισθησία και ειδικότητα από τις άλλες ορολογικές μεθόδους.

Η ευαισθησία της ELISA κυμαίνεται από 56% έως 89% και η ειδικότητα της μεθόδου από 90%-100%.

Η ευαισθησία της μεθόδου εξαρτάται από το στάδιο της νόσου.

Σε ζώα με κλινικά συμπτώματα η ευαισθησία της μεθόδου είναι περίπου 100%, ενώ σε ζώα μολυσμένα χωρίς κλινικά συμπτώματα η ευαισθησία μειώνεται στο 56%.

Τέλος, η ιδανική μέθοδος διάγνωσης της παραφυματίωσης θα πρέπει να είναι:

1. Χαμηλού κόστους.
2. Γρήγορη και εύκολη στην εφαρμογή.
3. Να έχει υψηλή ευαισθησία, δηλ. να ανιχνεύει όλα τα μολυσμένα ζώα.
4. Να έχει υψηλή ειδικότητα, δηλ. να μη δίνει ψευδή θετικά αποτελέσματα (*Δημαρέλη-Μαλλή, 1994*).

9. ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Η παραφυματίωση είναι νόσος που δεν επιδέχεται θεραπείας, παρόλο που το βακτήριο είναι ευαίσθητο σε πολλά αντιφυματικά φάρμακα *in vitro*. Η προσπάθεια θεραπείας με αυτά τα φάρμακα απέτυχε.

Τα ζώα που υφίστανται θεραπευτική αγωγή κλινικά παρουσιάζουν παροδική βελτίωση, αλλά συνεχίζουν να απεκκρίνουν το μυκοβακτήριο και τελικά υποκύπτουν στη νόσο.

Αντιφλεγμονώδεις και ανοσοκατασταλτικοί παράγοντες επηρεάζουν των χαρακτήρα των αλλοιώσεων αλλά δεν είναι αποτελεσματικοί (*Chiodini, 1984*).

Θεραπευτική αγωγή με αντιφυματικά φάρμακα πριν και κατά τη διάρκεια της έκθεσης στο *M. paratuberculosis* δεν εμποδίζουν την μόλυνση ή την ανάπτυξη των αλλοιώσεων.

Ίσως είναι απαραίτητο να γίνει συνδυασμός αρκετών φαρμάκων π.χ. αντιφυματικών και αντιφλεγμονωδών ή ανοσοδιεγερτικών παραγόντων ή ευαισθητοποίηση των ζώων πριν ή και κατά τη διάρκεια της θεραπείας (*Chiodini, 1984*).

Η προσπάθεια ανεύρεσης νέων αντιφυματικών φαρμάκων συνεχίζει να προσφέρει ελπίδα.

Στο 3^ο Παγκόσμιο Συνέδριο για την παραφυματίωση ανακοινώθηκε η μελέτη του συνδυασμού αντιφυματικών φαρμάκων σε μόσχους πειραματικά μολυσμένους με *M. paratuberculosis*. Δυο συνδυασμοί φαρμάκων εξετάστηκαν : α) Tifampin (RMP) + Clofazimine (CFA), β) Tifampin (RMP) + Streptomycin (SM) + Purazinamide (PZA). Ο συνδυασμός RMP + SM + PZA είχε ως αποτέλεσμα τη μη εγκατάσταση του μυκοβακτηρίου στο έντερο και ως εκ τούτου δεν προκλήθηκε λοίμωξη. Ενώ ο συνδυασμός RMP + CFA καθυστέρησε μόνο την απέκκριση του *M. paratuberculosis* στα κόπρανα σε σύγκριση με τους μάρτυρες.

Προς το παρόν πάντως όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή, η αντιμετώπιση της παραφυματίωσης είναι δυνατή μόνο με υγειονομικά μέτρα και μέτρα προληπτικής ιατρικής, τα οποία θα αναπτυχθούν εκτενέστερα παρακάτω.

10. ΕΛΕΓΧΟΣ ΚΑΙ ΠΡΟΛΗΨΗ ΤΟΥ ΝΟΣΗΜΑΤΟΣ

Η παραφυματίωση των αιγοπροβάτων είναι μια χρόνια ασθένεια που προκαλεί σοβαρές οικονομικές ζημιές στην αιγοπροβατοτροφία. Είναι μια ασθένεια που δεν επιδέχεται θεραπεία και η αντιμετώπισή της είναι δυνατή μόνο με υγειονομικά και με μέτρα προληπτικής κτηνιατρικής.

Για τον έλεγχο και την πρόληψη του νοσήματος θα πρέπει να προστατευθούν οι υγιείς εκτροφές και να εξυγιανθούν οι ήδη μολυσμένες.

Ο Chiodini (1984) αναφέρει ότι πρόγραμμα παρόμοιο της φυματίωσης ή της βρουκέλωσης δε μπορεί να εφαρμοστεί, γιατί η παραφυματίωση είναι νόσημα με μεγάλη εξάπλωση και το οικονομικό κόστος για την εφαρμογή ενός τέτοιου προγράμματος θα ήταν μεγάλο. Εξάλλου, λόγω ακριβώς της εξάπλωσης αυτής της νόσου, είναι δύσκολο να αποκτηθεί και να διατηρηθεί μια εκτροφή απηλλαγμένη παραφυματίωσης.

Ένα πρόγραμμα ελέγχου και πρόληψης του νοσήματος θα πρέπει σαφώς να καθορίζει τα υγειονομικά και λοιπά μέτρα που πρέπει να λαμβάνονται για την αντιμετώπιση και εξάπλωση της παραφυματίωσης των αιγοπροβάτων με σκοπό :

- α) Τον εντοπισμό των μολυσμένων εκτροφών των αιγοπροβάτων.
- β) Την εξυγίανση των εκτροφών αυτών και την αύξηση της παραγωγής και της παραγωγικότητάς τους.
- γ) Την προστασία των υγιών εκτροφών από την ασθένεια αυτή.
- δ) Την αύξηση του εισοδήματος των κτηνοτρόφων με τη μείωση των ζημιολόγων επιπτώσεων από την παραφυματίωση των αιγοπροβάτων.

Η διερεύνηση για την διαπίστωση της παραφυματίωσης σε εκτροφές γίνεται με συνδυασμό διαγνωστικών εξετάσεων.

Στην προς διερεύνηση εκτροφή, εξετάζεται τυχαίο δείγμα ζώων, το μέγεθος του οποίου εξαρτάται από το μέγεθος της εκτροφής. Εάν από τις εξετάσεις βρεθεί έστω και ένα μολυσμένο ζώο, τότε ο έλεγχος επεκτείνεται στο σύνολο των ζώων της εκτροφής για τον προσδιορισμό του ποσοστού μόλυνσης.

Όταν σε μια εκτροφή αιγοπροβάτων επιβεβαιωθεί η ύπαρξη μολυσμένων και κλινικά νοσούντων ζώων από παραφυματίωση η εκτροφή θεωρείται μολυσμένη και λαμβάνονται τα παρακάτω υγειονομικά μέτρα :

1. Η μολυσμένη εκτροφή τίθεται σε απομόνωση από τα υπόλοιπα ποιμνία της περιοχής εφόσον αυτά δεν είναι μολυσμένα.
2. Τα μολυσμένα κλινικώς νοσούντα ζώα απομακρύνονται από τα υπόλοιπα της εκτροφής.
3. Συνιστάται η ταχεία απομάκρυνση των μολυσμένων και υποκλινικά νοσούντων ζώων.
4. Διενεργείται υποχρεωτικός εμβολιασμός των νεογνών και αν κριθεί σκόπιμο διενεργείται και εμβολιασμός των ενηλίκων ζώων.
5. Διενεργούνται απολυμάνσεις, αποκομιδή της κόπρου και λαμβάνονται όλα τα απαραίτητα μέτρα για την μη επέκταση της μόλυνσης.
6. Τα ζώα που πλησιάζουν στον τοκετό χωρίζονται από τα υπόλοιπα και γίνονται μικρές ομάδες, οι οποίες θα ζουν σε στεγνό και καθαρό χώρο.
7. Εάν είναι δυνατόν τα νεογνήνα να χωρίζονται από τα υπόλοιπα και να γίνονται μικρές ομάδες οι οποίες θα ζουν σε στεγνό και καθαρό χώρο.
8. Να λαμβάνονται μέτρα ενάντια της θρέψης των νεογνών με πιθανόν μολυσμένο μη παστεριωμένο πρωτόγαλα ή γάλα.
9. Να απομονώνονται αμέσως τα ζώα που γεννούν υποψίες ότι πάσχουν από ασθένεια, μέχρι να τεθεί οριστική διάγνωση.

10. Να επιταχύνεται ο ρυθμός ανανέωσης του ποιμνίου με ζώα εμβολιασμένα κατά της νόσου.

Ένα άλλο σημαντικό πρόβλημα που πρέπει να επισημανθεί είναι η διακίνηση και η μεταφορά των αιγοπροβάτων στο εσωτερικό της χώρας.

Τα ζώα που διακινούνται θα πρέπει να συνοδεύονται από σχετικό έγγραφο διακίνησης. Τα μεταφορικά μέσα πρέπει να είναι κατασκευασμένα κατά τέτοιο τρόπο που να μην επιτρέπουν κατά το χρόνο της μεταφοράς του τη διαρροή κόπρου και ούρων.

Παρόλ'αυτά η πρόληψη της ασθένειας είναι δύσκολη, εφόσον υπάρχουν ελάχιστοι κανονισμοί που να ελέγχουν την πώληση και μεταφορά πιθανών μολυσμένων ζώων. Ένας παραγωγός δεν έχει τρόπο να βεβαιωθεί ότι ένα αγορασμένο ζώο δεν είναι μολυσμένο, εκτός από το να το εξετάσει. Μέχρι να καθιερωθούν ενοποιημένες εξετάσεις και διαδικασίες αναφοράς, η εξασφάλιση ότι ένα ζώο είναι απαλλαγμένο από *M. paratuberculosis* δεν είναι δυνατή.

Στο 3^ο Διεθνές Συμπόσιο με θέμα την παραφυματίωση ανακοινώθηκαν δυο προγράμματα ελέγχου και αντιμετώπισης της νόσου στα βοοειδή. Το πρώτο από τον Cornell University της Ν. Υόρκης και το δεύτερο από το Πανεπιστήμιο της Πενσυλβάνια.

Στο πρώτο πρόγραμμα δόθηκε έμφαση στη συνεργασία των παραγωγών, των Κτηνιάτρων και των διαγνωστικών εργαστηρίων. Το πρόγραμμα περιλαμβάνει καλλιέργεια κοπράνων δυο φορές το χρόνο, σφαγή των θετικών στις καλλιέργειες και παράλληλη εφαρμογή υγειονομικών μέτρων.

Στο δεύτερο πρόγραμμα παράλληλα με την καλλιέργεια κοπράνων εφαρμόζεται και η ορολογική μέθοδος της ELISA (*Δημαρέλη-Μαλλή, 1994*).

11. ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΟΙ

Το 1926, οι Γάλλοι ερευνητές Vallee και Ringjard παρατήρησαν ότι η υποδόρια έγχυση *M. paratuberculosis* δεν προκαλεί μόλυνση.

Με βάση την παρατήρηση αυτή, οι εν λόγω ερευνητές παρασκεύασαν ένα ζωντανό εμβόλιο το 1926. Ο εμβολιασμός έγινε με υποδόρια έγχυση. Τα εμβόλια χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο του νοσήματος σε μολυσμένα από παραφυματίωση κοπάδια και δε συνιστώνται σαν προληπτικό μέτρο σε εκτροφές απηλλαγμένες του νοσήματος.

Εμβολιάζονται ζώα ηλικίας 1-5 εβδομάδων υποδόρια στην ουρά ή πίσω στην κατ' αγκώνα άρθρωση. Συνήθως εμβολιάζονται στην ουρά για να αποφευχθούν πιθανές χωλότητες που μπορεί να παρουσιαστούν με τον εμβολιασμό πίσω στην κατ' αγκώνα άρθρωση. Η ανοσία διαρκεί περίπου 18 μήνες.

Ο επανεμβολιασμός δεν συνιστάται. Αρκετές μελέτες έχουν αποδείξει ότι μετά τον δεύτερο εμβολιασμό παρατηρείται μείωση της αντίστασης του οργανισμού.

Στο σημείο ενοφθαλμισμού του εμβολίου παρατηρείται φλεγμονώδης διόγκωση που στη συνέχεια γίνεται οζίδιο διαμέτρου 32-42mm. Στα οζίδια αυτά, όταν

χρησιμοποιούνται ζωντανά εμβόλια, έχουν βρεθεί ζω-ντανά μυκοβακτήρια και μέχρι 6 χρόνια μετά τον εμβολιασμό.

Ο εμβολιασμός δεν προκαλεί απόλυτη ανοσία. Εμβολιασμένα ζώα μπορεί να νοσήσουν ή να απεκκρίνουν μυκοβακτήρια. Το εμβόλιο μπορεί να προφυλάξει το ζώο από κλινική νόσο ή να καθυστερήσει την εμφάνισή της. Σύμφωνα με τα βιβλιογραφικά δεδομένα, με τον εμβολιασμό παρατηρείται μείωση 90% των κλινικών περιπτώσεων ζώων. Το εμβόλιο μειώνει τον αριθμό των ζώων που απεκκρίνουν το μυκοβακτήριο και τον αριθμό των κλινικά άρρωστων ζώων. Τα εμβολιασμένα ζώα δεν πρέπει να θεωρούνται απαλλαγμένα παραφυματίωσης (*Chiodini, 1984*). Αυτά λόγω των αντισωμάτων και της καθυστερημένου τύπου ευαι-σθησίας που ακολουθεί μετά τον εμβολιασμό, αντιδρούν σε όλες τις ορολογικές δοκιμές.

Υπάρχουν ζωντανά και νεκρά εμβόλια κατά της παραφυματίωσης. Η διαφορά στην αποτελεσματικότητα των δύο τύπων εμβολίων είναι μικρή.

Στην Ευρώπη χρησιμοποιείται ζωντανό εμβόλιο που παρασκευάζεται από το εμβολιακό μη λοιμογόνο, βόειο στέλεχος 316F του *M. paratuberculosis* του Weybridge. Οι χώρες που χρησιμοποιούν το ανωτέρω ζωντανό εμβόλιο είναι Αγγλία, Γαλλία, Δανία, Νορβηγία, Ελλάδα, Κύπρος, Ισπανία, Ν. Ζηλανδία κ.ά.

Στην Κύπρο χρησιμοποιήθηκε ζωντανό εμβόλιο που παρασκευάστηκε στο εργαστήριο στην Κύπρο από το ίδιο εμβολιακό στέλεχος 316F. Τα πρώτα δυο χρόνια το εμβόλιο χρησιμοποιήθηκε πειραματικά. Στην συνέχεια εμβολιάστηκαν όλα τα αρνιά και τα πρόβατα, και τα αποτελέσματα ήταν πολύ ικανοποιητικά. Μετά από 4 χρόνια εφαρμογής του προγράμματος εμβολιασμού δεν εμφανίστηκαν νέες περιπτώσεις παραφυματίωσης. Το ζωντανό αυτό εμβόλιο παρασκευάζεται και στην Ελλάδα στο τμήμα Βιολογικών προϊόντων του Ινστιτούτου Λοιμωδών και Παρασιτικών Νοσημάτων Θεσσαλονίκης, από το ίδιο εμβολιακό στέλεχος 316F. Καλλιεργείται στο ημισυνθετικό υπόστρωμα Watson-Reids και διαλύεται σε ίσες ποσότητες ελαιόλαδου και παραφινέλαιου.

Σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε στη Β. Ελλάδα για τον έλεγχο της αποτελεσματικότητας του ζωντανού αυτού εμβολίου κατά της παραφυματίωσης των αιγοπροβάτων, παρατηρήθηκε σημαντική μείωση των απωλειών στα ερίφια και στους αμνούς 90% σε σχέση με τα ανεμβολίαστα (*Xenos et al., 1988*).

Τα νεκρά εμβόλια κατά της παραφυματίωσης χρησιμοποιούνται στην Αμερική, Ισλανδία και Ολλανδία.

Σήμερα, στην Ελλάδα χρησιμοποιείται το νεκρό εμβόλιο "Gudair", που παρασκευάζεται και διατίθεται από την Ισπανία.

12. ΣΧΟΛΙΑ ΣΤΟΥΣ ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΟΥΣ

Ένα πρόγραμμα ελέγχου και πρόληψης της παραφυματίωσης θα πρέπει σαφώς να καθορίζει τα υγειονομικά μέτρα και μέτρα προληπτικής Κτηνιατρικής που πρέπει να εφαρμόζονται για την εξυγίανση των μολυσμένων εκτροφών και την προστασία των υγείων.

Ως εκ τούτου, ο εμβολιασμός των νεογνών 1-5 εβδομάδων που κρατούνται για αναπαραγωγή θεωρείται απαραίτητος και εάν κρίνεται σκόπιμο διενεργείται και εμβολιασμός των ενηλίκων.

Σύμφωνα με τα βιβλιογραφικά δεδομένα που προαναφέρθηκαν, ο εμβολιασμός μπορεί να προφυλάξει το ζώο από κλινική νόσο ή να καθυστερήσει την εμφάνισή της. Με τον εμβολιασμό παρατηρείται μείωση των κλινικών περιπτώσεων κατά 90%.

Επίσης μειώνεται ο αριθμός των ζώων που απεκκρίνουν το μυκοβακτήριο και παρατηρείται σημαντική μείωση των απωλειών στα εμβολιασμένα ερίφια και αμνούς 90% σε σχέση με τα εμβολιασμένα.

Εξάλλου η μείωση του ποσοστού των απεκκρινόντων μεταξύ εμβολιασμένων κατά 96,5% σε σύγκριση με τα ανεμβολίαστα, εκφράζει την αποτελεσματικότητα του εμβολίου.

Όταν το εμβόλιο χρησιμοποιείται συστηματικά, δηλ. διενεργείται εμβολιασμός των νεογνών που κρατούνται για αναπαραγωγή κάθε χρόνο, σε χρονικό διάστημα 5-7 ετών γίνεται εξυγίανση των ποιμνίων.

Η άποψη αυτή στηρίζεται και από το γεγονός ότι σε παρόμοιο πρόγραμμα εμβολιασμού που εφαρμόστηκε στην Αγγλία, οι εκτροφές απηλλάγησαν από το νόσημα σε χρονικό διάστημα 4 ετών από τον εμβολιασμό.

Όσον αφορά τη χρήση ζωντανού ή νεκρού εμβολίου, η διαφορά στην αποτελεσματικότητα είναι μικρή.

Οι διαφορές των δυο εμβολίων είναι οι διαφορές που υπάρχουν γενικά μεταξύ των ζωντανών και νεκρών εμβολίων (*Δημαρέλη-Μαλλή και συν, 1991*).

13. ΣΧΕΣΗ ΜΕ ΤΗ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ

Στις αρχές της δεκαετίας του 1910, αναφέρθηκε ότι το *M. paratuberculosis* ενδεχομένως να είναι ο αιτιολογικός παράγοντας μιας νόσου του ανθρώπου.

Ο Dalziel το 1913, περιγράφει μερικές περιπτώσεις εντερικών διαταραχών παρόμοιες με της εντερικής φυματίωσης. Αν και δε μπορούσε να προσδιορίσει την αιτιολογία αυτής της νόσου στον άνθρωπο, ανέφερε ότι σε αυτές τις περιπτώσεις απουσίαζαν τα οξεία βακτήρια αλλά οι ιστολογικές αλλοιώσεις ήταν παρόμοιες με της παραφυματίωσης και αναμφίβολα αυτή η νόσος ήταν η νόσος του Crohn.

Η νόσος του Crohn είναι μια φλεγμονώδης ειλεοκολίτιδα του ανθρώπου, αγνώστου αιτιολογίας. Τα συμπτώματα της νόσου είναι χρόνια απώλεια βάρους, κοιλιακός πόνος, διάρροια, εμετός και γενική καχεξία. Ποσοστό 70-80% των ασθενών απαιτούν χειρουργική επέμβαση στο έντερο. Γενικά οι ασθενείς ζουν με χρόνιο πόνο καθ'όλη τη διάρκεια της ζωής τους. Η θνησιμότητα είναι 6%. Το πιο σημαντικό δεν είναι η θνησιμότητα αλλά η ποιότητα ζωής (*Chiodini, 1988*).

Πολλοί οργανισμοί έχουν αναφερθεί ως αιτιολογικοί παράγοντες της νόσου, όπως ιοί (αδενοϊός, μεγαλοκυτταροϊός), βακτήρια (*Campylobacter*, *E. coli*, *Pseudomonas* και αναερόβια) καθώς και χλαμύδια.

Η θεωρία ότι το *M. paratuberculosis* μπορεί να είναι αιτιολογικός παράγοντας υπεύθυνος νόσου στον άνθρωπο, χρονολογείται από το 1900. Το 1932, όταν οι Crohn, Ginsberg και Oppenheimet υποστήριξαν ότι η νόσος του Crohn ήταν μια ξεχωριστή νοσολογική οντότητα με πιθανό αιτιολογικό παράγο-ντα ένα *Mycobacterium* sp., η θέση αυτή δεν έγινε αποδεκτή.

Για 46 χρόνια η νόσος του Crohn και οι μυκοβακτηριώσεις παρέμειναν ξεχωριστές νοσολογικές οντότητες και η πιθανή αιτιολογική συσχέτιση των δυο δεν διερευνήθηκε.

Τα τελευταία χρόνια παρατηρείται μια παγκόσμια προσπάθεια να διερευνηθεί η σχέση των μυκοβακτηρίων και της νόσου του Crohn. Έρευνες που διεξήχθησαν και διεξάγονται, επιβεβαιώνουν το παθογόνο ρόλο του *M. paratuberculosis* με την απομόνωση του από ιστούς ανθρώπων με νόσο του Crohn.

Το *M. paratuberculosis*, που είναι ο αιτιολογικός παράγοντας της παραφυματίωσης των ζώων, έχει απομονωθεί από ασθενείς με τη νόσο του Crohn, σε ερευνητικά κέντρα της Αμερικής, Αυστραλίας, Αγγλίας, Γαλλίας, Ολλανδίας, Ιαπωνίας και Αφρικής. Επίσης, έχουν βρεθεί αντισώματα έναντι του *M. paratuberculosis* σε υψηλό ποσοστό κτηνοτρόφων.

Με την τεχνική υβριδισμού του DNA αποδείχθηκε ότι τα στελέχη του Map που απομονώθηκαν από περιστατικά της νόσου του Crohn, είναι ταυτόσημα με τα στελέχη *M. paratuberculosis* που απομονώνονται από τα ζώα.

Από τα παραπάνω, φαίνεται ότι το Map απομονώνεται από ιστούς ανθρώπου. Το ερώτημα είναι : Πώς εκτίθεται στο μυκοβακτήριο ο άνθρωπος ;

Κατά κύριο λόγο τα περιστατικά της νόσου του Crohn παρατηρούνται σε αστικό πληθυσμό. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα έρευνας που πραγματοποιήθηκε στη Δανία για τη διερεύνηση της ευαισθησίας του Map στην παστερίωση του γάλακτος, προέκυψε ότι το Map πιθανόν να μη αδρανοποιείται πλήρως στους 63,5°C και 71,7°C κατά την παστερίωση σε εργασιακές συνθήκες.

Η παραδοχή του ότι η καταστροφή του Map δεν εξασφαλίζεται με τη παστερίωση, αντίθετα με ότι συμβαίνει με το *M. tuberculosis* και *M. bovis*, αποτελεί πρόβλημα για την δημόσια υγεία.

Η νόσος του Crohn στον άνθρωπο και η παραφυματίωση στα ζώα παρουσιάζουν αξιοσημείωτες ομοιότητες. Η διαλείπουσα διάρροια, η απίσχναση και η πάχυνση του εντέρου είναι από τις χαρακτηριστικές ομοιότητες των δύο νοσημάτων. Ένα από τα συμπτώματα της νόσου του Crohn είναι ο εμετός, ενώ δεν παρατηρείται στην παραφυματίωση. Η αρθρίτις, η νεφρολιθίαση, το κοιλιακό οίδημα, τα έλκη, η κοκκιωματώδης ηπατίτιδα και η λεμφοειδής υπερπλασία, παρατηρούνται στη νόσο του Crohn και στην παραφυματίωση των ζώων.

Τα μυκοβακτήρια απομονώνονται από το γαστρεντερικό σύστημα του ανθρώπου, χωρίς να προκαλούν νόσο. Ακόμη μυκοβακτήρια υπάρχουν στο νερό, στην τροφή και στο περιβάλλον. Είναι πολύ δύσκολο να αξιολογηθεί η απλή παρουσία των μυκοβακτηρίων ή η παθογόνος δράση τους.

Η ευαισθησία των μυκοβακτηρίων στην παστερίωση επανεξετάζεται. Τα αποτελέσματα της έρευνας ενδεχομένως να οδηγήσουν στη θέσπιση άλλων κανόνων, που αφορούν την δημόσια υγεία, καθώς επίσης και άλλων μεθόδων για την προστασία του ανθρώπου από τη νόσο που οφείλεται στο Map.

Παγκόσμια διεξάγονται συστηματικές έρευνες για τη διερεύνηση της αιτιολογίας της νόσου του Crohn και του ρόλου του Map στη νόσο. Παράλληλα, μελετάται η βιολογία του Map, καθώς επίσης και των άλλων μυκοβακτηρίων που απομονώνονται από τον άνθρωπο, το περιβάλλον, τις τροφές και το νερό (*Δημαρέλη-Μαλλή, 1997*).

14. ΟΙΚΟΝΟΜΙΚΕΣ ΕΠΙΠΤΩΣΕΙΣ ΑΠΟ ΤΗ ΝΟΣΟ

Η παραφυματίωση των αιγοπροβάτων είναι μια χρόνια ασθένεια που προκαλεί σοβαρές οικονομικές ζημιές στην αιγοπροβατοτροφία διότι :

1. Μειώνεται σημαντικά το σωματικό βάρος του προσβεβλημένου ζώου, με αποτέλεσμα τη σημαντική μείωση της αξίας του παραγόμενου σφαγίου.

2. Μειώνεται η παραγωγικότητα των κλινικά νοσούντων ζώων, τόσο ως προς τη γαλακτοπαραγωγή όσο και σε ικανότητα πάχυνσης των νεογνών.

Η ασθένεια τα τελευταία χρόνια έχει βρεθεί σε ολόκληρη σχεδόν την χώρα, ούτως ώστε να έχει προσβληθεί μεγάλο ποσοστό του αίγειου και πρόβειου πληθυσμού. Τα ποσοστά αυτά εμφανίζουν τάσεις αύξησης και το γεγονός αυτό επιδρά αρνητικά στους κτηνοτρόφους για τη συνέχιση και αύξηση των δραστηριοτήτων τους.

Ακριβείς εκτιμήσεις οικονομικών απωλειών από παραφυματίωση δεν έχουν γίνει. Είναι πολύ δύσκολο να εκτιμηθεί το οικονομικό κόστος.

Στην Αμερική οι παραγωγοί έχουν υπολογίσει το οικονομικό κόστος των απωλειών σε \$100.000 σε περίοδο 5 ετών.

Εκτός από τις οικονομικές απώλειες λόγω θανάτων, τα μολυσμένα ζώα παρουσιάζουν μειωμένη παραγωγικότητα και γονιμότητα και αυξημένη ευαισθησία σε άλλες μολύνσεις.

Σε μια μελέτη που έγινε σε εκτροφές βοοειδών από τον Merkal στις Η.Π.Α., μόνο το 29,9% των μολυσμένων ζώων είχαν κλινική παραφυματίωση, 70,1% παρουσίασαν δευτερογενείς μολύνσεις (15,9% λόγω μαστίτιδας, 37,3% λόγω στειρότητας και 16,9% λόγω άλλων αιτιών).

Στην Αγγλία η ετήσια οικονομική απώλεια που οφείλεται στην παραφυματίωση εκτιμήθηκε σε \$ 15,4 εκατομμύρια (*Chiodini, 1984*).

Στο Wisconsin, το Central Animal Health Laboratory υπολόγισε ότι το ετήσιο οικονομικό κόστος ανέρχεται σε \$ 54 εκατομμύρια.

Ιδιοκτήτες μολυσμένων εκτροφών στις Η.Π.Α. υπολόγισαν τις οικονομικές απώλειες λόγω κλινικής νόσου και υποκλινικής λοίμωξης σε \$7500 ανά 100 ενήλικα ζώα (*Chiodini, 1984*).

Ο αριθμός των θανάτων σε μολυσμένα κοπάδια προβάτων κυμαίνεται από 0,4-4% των ενήλικων προβάτων.

Στην Ν. Ζηλανδία, το ποσοστό ετησίας θνησιμότητας είναι κατά προσέγγιση 1% των ενήλικων προβάτων. Αυτό το ποσοστό είναι σημαντικά μικρότερο από το ποσοστό 8-10% που αναφέρεται σε μια έρευνα που πραγματοποιήθηκε στην Ισλανδία.

ΔΕΥΤΕΡΟ ΜΕΡΟΣ

Η ΕΡΕΥΝΑ ΜΑΣ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η έρευνα πάνω στην Παραφυματίωση, είχε ως σκοπό την καλλιέργεια και τη μελέτη στελεχών *M. paratuberculosis* που απομονώθηκαν από αιγοπρόβατα.

Η έρευνα έγινε σε 6 διαδοχικά στάδια :

Στο 1^ο στάδιο, στόχος ήταν η συλλογή δειγμάτων κοπράνων, εντέρων και μεσεντερίων λεμφογαγγλίων. Η συλλογή των δειγμάτων αυτών έγινε :

1. Με την επίσκεψή μας σε εκτροφές για δειγματοληψίες.
2. Με παράδοση δειγμάτων από τους ίδιους τους εκτροφείς, στο ερευνητικό κέντρο, όταν διέκριναν συμπτώματα της νόσου στις μονάδες τους.
3. Τέλος, χρησιμοποιήθηκαν και παλαιότερα δείγματα προς επανεξέταση.

Κατά τη διάρκεια των επισκέψεών μας στις εκτροφές ασχοληθήκαμε αρχικά με την παρατήρηση των ζώων, με στόχο να διακρίνουμε τυχόν συμπτώματα της παραφυματίωσης. Στη συνέχεια παίρναμε δείγμα κοπράνων από το απευθυσμένο των ζώων που εμφάνιζαν συμπτώματα. Επίσης, συλλέγαμε κόπρανα από το έδαφος και τέλος, θανατώναμε τα ζώα που βρίσκονταν στα τελικά στάδια της νόσου, για συλλογή δειγμάτων εντέρου και μεσεντερίου λεμφογαγγλίου.

Έπειτα, ακολουθούσε συζήτηση με τους παραγωγούς για την πορεία της νόσου μέσα στην εκτροφή (χρονική εμφάνιση της νόσου, αριθμός νοσούντων ζώων, αριθμός θανάτων εξαιτίας της νόσου κ.τ.λ.). Επίσης, συλλέγονταν πληροφορίες και για τυχόν εμφάνιση άλλων ασθενειών (π.χ. μαστιτίδων κ.α).

Τέλος, γίνονταν οι απαραίτητες συστάσεις στους κτηνοτρόφους, οι οποίες σκοπό είχαν να βοηθήσουν στην εξυγίανση της νόσου.

Στο 2^ο στάδιο, ακολουθούσε μικροσκοπική εξέταση με χρώση Ziehl-Neelsen. (βλ. σελίδα 53).

Κατά το 3^ο στάδιο, γινόταν Decontamination (κάθαρση) του υλικού, με HPC 1,5%. (βλ. σελίδα 52).

Στο 4^ο στάδιο της έρευνας, κάναμε ενοφθαλμισμό του υλικού μας σε καλλιεργητικά υποστρώματα. (βλ. σελίδα 67).

Κατά τη διάρκεια του 5^{ου} σταδίου, ακολουθούσε καλλιέργεια των δειγμάτων σε κλίβανο επώασης.

Και στο 6^ο και τελευταίο στάδιο ασχοληθήκαμε με τη μελέτη και καταγραφή των αποτελεσμάτων των καλλιεργειών. (βλ. σελίδες 68-72).

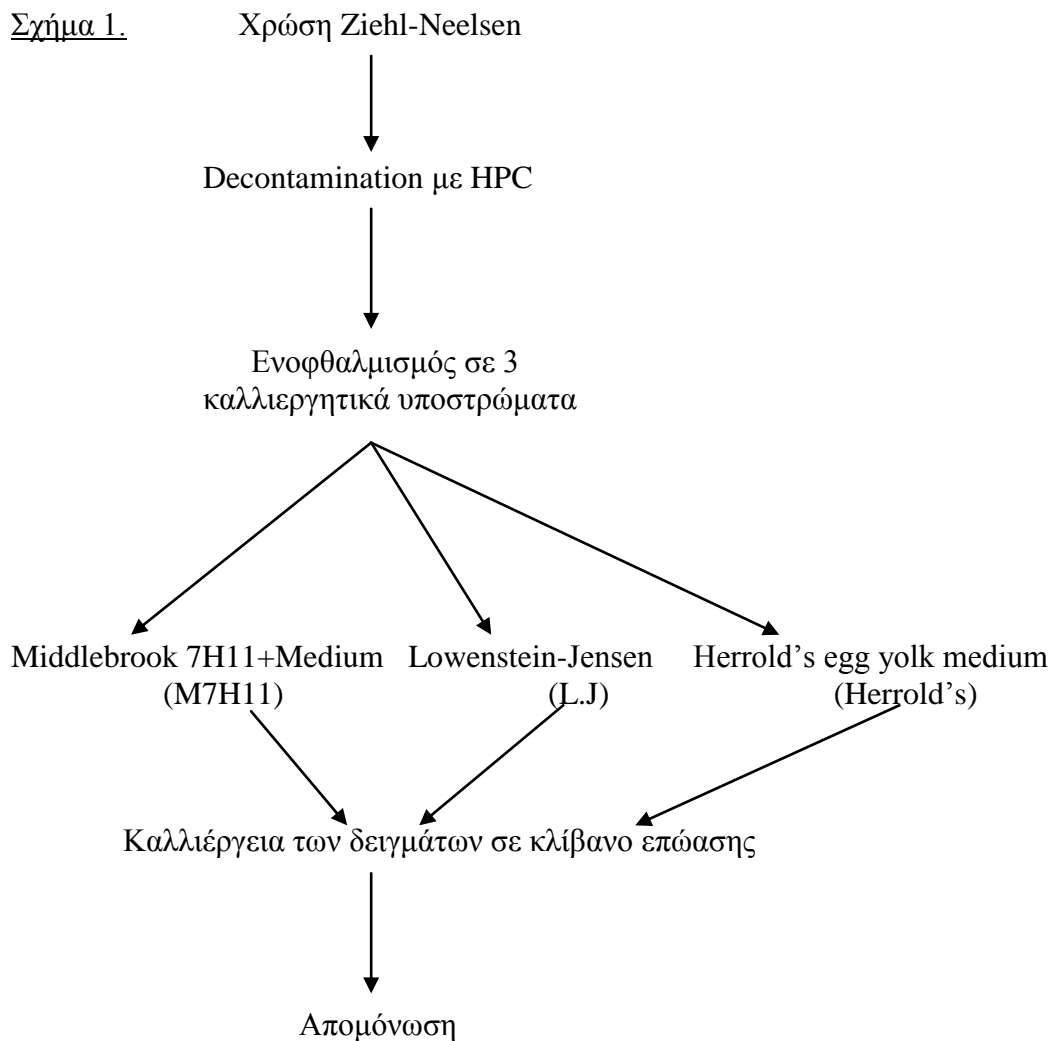
2. ΒΑΣΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΕΡΕΥΝΑΣ

Στόχος της έρευνας ήταν η καλλιέργεια και η μελέτη στελεχών *M. paratuberculosis* που απομονώθηκαν από αιγοπρόβατα.

Για τον σκοπό αυτό έγιναν (σχήμα 1.)

1. χρώση Ziehl-Neelsen
2. Απομόνωση στελεχών *M. paratuberculosis*
3. Καλλιέργεια των δειγμάτων σε κλίβανο επώασης

Σχήμα 1.



Τα παθολογικά υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την καλλιέργεια και μελέτη στελεχών *M. paratuberculosis* ήταν :

1. Μεσεντέριο λεμφογάγγλιο
2. Έντερο
3. Κόπρανα

Αυτά τα υλικά πάρθηκαν από εκτροφές προβάτων, αιγών και από μικτές εκτροφές.

Το έντερο και το μεσεντέριο λεμφογάγγλιο πάρθηκαν μετά από σφαγή, από ζώα που βρίσκονταν στο τελικό στάδιο της παραφυματίωσης με έντονα κλινικά συμπτώματα και λίγο πριν καταλήξουν από την ασθένεια αυτή.

Τα κλινικά αυτά συμπτώματα ήταν :

1. Έντονη διάρροια
2. Απίσχυση
3. Ανορθωμένο τρίχωμα
4. Δέρμα ξηρό
5. Μειωμένη όρεξη κ.α.

Τα κόπρανα πάρθηκαν : α) από το απευθυσμένο των ύποπτων για παραφυματίωση ζώων, δηλαδή των ζώων που εμφάνιζαν συμπτώματα όπως διάρροια, καχεξία κ.α. και β) από το έδαφος. Προτιμούνταν κόπρανα διαρροϊκά ή ελαφρώς διαρροϊκά, παρόλ' αυτά πάρθηκαν και λίγες ποσότητες κοπράνων με φυσιολογική όψη, λόγω του ότι το μυκοβακτήριο μπορεί να απεκκριθεί ακόμη και σε περιπτώσεις που δεν έχουν εμφανιστεί ακόμα κλινικά συμπτώματα όπως αυτό της διάρροιας.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

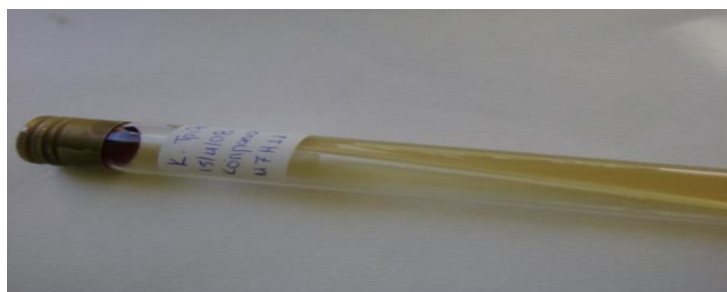
3α. Υλικά

Στα υλικά ανήκουν τα θρεπτικά υποστρώματα, τα οποία χρησιμοποιούνται για την απομόνωση και καλλιέργεια του *M. paratuberculosis*, καθώς και τα αντιβιοτικά που προστίθενται σε αυτά, για την αποφυγή επιμολύνσεων από βακτήρια και μύκητες.

1. Υπόστρωμα Middlebrook 7H11+Medium

1. Middlebrook 7H11 agar	21 gr.
2. Glycerol	25ml.
3. Asparagine	0.3gr.
4. Mycobactin j	1 vial (dissolved in 2ml ethanol)
5. Distilled water	up to 700 ml.

- Διάλυση των υλικών 1 και 3 στο απεσταγμένο νερό με θέρμανση και συνεχή ανάδευση.
- Αποστείρωση στους 121°C επί 15 min.
- Προσθήκη 200ml ορού νεογέννητου μόσχου (ο ορός αδρανοποιείται 1 ώρα στους 56°C).
- Προσθήκη 100ml OADC Enrichment.
- Προσθήκη 2 kirchner Selectatabs. Αναμονή για 2-3 min έως ότου διαλυθούν.
- Διανομή σε βιδωτούς σωλήνες ανά 10ml.
- Διατήρηση στους 4°C.



2. Υπόστρωμα Lowenstein-Jensen με λέκιθο αυγού και μυκομπακτίνη

1. Lowenstein Medium Base	37,2gr.
2. Glycerol	12,0ml.
3. Απεσταγμένο νερό	600,0ml.
4. Mycobactin j	4,1ml.
5. Λέκιθος αυγών	24

- Διάλυση των υλικών 1 και 2 στο απεσταγμένο νερό με θέρμανση και συνεχή ανάδευση.
- Αποστείρωση στους 121°C επί 20 min.

- Προσθήκη 2mg μυκομπακτίνης.
- Προσθήκη των λεκίθων 24 αυγών (θερμοκρασία υποστρώματος 56°C).
- Διανομή σε erlenmayer των 250ml ανά 100ml.
- Διατήρηση στους 4°C.



3. Υπόστρωμα Herrold's egg yolk medium με μυκομπακτίνη j

1. Peptone	9,0gr.
2. NaCl	4,5gr.
3. Agar Noble	15,3gr.
4. Beef extract	2,7gr.
5. Glycerine	27,0gml.
6. Sodium pyruvate	4,1gr.
7. Απεσταγμένο νερό	870,0ml.
8. NaOH (4%)	4,1ml.
9. Mycobactin j	2mg.
10. Αυγά	6
11. Malachite green (2%)	5,1ml.

- Διάλυση των υλικών 1-6 στο απεσταγμένο νερό με θέρμανση και συνεχή ανάδευση.
- Ρύθμιση του pH στο 7,5 με την προσθήκη 4,1ml 4% NaOH.
- Προσθήκη 2mg μυκομπακτίνης.
- Αποστείρωση στους 121°C επί 25min.
- Προσθήκη των λεκίθων 6 αυγών (θερμοκρασία υποστρώματος 56°C).
- Προσθήκη malachite green 2%.
- Διανομή σε βιδωτούς σωλήνες ανά 8-10ml.
- Διατήρηση στους 4°C.



4. Αντιβιοτικά

Όπως προαναφέρθηκε ανωτέρω, τα αντιβιοτικά τα προσθέτουμε στα θρεπτικά υποστρώματα για την αποφυγή επιμολύνσεων από βακτήρια και μύκητες.

Στα 3 θρεπτικά μας υποστρώματα χρησιμοποιήσαμε το αντιβιοτικό : Mycobacteria Selectatab™ (kirchner)

Formulation

Material :

Concentration in medium :

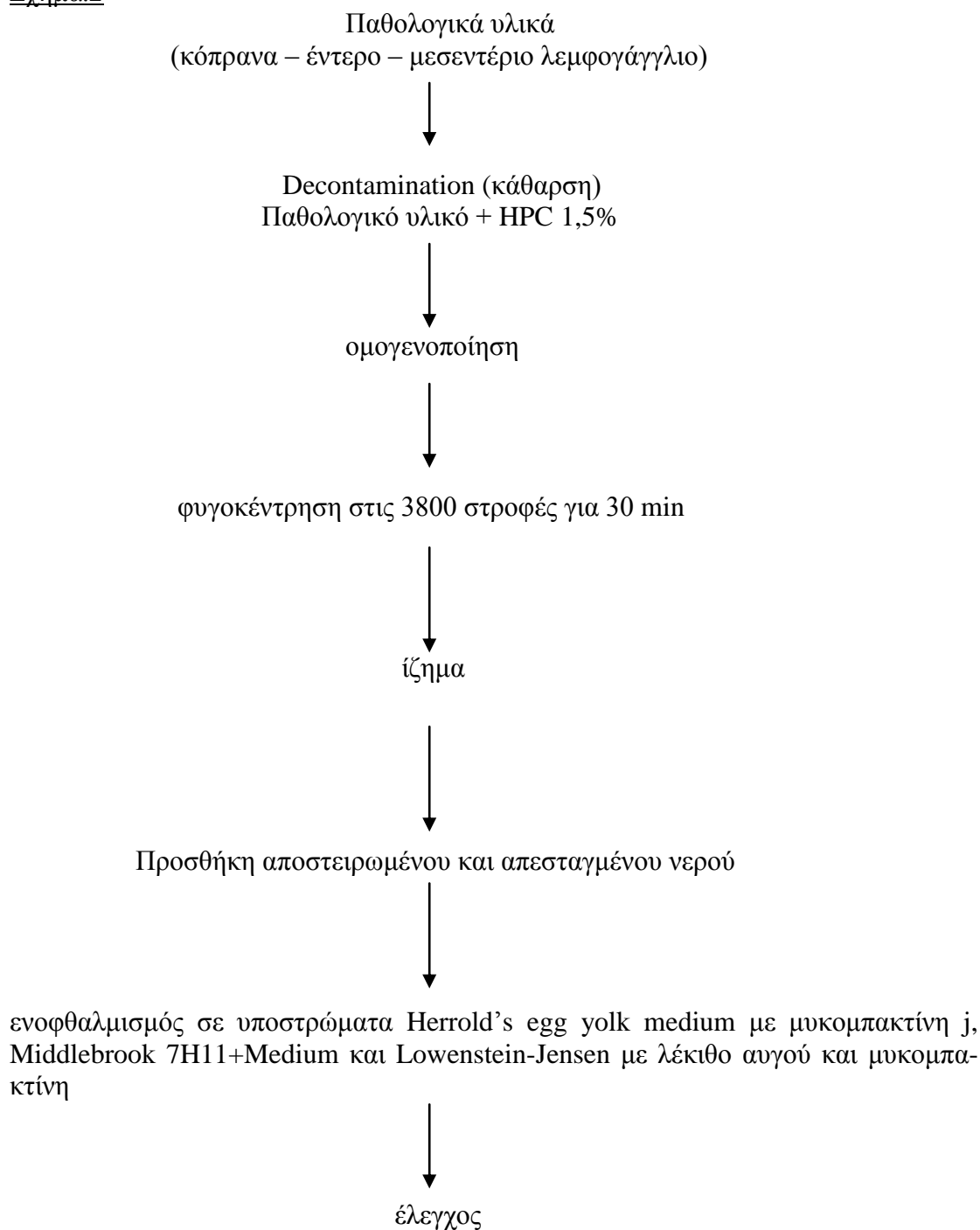
Polymyxin B	200,000 unit/litre
Ticarcillin	100 mg/litre
Amphotericin B	10 mg/litre
Trimethoprim	10 mg/litre

3β. Μέθοδοι

- Απομόνωση στελεχών *M.paratuberculosis*

Ο τρόπος απομόνωσης στελεχών *M. paratuberculosis* από διάφορα παθολογικά υλικά των αιγοπροβάτων παρουσιάζεται παρακάτω (σχήμα 2.) :

Σχήμα.2



1. Decontamination

Παθολογικά υλικά

Κόπρανα
Έντερο
Μεσεντέριο λεμφογάγγλιο

Υλικά

Stomacher (ομογενοποιητής)
Σακούλες για stomacher
1,5% Hexadecyl pyridinium chloride (HPC)

1gr κοπράνων ή εντέρου ή μεσεντερίου λεμφογαγγλίου τοποθετείται σε σακούλα stomacher και προστίθενται 10ml αποστειρωμένο-απεσταγμένο νερό. Ομογενοποιείται στο Stomacher για 2 min. Στη συνέχεια προστίθενται 10ml από το 1,5% HPC και αφήνεται όλη νύχτα σε θερμοκρασία δωματίου για να κατακαθήσουν τα μη ειδικά υλικά.

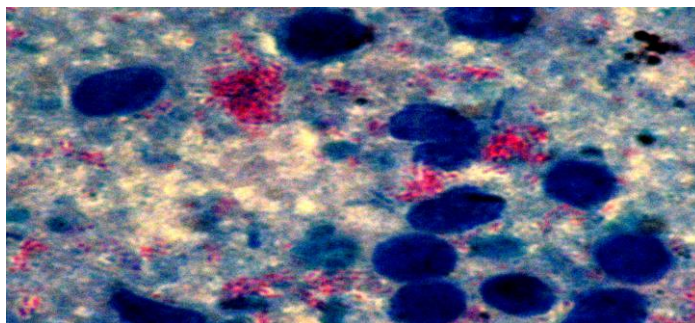
Το υπερκείμενο φυγοκεντρείται στις 3800 στροφές για 30 min. Μετά τη φυγοκέντρηση πετάμε το υπερκείμενο.

Στο ίζημα προσθέτουμε 2ml αποστειρωμένο-απεσταγμένο νερό και ενοφθαλμίζουμε 1-2 σωλήνες από κάθε υπόστρωμα.

Υποστρώματα

Herrold's egg yolk medium
Middlebrook 7H11
Lowenstein-Jensen

2. Χρώση Ziehl-Neelsen



Η χρώση Ziehl-Neelsen χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό των βακτηρίων σε οξεάντοχα και μη οξεάντοχα. Στα οξεάντοχα υπάρχουν τα Μυκοβακτηρίδια (*Mycobacterium*).

Με τη χρώση αυτή τα οξεάντοχα χρωματίζονται κόκκινα και τα μη οξεάντοχα κυανά. Αυτό οφείλεται στο ότι τα οξεάντοχα βακτήρια έχουν τέτοιες χημικές ουσίες στο κυτταρικό τους τοίχωμα ώστε όταν χρωματίζονται με τη φαινικούχο φουξίνη να μην αποχρωματίζονται ακόμα και με την επίδραση ισχυρών διαλυτικών οξέων και να κρατούν την πρώτη χρωστική.

Αντίθετα τα μη οξεάντοχα, επειδή δεν έχουν τις ουσίες αυτές αποχρωματίζονται με την επίδραση διαλυτικών οξέων και έτσι βάφονται με τη δεύτερη χρωστική, το κυανό του μεθυλενίου (*Μαζαράκη, 2002*).

Στην έρευνά μας χρησιμοποιήσαμε τη χρώση αυτή σε επιχρίσματα από ξέσματα εντερικού βλεννογόνου και κοπράνων και στη συνέχεια μικροσκοπήσαμε για να διαπιστώσουμε την ύπαρξη ή όχι μυκοβακτηρίων.

Η μικροσκόπηση είναι η πρώτη εργαστηριακή διάγνωση που πραγματοποιείται στα δείγματά μας, πριν από κάθε άλλη διεργασία.

Τεχνική

- Ετοιμάζουμε το επίχρισμα. Αν το υλικό μας είναι έντερο παίρνουμε ξέσματα βλεννογόνου και τοποθετούμε μια πολύ λεπτή στρώση πάνω στην αντικειμενοφόρο πλάκα. Εάν είναι κόπρανα παίρνουμε μια κρικιά και τοποθετούμε επίσης στην αντικειμενοφόρο πλάκα μια λεπτή στρώση και με προσοχή ώστε να μην υπάρχουν κομμάτια, η στρώση πρέπει να είναι λεία.

- Κάνουμε μονιμοποίηση και ξήρανση πάνω από φλόγα (κρατάμε την αντικειμενοφόρο πλάκα με λαβίδα και περνάμε με γρήγορες κινήσεις πάνω από τη φλόγα και με προσοχή ώστε να μην καεί το επίχρισμά μας).

- Καλύπτουμε το επίχρισμα με διηθητικό χαρτί.

- Καλύπτουμε το επίχρισμα με φαινικούχο φουξίνη για 10 min.

- Θερμαίνουμε την αντικειμενοφόρο πλάκα μέχρι την έκλυση ατμών.

- Απομακρύνουμε το διηθητικό χαρτί και κάνουμε έκπλυση με νερό της βρύσης.
- Αποχρωματίζουμε με ALCOOL-ACIDE μέχρι να μην αποπλύνεται ερυθρή χρωστική.
- Κάνουμε και πάλι έκπλυση με νερό της βρύσης.
- Καλύπτουμε το επίχρισμα για ακόμη μία φορά με διηθητικό χαρτί.
- Καλύπτουμε την αντικειμενοφόρο πλάκα με διάλυμα κυανού του μεθυλενίου για 30 sec.
- Απομακρύνουμε το διηθητικό χαρτί και κάνουμε έκπλυση με νερό της βρύσης.
- Τοποθετούμε την αντικειμενοφόρο πλάκα σε όρθια στάση έως ότου στεγνώσει το επίχρισμά μας.
- Μικροσκοπούμε.

Διαλύματα

1. Φαινούχος φουξίνη
2. Alcool-Acide
3. Μπλε του μεθυλενίου

4. ΙΣΤΟΡΙΚΟ ΚΑΙ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΕΣ ΑΠΟ ΕΚΤΡΟΦΕΣ ΑΙΓΩΝ ΚΑΙ ΠΡΟΒΑΤΩΝ ΜΕ ΠΑΡΑΦΥΜΑΤΙΩΣΗ

Εκτροφή Α.

Το Νοέμβριο του 2007, επισκεφτήκαμε την εκτροφή προβάτων του κτηνοτρόφου Τ. στη Ράχη Βεροίας. Η εκτροφή αποτελούνταν από 300 πρόβατα, εγχώριας φυλής.

Η φυλή ήταν προσβεβλημένη από παραφυματίωση. Τα κρούσματα είχαν εμφανιστεί τέλος του 2006, αρχές του 2007. Το Μάρτιο του 2007 έγινε εργαστηριακή διάγνωση. Αμέσως μετά εμβολιάστηκαν τα μεγάλα ζώα και τα μικρά που κρατήθηκαν για αναπαραγωγή.

Χρησιμοποιήθηκε το νεκρό εμβόλιο "Gudair" κατά της παραφυματίωσης που κυκλοφορεί στο εμπόριο. Σύμφωνα με την εκτίμηση του κτηνοτρόφου, το εμβόλιο είχε ικανοποιητικά αποτελέσματα. Παράλληλα ο κτηνοτρόφος απομάκρυνε από τη περιοχή τα καχεκτικά ζώα και αυτά που είχαν διαλείπουσα διάρροια. Έγιναν απολυμάνσεις και απομάκρυνση της κόπρου.

Το ποσοστό των ζώων που νοσούσαν κατά έτος ήταν 16% και το ποσοστό θανάτων 13%. Η ηλικία θανάτων ήταν 3-4 ετών. Το σιτηρέσιο αποτελείται από φύραμα.

Σύμφωνα με την εκτίμηση του παραγωγού, το ποσοστό μείωσης της γαλακτοπαραγωγής κυμαινόταν από 50% έως 90%. Παράλληλα, παρατηρήθηκε και μείωση στην αναπαραγωγή. Πρόβλημα μαστίτιδων δεν παρουσιάστηκε.

Έγιναν δειγματοληψίες κοπράνων από 5 πρόβατα ηλικίας 3-4 ετών, χωρίς κλινικά συμπτώματα παραφυματίωσης (καχεξία, διαλείπουσα διάρροια). Μόνο το ένα δείγμα ήταν διαρροϊκό.

Αποτελέσματα μικροσκοπικής εξέτασης των 5 δειγμάτων κοπράνων :

1. Παρατηρήθηκαν οξεάντοχοι βάκιλοι.
2. Δεν παρατηρήθηκαν οξεάντοχοι βάκιλοι.
3. Δεν παρατηρήθηκαν οξεάντοχοι βάκιλοι.
4. Παρατηρήθηκαν οξεάντοχοι βάκιλοι.
5. Παρατηρήθηκαν οξεάντοχοι βάκιλοι.

Τα δείγματα κοπράνων τοποθετήθηκαν σε κατάψυξη -70°C. Θα ακολουθήσει καλλιέργεια των δειγμάτων σε θρεπτικά υποστρώματα για απομόνωση του *M. avium* subsp. *paratuberculosis*.

Εκτροφή Β.

Το Νοέμβριο του 2007, επισκεφθήκαμε την εκτροφή προβάτων και αιγών του κτηνοτρόφου Κ.Β. στην Περιστερά Θεσσαλονίκης. Η εκτροφή αποτελούνταν από 300 πρόβατα και 25 αίγες εγχώριας φυλής.

Αρχές του 2005 είχε διαπιστωθεί εργαστηριακά, παραφυματίωση σε αίγα της εκτροφής. Το 2005 η εκτροφή αποτελείτο μόνο από αίγες.

Όταν το 2005 διαπιστώθηκε η παραφυματίωση, ο κτηνοτρόφος αντικατέστησε την εκτροφή με πρόβατα, κρατώντας μόνο 25 αίγες από την προηγούμενη. Πριν την αλλαγή της εκτροφής έκανε απολυμάνσεις.

Κατά την επίσκεψή μας στην εκτροφή, ο κτηνοτρόφος μας ενημέρωσε ότι δεν έχει πρόβατα ή αίγες με συμπτώματα παραφυματίωσης. Εμείς λόγω του ιστορικού της νόσου στην εκτροφή το 2005, θεωρήσαμε σωστό να πάρουμε δείγματα κοπράνων από τις αίγες που είχε κρατήσει από την προηγούμενη εκτροφή.

Η διατροφή των ζώων περιείχε κριθάρι, φύραμα, καλαμπόκι και τριφύλλι.

Έγιναν δειγματοληψίες κοπράνων από :

1. Αίγα 10 ετών (ελάχιστα διαρροϊκά κόπρανα).
2. Πρόβατο.
3. Πρόβατο.
4. Αίγα.
5. Αίγα.
6. Πρόβατο.
7. κόπρανα από το έδαφος.
8. Κόπρανα από το έδαφος.

Αποτελέσματα μικροσκοπικής εξέτασης των 8 δειγμάτων κοπράνων :

1. Παρατηρήθηκαν οξεάντοχοι βάκιλοι.
2. Αρνητικό.
3. Αρνητικό.
4. Αρνητικό.
5. Αρνητικό.
6. Αρνητικό.
7. Αρνητικό.
8. Αρνητικό.

Τα δείγματα κοπράνων τοποθετήθηκαν σε κατάψυξη -70°C . Θα ακολουθήσει καλλιέργεια των δειγμάτων για απομόνωση του *M. avium* subsp. *paratuberculosis*.

Εκτροφή Γ.

Το Νοέμβριο του 2007, επισκεφθήκαμε την εκτροφή αιγών του κτηνοτρόφου Κ. στον Τρίλοφο Πιερίας. Η εκτροφή αποτελούνταν από 430 αίγες εγχώριας φυλής.

Η εκτροφή ήταν προσβεβλημένη από παραφυματίωση. Τα κρούσματα εμφανίστηκαν αρχές του 2007. Τον Απρίλιο του 2007, έγινε εργαστηριακή διάγνωση της παραφυματίωσης σε δείγμα εντέρου αίγας 4 ετών.

Το 2007 εμβολιάστηκαν τα ερίφια που κρατήθηκαν για αναπαραγωγή, με το νεκρό εμβόλιο "Gudair" που κυκλοφορεί στο εμπόριο.

Έγινε σύσταση στον κτηνοτρόφο να εμβολιαστούν και τα μεγάλα ζώα. Παράλληλα ο κτηνοτρόφος απομάκρυνε από την εκτροφή τα καχεκτικά ζώα και αυτά που είχαν διαλείπουσα διάρροια. Έγιναν απολυμάνσεις και απομάκρυνση της κόπρου.

Η διατροφή των ζώων περιείχε σιτάρι, κριθάρι, βαμβακόπιτα, σόγια και φύραμα.

Μέσος όρος ηλικίας των ζώων ήταν 3-4 ετών.

Το ποσοστό το ζώων που νοσούσαν κατά έτος ήταν 15% και το ποσοστό θανάτων 12,5%. Σύμφωνα με την εκτίμηση του παραγωγού, το ποσοστό μείωσης της γαλακτοπαραγωγής κυμαινόταν από 20% έως 30%. Παράλληλα, παρατηρήθηκε μείωση στην αναπαραγωγή. Πρόβλημα μαστίτιδων δεν παρουσιάστηκε.

Παρουσιάστηκε παρασίτωση στα ζώα. Έκανε θεραπεία παρασιτώσεων.

Θανατώθηκε μια αίγα 1,5 ετών, επειδή παρουσίαζε διάρροια και καχεξία. Κατά τη νεκροψία και σε παθολογοανατομική εξέταση του εντέρου, δεν παρατηρήθηκε πάχυνση και πτύχωση του εντέρου. Βρέθηκε ταινία στο έντερο.

Έγιναν δειγματοληψίες :

1. Τμήμα λεπτού εντέρου.
2. Τμήμα εντέρου δίπλα στην ειλεοτυφλική βαλβίδα.
3. Μεσεντέριο λεμφογάγγλιο από αίγα 1,5 ετών με καχεξία και διάρροια.
4. Δείγματα κοπράνων από 3 αίγες ηλικίας 3-4 ετών.
5. Δείγματα κοπράνων από το έδαφος.

Αποτελέσματα μικροσκοπικής εξέτασης Ζ.Ν. :

1. Τμήμα λεπτού εντέρου : Δεν παρατηρήθηκαν οξεάντοχοι βάκιλοι.
2. Τμήμα εντέρου δίπλα στην ειλεοτυφλική βαλβίδα : Δεν παρατηρήθηκαν οξεάντοχοι βάκιλοι.
3. Μεσεντέριο λεμφογάγγλιο : Δεν παρατηρήθηκαν οξεάντοχοι βάκιλοι.
4. Δείγματα κοπράνων από αίγα : Δεν παρατηρήθηκαν οξεάντοχοι βάκιλοι.
5. Δείγματα κοπράνων από αίγα : Δεν παρατηρήθηκαν οξεάντοχοι βάκιλοι.
6. Δείγματα κοπράνων από αίγα : Δεν παρατηρήθηκαν οξεάντοχοι βάκιλοι.
7. Δείγματα κοπράνων από το έδαφος : Δεν παρατηρήθηκαν οξεάντοχοι βάκιλοι.

Τα δείγματα εντέρου, μεσεντερίου λεμφογαγγλίου και κοπράνων, τοποθετήθηκαν σε κατάψυξη στους -70°C . Θα ακολουθήσει καλλιέργεια των δειγμάτων για απομόνωση του *M. avium* subsp. *paratuberculosis*.

Εκτροφή Δ.

Το Δεκέμβριο του 2007, επισκεφθήκαμε την εκτροφή προβάτων του κτηνοτρόφου Σ.Λ. στη Μεγάλη Στέρνα – Χέρσου Ν. Κιλκίς. Η εκτροφή αποτελούνταν από 360 πρόβατα της φυλής Χίου.

Στις 15/11/2007 διαπιστώθηκε εργαστηριακά, παραφυματίωση σε πρόβατο ηλικίας 5 ετών.

Το έντερο παρουσίαζε πάχυνση και πτύχωση και παρατηρήθηκε πληθώρα οξεάντοχων βακίλων. Πριν από 5 χρόνια είχε διαπιστωθεί εργαστηριακά παραφυματίωση στις αίγες που είχε η εκτροφή.

Για την αντιμετώπιση της νόσου ο παραγωγός εμβολίασε τις αίγες και τα ερίφια που κρατούσε για αναπαραγωγή, με το ζωντανό εμβόλιο 316F της παραφυματίωσης, που παρασκευάζετο στο ΙΛΠΑΝ Θεσσαλονίκης. Παράλληλα, έκανε απολυμάνσεις. Σύμφωνα με τον κτηνοτρόφο είχε αντιμετωπισθεί η παραφυματίωση.

Το 2006, αντικατέστησε τις αίγες με πρόβατα. Μέχρι σήμερα από τα πρόβατα έχουν νοσήσει 2. Το ένα πέθανε και το άλλο θανατώθηκε.

Κατά τη δήλωση του κτηνοτρόφου, το 2006 παρουσιάστηκαν αποβολές που οφείλονταν στην γλαυμυδίαση. Τον Ιούνιο του 2007, διαπιστώθηκε λοιμώδης αγκαλαξία (υποκλινική μορφή). Υπήρχαν και προβλήματα μαστίτιδων.

Η διατροφή των ζώων περιείχε : καλαμπόκι, κριθάρι και βαμβακόσπορο.

Έγιναν δειγματοληψίες κοπράνων από :

1. Κριάρι 4 ετών με διάρροια.
2. Κριάρι 3 ετών με χωλότητα, χωρίς διάρροια.
3. Πρόβατο με διάρροια.
4. Πρόβατο χωρίς διάρροια.
5. Κόπρανα από το έδαφος (εσωτερικό της εκτροφής).
6. Κόπρανα από το έδαφος (εσωτερικό της εκτροφής).
7. Κόπρανα από το έδαφος (εσωτερικό της εκτροφής).
8. Κόπρανα από το έδαφος (εσωτερικό της εκτροφής).

Αποτελέσματα μικροσκοπικής εξέτασης των 8 δειγμάτων κοπράνων (χρώση Ζ.Ν) :

1. Δεν παρατηρήθηκαν οξεάντοχοι βάκιλοι.
2. Δεν παρατηρήθηκαν οξεάντοχοι βάκιλοι.

3. Δεν παρατηρήθηκαν οξεάντοχοι βάκιλοι.
4. Δεν παρατηρήθηκαν οξεάντοχοι βάκιλοι.
5. Παρατηρήθηκε οξεάντοχος βάκιλος.
6. Δεν παρατηρήθηκαν οξεάντοχοι βάκιλοι.
7. Δεν παρατηρήθηκαν οξεάντοχοι βάκιλοι.
8. Δεν παρατηρήθηκαν οξεάντοχοι βάκιλοι.

Τα δείγματα κοπράνων τοποθετήθηκαν σε κατάψυξη στους -70°C . Θα ακολουθήσει καλλιέργεια των δειγμάτων για απομόνωση του *M. avium* subsp. *paratuberculosis*.

Εκτροφή Ε.

Το Δεκέμβριο του 2007, επισκεφθήκαμε την εκτροφή αιγών του κτηνοτρόφου Κ.Α. στη Συκιά Χαλκιδικής. Η εκτροφή αποτελούνταν από 600 αίγες εγχώριας φυλής.

Τον Απρίλιο του 2006, διαπιστώθηκε εργαστηριακά παραφυματώση σε αίγα 6,5 ετών. Το έντερο που εξετάστηκε παρουσίαζε πάχυνση και πτύχωση και παρατηρήθηκε πληθώρα οξεάντοχων βακίλων.

Μετά τη διάγνωση, ο παραγωγός εμβολίασε τα μεγάλα ζώα και τα μικρά που κράτησε για αναπαραγωγή. Χρησιμοποιήθηκε το νεκρό εμβόλιο "Gudair" της παραφυματώσης, που κυκλοφορεί στο εμπόριο.

Σύμφωνα με την εκτίμηση του κτηνοτρόφου, το εμβόλιο είχε ικανοποιητικά αποτελέσματα. Παρατηρήθηκε ύφεση των κλινικών συμπτωμάτων. Έγιναν απολυμάνσεις και απομάκρυνση της κόπρου, καθώς και απομάκρυνση των καχεκτικών ζώων.

Το ποσοστό των ζώων που νοσούσαν κατά έτος ήταν 30% και το ποσοστό θανάτων 25%. Η ηλικία θανάτων ήταν 3-4 ετών. Το σιτηρέσιο αποτελείτο από κριθάρι, σιτάρι, καλαμπόκι και βαμβάκοπιτα.

Σύμφωνα με την εκτίμηση του παραγωγού, το ποσοστό μείωσης της γαλακτοπαραγωγής κυμαινόταν από 20% έως 30%. Παράλληλα, παρατηρήθηκε και μείωση στην αναπαραγωγή. Παρουσιάστηκαν και προβλήματα μαστίτιδων. Έγιναν δειγματοληψίες κοπράνων από 4 αίγες και 1 δείγμα από το έδαφος.

Αποτελέσματα μικροσκοπικής εξέτασης των 5 δειγμάτων κοπράνων (χρώση Z.N.):

1. Κόπρανα από το έδαφος : Δεν παρατηρήθηκαν οξεάντοχοι βάκιλοι.
2. Ελαφρά διαρροϊκά κόπρανα : Παρατηρήθηκαν οξεάντοχοι βάκιλοι.
3. Διαρροϊκά κόπρανα : Παρατηρήθηκαν οξεάντοχοι βάκιλοι.
4. Κόπρανα αίγας : Δεν παρατηρήθηκαν οξεάντοχοι βάκιλοι.
5. Κόπρανα αίγας : Δεν παρατηρήθηκαν οξεάντοχοι βάκιλοι.

Τα δείγματα κοπράνων τοποθετήθηκαν σε κατάψυξη στους -70°C . Στη συνέχεια θα ακολουθήσει καλλιέργεια των δειγμάτων για απομόνωση του *M. avium* subsp. *paratuberculosis*.

Εκτροφή Ζ.

Τον Ιανουάριο του 2008, επισκεφθήκαμε την εκτροφή αιγών του κτηνοτρόφου Τ.Α. στην Τένεδο (περιοχή Τρίγλιας) Χαλκιδικής. Η εκτροφή αποτελούνταν από 800 αίγες, εγχώριας φυλής. Η εκτροφή ήταν προσβεβλημένη από παραφυματίωση. Τα πρώτα κρούσματα είχαν εμφανιστεί το Α' εξάμηνο του 2005. Τον Οκτώβριο του 2005, έγινε εργαστηριακή διάγνωση. Παρατηρήθηκε πληθώρα οξεάντοχων βακίλων σε δείγμα εντέρου.

Μετά τη διάγνωση εφαρμόστηκε πρόγραμμα εμβολιασμού. Εμβολιάστηκαν τα μικρά που κρατήθηκαν για αναπαραγωγή και κάθε χρόνο εμβολιάζονται τα μικρά με το νεκρό εμβόλιο "Gudair" κατά της παραφυματίωσης, που κυκλοφορεί στο εμπόριο. Κατά τη διάρκεια της επίσκεψης μας έγινε σύσταση να εμβολιαστούν και τα μεγάλα. Σύμφωνα με την εκτίμηση του κτηνοτρόφου, το εμβόλιο είχε ικανοποιητικά αποτελέσματα.

Παράλληλα, ο κτηνοτρόφος απομάκρυνε από την εκτροφή τα καχεκτικά ζώα και αυτά που είχαν διαλείπουσα διάρροια. Έγιναν απολυμάνσεις και απομάκρυνση της κόπρου.

Το ποσοστό των ζώων που νοσούσαν κατά έτος ήταν 15-20% και το ποσοστό θανάτων ήταν 14-15%. Ηλικία θανάτου ήταν 3-4 ετών.

Το σιτηρέσιο αποτελείτο από σιτάρι, καλαμπόκι και βαμβακόπιτα.

Σύμφωνα με την εκτίμηση του παραγωγού, το ποσοστό μείωσης της γαλακτοπαραγωγής κυμαινόταν από 10-15%. Πρόβλημα μαστίτιδων δεν παρουσιάστηκε.

Έγινε νεκροψία σε γίδα 6 ετών με συμπτώματα παραφυματίωσης, διάρροια και καχεξία. Παθολογοανατομικά, παρατηρήθηκε πάχυνση και πτύχωση του εντέρου και διόγκωση-οίδημα στα μεσεντέρια λεμφογάγγλια.

Πριν τη θανάτωση έγινε δειγματοληψία κοπράνων. Στη συνέχεια πάρθηκαν δείγματα από το έντερο και το μεσεντέριο λεμφογάγγλιο. Τέλος έγιναν δειγματοληψίες κοπράνων και από 3 άλλες αίγες, με καχεξία και διαλείπουσα διάρροια.

Δείγματα :

1. Έντερο.
2. Μεσεντέριο λεμφογάγγλιο.
3. Κόπρανα από την αίγα που θανατώθηκε.
4. Κόπρανα διαρροϊκά από αίγα 5 ετών (αδύνατη).
5. Κόπρανα ελάχιστα διαρροϊκά από αίγα >3 ετών (αδύνατη).
6. Κόπρανα κανονικά από αίγα 5-6 ετών (αδύνατη).
7. Κόπρανα ελάχιστα διαρροϊκά από αίγα 5-6 ετών (την προηγούμενη μέρα παρουσίασε έντονη διάρροια).

Αποτελέσματα μικροσκοπικής εξέτασης :

1. Δείγμα εντέρου : Παρατηρήθηκε πληθώρα οξεάντοχων βακίλων.
2. Δείγμα μεσεντερίου λεμφογαγγλίου : Παρατηρήθηκαν άφθονοι οξεάντοχοι βάκιλοι.
3. Κόπρανα αίγας που θανατώθηκε : Παρατηρήθηκαν οξεάντοχοι βάκιλοι.
4. Κόπρανα διαρροϊκά, αίγας 5 ετών : Δεν παρατηρήθηκαν οξεάντοχοι βάκιλοι.
5. Κόπρανα ελάχιστα διαρροϊκά, αίγας >3 ετών : Δεν παρατηρήθηκαν οξεάντοχοι βάκιλοι.
6. Κόπρανα κανονικά, αίγας 5-6 ετών : Δεν παρατηρήθηκαν οξεάντοχοι βάκιλοι.
7. Κόπρανα ελάχιστα διαρροϊκά, αίγας 5-6 ετών : Δεν παρατηρήθηκαν οξεάντοχοι βάκιλοι.

Τα δείγματα εντέρου, μεσεντερίου λεμφογαγγλίου και κοπράνων, τοποθετήθηκαν σε κατάψυξη, στους -70°C . Θα ακολουθήσει καλλιέργεια των δειγμάτων για απομόνωση του *M. avium* subsp. *paratuberculosis*.

Εκτροφή Η.

Τον Ιανουάριο του 2008, επισκεφθήκαμε την εκτροφή προβάτων του κτηνοτρόφου Β.Α. στην περιοχή Τενέδου Χαλκιδικής (Αγροτικό Κτηνιατρείο Ν. Τρίγλιας). Η εκτροφή αποτελούνταν από 360 πρόβατα εγχώριας φυλής.

Αρχές Ιανουαρίου του 2008, είχε διαπιστωθεί εργαστηριακά παραφυματίωση σε πρόβατα της εκτροφής. Τα πρώτα κλινικά συμπτώματα είχαν εμφανιστεί τον Απρίλιο του 2007.

Το ποσοστό ζώων που νοσούσαν κατά έτος ήταν 6% και το ποσοστό θανάτων 6%. Η ηλικία θανάτων ήταν 4-5 ετών.

Έγινε σύσταση στον κτηνοτρόφο να εμβολιάζει τα αρνάκια που θα κρατάει για αναπαραγωγή κάθε χρόνο, με το νεκρό εμβόλιο "Gudair" κατά της παραφυματίωσης σύμφωνα με τις οδηγίες παρασκευής της εταιρείας. Παράλληλα θα εμβολιαστούν μια φορά και τα μεγάλα.

Ακόμη δόθηκαν οδηγίες να απομακρυνθούν από την εκτροφή τα καχεκτικά ζώα και αυτά που είχαν διαλείπουσα διάρροια και τέλος να γίνει απομάκρυνση της κόπρου και απολυμάνσεις.

Σύμφωνα με την εκτίμηση του παραγωγού, το ποσοστό μείωσης της γαλακτοπαραγωγής κυμαινόταν από 10-17%. Παράλληλα, παρατηρήθηκε μείωση στην αναπαραγωγή. Πρόβλημα μαστίτιδων δεν παρουσιάστηκε. Παρουσιάστηκε παρασίτωση στα ζώα. Έγινε θεραπεία παρασιτώσεων.

Έγιναν δειγματοληψίες κοπράνων, από 3 πρόβατα και 7 δείγματα κοπράνων από το έδαφος. Τα 2 πρόβατα ήταν αδύνατα και η 3^η προβατίνα ήταν σε κατάσταση εγκυμοσύνης, χωρίς κλινικά συμπτώματα παραφυματίωσης. Τα 7 δείγματα κοπράνων που πάρθηκαν από το έδαφος ήταν όλα διαρροϊκά (πολτώδη).

Αποτελέσματα μικροσκοπικής εξέτασης Ζ.Ν. :

1. Κόπρανα από το έδαφος, διαρροϊκά : Παρατηρήθηκαν οξεάντοχοι βάκιλοι.
2. Κόπρανα από προβατίνα (έγκυος): Δεν παρατηρήθηκαν οξεάντοχοι βάκιλοι.
3. Κόπρανα από πρόβατο : Δεν παρατηρήθηκαν οξεάντοχοι βάκιλοι.
4. Κόπρανα από πρόβατο : Δεν παρατηρήθηκαν οξεάντοχοι βάκιλοι.
5. Κόπρανα από το έδαφος, διαρροϊκά : Δεν παρατηρήθηκαν οξεάντοχοι βάκιλοι.
6. Κόπρανα από το έδαφος, διαρροϊκά : Δεν παρατηρήθηκαν οξεάντοχοι βάκιλοι.
7. Κόπρανα από το έδαφος, διαρροϊκά : Παρατηρήθηκαν οξεάντοχοι βάκιλοι.
8. Κόπρανα από το έδαφος, διαρροϊκά : Παρατηρήθηκαν οξεάντοχοι βάκιλοι.
9. Κόπρανα από το έδαφος, διαρροϊκά : Παρατηρήθηκαν οξεάντοχοι βάκιλοι.
10. Κόπρανα από το έδαφος, διαρροϊκά : Δεν παρατηρήθηκαν οξεάντοχοι βάκιλοι.

Όλα τα δείγματα κοπράνων τοποθετήθηκαν σε κατάψυξη, στους -70°C . Στη συνέχεια θα ακολουθήσει καλλιέργεια των δειγμάτων για απομόνωση του *M. avium* subsp. *paratuberculosis*.

Εκτροφή Θ.

Το Φεβρουάριο του 2008, επισκεφθήκαμε την εκτροφή αιγών και προβάτων του κτηνοτρόφου Π.Α. στην Τένεδο Χαλκιδικής (Α. Κ. Τρίγλιας). Η εκτροφή αποτελούνταν από 140 αίγες και 80 πρόβατα εγχώριας φυλής.

Είχε διαγνωστεί εργαστηριακά η παραφυματίωση πριν από 6-7 χρόνια. Εμβολίασε για 3 χρόνια τα μικρά που κρατούσε για αναπαραγωγή και στη συνέχεια σταμάτησε να εμβολιάζει.

Τα 2007, παρουσιάστηκαν και πάλι ζώα με συμπτώματα παραφυματίωσης, διαλείπουσα διάρροια, καχεξία και θάνατοι. Τα συμπτώματα παραφυματίωσης εμφανίστηκαν μόνο στις αίγες. Τα πρόβατα δεν παρουσίασαν συμπτώματα.

Για 3 χρόνια εμβολίαζε τα μικρά που κρατούσε για αναπαραγωγή, με το ζωντανό εμβόλιο 316F κατά της παραφυματίωσης, που παρασκευαζόταν στο ΙΛΠΑΝ Θεσσαλονίκης.

Από το 2007, το ποσοστό των ζώων που νοσούσαν κατά έτος ήταν 15% και το ποσοστό θανάτων 14%.

Το σιτηρέσιο περιείχε καλαμπόκι, κριθάρι και φύραμα.

Σύμφωνα με την εκτίμηση του παραγωγού, το ποσοστό μείωσης της γαλακτοπαραγωγής κυμαινόταν από 20-25%. Σποραδικά παρουσιάζονταν κρούσματα μαστίτιδων.

Έγιναν δειγματοληψίες :

1. Κόπρανα αίγας 1 έτους, με διάρροια και καχεξία.
2. Δείγματα εντέρου και μεσεντέριου λεμφογαγγλίου, της παραπάνω αίγας μετά από θανάτωση της.
3. Κόπρανα αίγας, χωρίς συμπτώματα παραφυματίωσης.
4. Κόπρανα αίγας, χωρίς συμπτώματα παραφυματίωσης.
5. Κόπρανα αίγας, χωρίς συμπτώματα παραφυματίωσης.
6. Κόπρανα αίγας, χωρίς συμπτώματα παραφυματίωσης.
7. Κόπρανα αίγας, χωρίς συμπτώματα παραφυματίωσης.

Αποτελέσματα μικροσκοπικής εξέτασης Z.N. :

1. Δεν παρατηρήθηκαν οξεάντοχοι βάκιλοι.
2. Δεν παρατηρήθηκαν οξεάντοχοι βάκιλοι.
3. Δεν παρατηρήθηκαν οξεάντοχοι βάκιλοι.
4. Δεν παρατηρήθηκαν οξεάντοχοι βάκιλοι.
5. Δεν παρατηρήθηκαν οξεάντοχοι βάκιλοι.
6. Δεν παρατηρήθηκαν οξεάντοχοι βάκιλοι.
7. Δεν παρατηρήθηκαν οξεάντοχοι βάκιλοι.

Τα δείγματα κοπράνων, μεσεντερίου λεμφογαγγλίου και εντέρου τοποθετήθηκαν σε κατάψυξη, στους -70°C . Θα ακολουθήσει καλλιέργεια όλων των δειγμάτων, με σκοπό την απομόνωση του *M. avium* subsp. *paratuberculosis*.

Εκτροφή I.

Το Μάρτιο του 2008, επισκεφθήκαμε την εκτροφή αιγών του κτηνοτρόφου Μ.Ν., στην περιοχή Χορτιάτη Θεσσαλονίκης. Η εκτροφή αποτελούνταν από 834 αίγες, εγχώριας φυλής.

Στα μέσα του 2005, είχε διαπιστωθεί εργαστηριακά παραφυματίωση σε αίγα της εκτροφής, σε δείγματα εντέρου και μεσεντερίου λεμφογαγγλίου. Είχε παρατηρηθεί πληθώρα οξεάντοχων βακίλων.

Μετά τη διάγνωση, ο κτηνοτρόφος εμβολίασε όλα τα ζώα και τα μικρά που κρατούσε για αναπαραγωγή. Χρησιμοποιήθηκε το νεκρό εμβόλιο "Gudair" της παραφυματίωσης που κυκλοφορεί στο εμπόριο. Παράλληλα, έγινε απομάκρυνση της κόπρου και απολυμάνσεις.

Στη συνέχεια δεν κράτησε ζώα για αναπαραγωγή. Το 2007 κράτησε, αλλά δεν τα εμβολίασε. Του έγινε σύσταση να εμβολιάσει τα ζώα που κράτησε για αναπαραγωγή το 2007 και αυτά που θα κρατούσε το 2008.

Σύμφωνα με την εκτίμηση του κτηνοτρόφου, το εμβόλιο είχε ικανοποιητικά αποτελέσματα. Παρατηρήθηκε ύφεση των κλινικών συμπτωμάτων και μείωση του ποσοστού θανάτων κατά 75% (κατά την εκτίμηση του παραγωγού 1 ζώο το μήνα πέθαινε το 2005 και μετά τον εμβολιασμό 4 ζώα τον χρόνο).

Το σιτηρέσιο αποτελείτο από καλαμπόκι και φύραμα δε ίσες ποσότητες.
Πρόβλημα μαστίτιδων δεν παρουσιάστηκε. Δεν αναφέρθηκαν άλλα προβλήματα λοιμωδών νοσημάτων. Δεν παρατηρήθηκε μείωση της γαλακτοπαραγωγής.

Έγιναν δειγματοληψίες κοπράνων :

1. Δείγματα κοπράνων από αίγα 4 ετών, χωρίς διάρροια.
2. Δείγματα κοπράνων από αίγα 5 ετών, χωρίς διάρροια.
3. Δείγματα κοπράνων από αίγα που παρουσίασε διάρροια τα Χριστούγεννα και μετά σταμάτησε.
4. Κόπρανα από το έδαφος.

Αποτελέσματα μικροσκοπικής εξέτασης Ζ.Ν. :

1. Δεν παρατηρήθηκαν οξεάντοχοι βάκιλοι.
2. Δεν παρατηρήθηκαν οξεάντοχοι βάκιλοι.
3. Δεν παρατηρήθηκαν οξεάντοχοι βάκιλοι.
4. Δεν παρατηρήθηκαν οξεάντοχοι βάκιλοι.

Πίνακας 3. Αποτελέσματα μικροσκοπικής εξέτασης (χρώση Ziehl-Neelsen.).

ΕΚΤΡΟΦΕΣ	ΔΕΙΓΜΑΤΑ	ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΟΞΕΑΝΤΟΧΩΝ ΒΑΚΙΛΙΩΝ
A	Κ.Πρ.(χ.Δ.) Κ.Πρ.(χ.Δ.) Κ.Πρ.(χ.Δ.) Κ.Πρ.(χ.Δ.) Κ.Πρ.(με Δ.)	+ - - + +
B	Κ.Αιγ.(ελ.Δ.) Κ.Πρ. (χ.Δ.) Κ.Πρ.(χ.Δ.) Κ.Αιγ.(χ.Δ.) Κ.Αιγ.(χ.Δ.) Κ.Πρ.(χ.Δ.) Κ.Εδ. Κ.Εδ.	+ - - - - - - -
Γ	Λεπ.Εντ.Αιγ. Εντ.Αιγ(δίπλα Ελ.Βαλβ.) Μεσ.Λεμφ.Αιγ. Κ.Αιγ. Κ.Αιγ. Κ.Αιγ. Κ.Εδ.	- - - - - - -
Δ	Κ.Κρ.(με Δ.) Κ.Κρ.(χ.Δ.) Κ.Πρ.(με Δ.) Κ.Πρ.(χ.Δ.) Κ.Εδ. Κ.Εδ. Κ.Εδ. Κ.Εδ.	- - - - + - - -
E	Κ.Εδ. Κ.Αιγ.(Ελ.Δ.) Κ.Αιγ.(με Δ.) Κ.Αιγ.(χ.Δ.) Κ.Αιγ.(χ.Δ.)	- + + - -
Z	Εντ.Αιγ. Μεσ.Λεμφ.Αιγ. Κ.Αιγ.(με Δ.) Κ.Αιγ.(με Δ.) Κ.Αιγ.(Ελ.Δ.) Κ.Αιγ.(χ.Δ.) Κ.Αιγ.(Ελ.Δ.)	+ + + - - - -
H	Κ.Εδ. Κ.Πρ.(χ.Δ.) Κ.Πρ.(χ.Δ.) Κ.Πρ.(χ.Δ.) Κ.Εδ.	+ - - - -

Η (συνέχεια)	Κ.Εδ.	-
	Κ.Εδ.	+
	Κ.Εδ.	+
	Κ.Εδ.	+
	Κ.Εδ.	-
Θ	Κ.Αιγ.(με Δ.)	-
	Εντ.Αιγ.	-
	Μεσ.Λεμφ.Αιγ.	-
	Κ.Αιγ.(χ.Δ.)	-
	Κ.Αιγ.(χ.Δ.)	-
	Κ.Αιγ.(χ.Δ.)	-
	Κ.Αιγ.(χ.Δ.)	-
Ι	Κ.Αιγ.(χ.Δ.)	-
	Κ.Αιγ.(χ.Δ.)	-
	Κ.Αιγ. (με Δ.)	-
	Κ.Εδ.	-

(συνέχεια πίνακα 3).

Τέλος, εκτός από τις δειγματοληψίες που έγιναν στις παραπάνω εκτροφές, εξετάστηκαν και κάποια δείγματα που προϋπήρχαν στο εργαστήριό μας.

5. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ

Μετά τη μικροσκόπηση στα δείγματα κοπράνων, εντέρων και μεσεντερίων λεμφογαγγλίων έγινε ομογενοποίηση και κάθαρση (Decontamination) με 1,5% HPC.

Στη συνέχεια (μετά το πέρας μιας ημέρας, από τη στιγμή που έχει υποστεί κάθαρση, το κάθε δείγμα), μετά από φυγοκέντρηση στις 3800 στροφές για 30 min., έγινε ενοφθαλμισμός των δειγμάτων στα παρακάτω θρεπτικά υποστρώματα :

1. Herrold's egg yolk medium (Herrold's)
2. Middlebrook 7H11 agar (M7H11)
3. Lowenstein-Jensen (L.J.)

Τέλος τα δείγματα μας τοποθετήθηκαν στον κλίβανο επώασης, στους 37°C και για 2-3 μήνες μέχρι την εμφάνιση ή και όχι αποικιών.

Τα δείγματα στον επωαστικό κλίβανο, παρακολουθούνται κάθε εβδομάδα για την εμφάνιση αποικιών.

6. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

6α. Αποτελέσματα σε δείγματα αιγών.

Αποτελέσματα από καλλιέργειες δειγμάτων εντέρου, κοπράνων και μεσεντερίου λεμφογαγγλίου αιγών, στο θρεπτικό υπόστρωμα **Herrold's egg yolk medium**.

Πίνακας 4.

ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ (+)			
Δείγματα αιγών	Αριθμός δειγμάτων	Herrold's	%
Έντερο	4	+ (2/4)	50
Μεσεντέριο Λεμφογάγγλιο	4	+ (1/4)	25
Κόπρανα	18	+ (2/18)	11,11

Αποτελέσματα από καλλιέργειες δειγμάτων εντέρου, μεσεντερίου λεμφογαγγλίου και κοπράνων αιγών, στο θρεπτικό υπόστρωμα **Middlebrook 7H11 agar**.

Πίνακας 5.

ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ (+)			
Δείγματα αιγών	Αριθμός δειγμάτων	M7H11	%
Έντερο	4	+ (3/4)	75
Μεσεντέριο Λεμφογάγγλιο	4	+ (1/4)	25
Κόπρανα	18	+ (3/18)	16,66

Αποτελέσματα από καλλιέργειες δειγμάτων εντέρου, μεσεντερίου λεμφογαγγλίου και κοπράνων αιγών, στο θρεπτικό υπόστρωμα **Lowenstein-Jensen**.

Πίνακας 6.

ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ (+)			
Δείγματα αιγών	Αριθμός δειγμάτων	L.J	%
Έντερο	4	+ (2/4)	50
Μεσεντέριο Λεμφογάγγλιο	4	+ (1/4)	25
Κόπρανα	18	+ (3/18)	16,66

6β. Αποτελέσματα σε δείγματα προβάτων

Αποτελέσματα από καλλιέργειες δειγμάτων κοπράνων, εντέρου και μεσεντερίου λεμφογαγγλίου προβάτων, σε θρεπτικό υπόστρωμα **Herrold's egg yolk medium**.

Πίνακας 7.

ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ (+)			
Δείγματα Προβάτων	Αριθμός Δειγμάτων	Herrold's	%
Έντερο	3	-	0
Μεσεντέριο Λεμφογάγγλιο	1	-	0
Κόπρανα	12	+ (1/12)	8,33

Αποτελέσματα από καλλιέργειες δειγμάτων εντέρου, μεσεντερίου λεμφογαγγλίου και κοπράνων προβάτων, σε θρεπτικό υπόστρωμα **Middlebrook 7H11 agar**.

Πίνακας 8.

ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ (+)			
Δείγματα Προβάτων	Αριθμός Δειγμάτων	M7H11	%
Έντερο	3	+ (3/3)	100
Μεσεντέριο Λεμφογάγγλιο	1	+ (1/1)	100
Κόπρανα	12	+ (8/12)	66,66

Αποτελέσματα από καλλιέργειες δειγμάτων εντέρου, μεσεντερίου λεμφογαγγλίου και κοπράνων προβάτων, σε θρεπτικό υπόστρωμα **Lowenstein-Jensen**.

Πίνακας 9.

ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ (+)			
Δείγματα Προβάτων	Αριθμός Δειγμάτων	L.J	%
Έντερο	3	+ (2/3)	66,66
Μεσεντέριο Λεμφογάγγλιο	1	-	0
Κόπρανα	12	+ (1/12)	8,33

6.γ Αποτελέσματα σε δείγματα από το έδαφος

Αποτελέσματα από καλλιέργειες δειγμάτων κοπράνων από το έδαφος, σε θρεπτικό υπόστρωμα **Herrold's egg yolk medium**.

Πίνακας 10.

ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ (+)			
Δείγματα Κοπράνων Εδάφους	Αριθμός Δειγμάτων	Herrold's	%
Αίγες	13	-	0
Πρόβατα	11	+ (1/11)	9,09
Μικτές Εκτροφές	8	-	0

Αποτελέσματα από καλλιέργειες δειγμάτων κοπράνων από το έδαφος, σε θρεπτικό υπόστρωμα **Middlebrook 7H11 agar**.

Πίνακας 11.

ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ (+)			
Δείγματα Κοπράνων Εδάφους	Αριθμός Δειγμάτων	M7H11	%
Αίγες	13	+ (2/13)	15,38
Πρόβατα	11	+ (1/11)	9,09
Μικτές Εκτροφές	8	+ (2/8)	25

Αποτελέσματα από καλλιέργειες δειγμάτων κοπράνων από το έδαφος, σε θρεπτικό υπόστρωμα **Lowenstein-Jensen**.

Πίνακας 12.

ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ (+)			
Δείγματα Κοπράνων Εδάφους	Αριθμός Δειγμάτων	L.J	%
Αίγες	13	+ (1/13)	7,69
Πρόβατα	11	-	0
Μικτές Εκτροφές	8	-	0

7. ΧΡΟΝΟΣ ΕΠΩΑΣΗΣ ΣΤΕΛΕΧΩΝ *Map.*

Το *M. paratuberculosis* αναπτύσσεται πολύ αργά στους 37°C. Οι πρώτες αποικίες εμφανίζονται από την 5^η έως την 14^η εβδομάδα, μετά τον ενοφθαλμισμό.

Πίνακας 13. Χρόνος επώασης στελεχών *Map.*

Είδη εκτροφών	Χρόνος επώασης σε μήνες	Αριθμός στελεχών	%
Αίγες	1,5 ≤ x ≤ 2	10	76,9
	2 ≤ x ≤ 3	3	23,07
Πρόβατα	1,5 ≤ x ≤ 2	7	77,77
	2 < x < 3	2	22,22
Μικτές Εκτροφές	1,5 ≤ x ≤ 2	-	0
	2 < x < 3	2	100

8. ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ ΑΠΟΙΚΙΩΝ

Το μέγεθος, το χρώμα, η υφή και η σύσταση μίας αποικίας *M. paratuberculosis* εξαρτάται κατά ένα μεγάλο ποσοστό από τον τύπο του υποστρώματος στο οποίο καλλιεργείται.

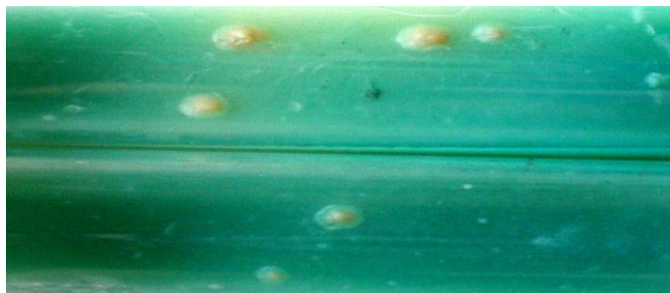
Το μέγεθος της αποικίας αρχικά είναι μικροσκοπικό. Μπορεί να παραμείνει 0,25-1mm και να εξακολουθούν οι αποικίες να παραμένουν μικρές, όταν είναι πολλές.

Τα περιθώρια της αποικίας είναι στρογγυλά και άχρωμα και η επιφάνειά τους λεία και γυαλιστερή.

Οι αποικίες γίνονται μεγαλύτερες, μπορεί να φθάσουν και τα 2mm και κατά περίπτωση ξεχωρίζουν από την επιφάνεια του υποστρώματος. Είναι θαμπές και το χρώμα τους αποκτά αποχρώσεις του κίτρινου και του μπέζ, όσο η επώαση προχωράει.

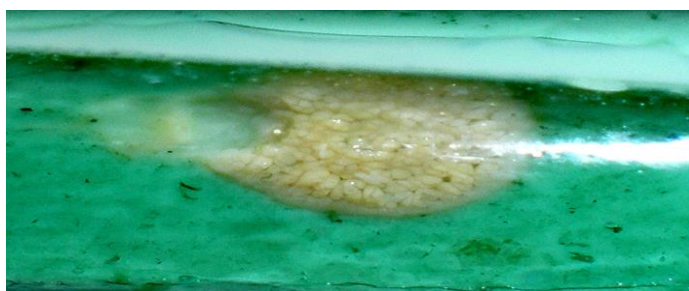
Η μορφολογία της αποικίας μεταβάλλεται με τον χρόνο επώασης μέσα στον κλίβανο.

Στο υπόστρωμα *Herrold's egg yolk medium*, οι αποικίες εμφανίζονται μικρές, κάπως ανώμαλες στην όψη και με ρυτιδώδη μορφή. Το σχήμα τους ποικίλει (ραβδοειδές, σφαιρικό, ημισφαιρικό κ.α.). Pigmented χρωμογόνα κίτρινα στελέχη έχουν αναφερθεί και στα πρόβατα. Οι αποικίες εμφανίζονται συνήθως μεμονωμένα κατά τόπους ή μπορεί να καταλαμβάνουν και όλη την επιφάνεια του υποστρώματος.



Στο υπόστρωμα *Lowenstein-Jensen*, οι αποικίες εμφανίζονται ρυτιδώδεις, με σχήμα σφαιρικό ή ημισφαιρικό, είναι ευδιάκριτες και το χρώμα τους είναι κυρίως άσπρο προς το κιτρινωπό. Εμφανίζονται συνήθως μεμονωμένα και με μικρή ανάπτυξη στην επιφάνεια του υποστρώματος.

Το μέγεθος τους είναι αρκετά μεγάλο, σε σύγκριση με τα άλλα υποστρώματα.



Στο υπόστρωμα *Middlebrook 7H11+Medium*, χωρίς Tween 80 οι αποικίες είναι πολύ ανώμαλες στην εμφάνιση και μοιάζουν με εκείνες του *M. tuberculosis*.

Με προσθήκη Tween 80, η ανάπτυξη αυξάνεται, οι αποικίες εμφανίζονται λείες, γυαλιστερές και διαφανείς. Έχουν διάφορα σχήματα, αλλά συνήθως εμφανίζονται σφαιρικές. Μοιάζουν με αποικίες του *M. avium*.

Μπορεί να παρατηρηθούν μεμονωμένα, σε ομάδες ή και σε όλη την επιφάνεια του υποστρώματος. Το μέγεθος αυτών των αποικιών συνήθως είναι μικροσκοπικό.



9. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Κατά τη διάρκεια της έρευνάς μας έγιναν οι παρακάτω εργασίες :

Μικροσκοπική εξέταση των δειγμάτων μας με χρώση Ζ.Ν.

Τα αποτελέσματα αυτής της εξέτασης είναι τα ακόλουθα :

<u>Δείγματα εντέρου : 7</u>	<u>Θετικά : 3</u>	<u>Ποσοστό (%) : 42,8</u>
<u>Δείγματα Μ.Λ : 5</u>	<u>Θετικά : 1</u>	<u>Ποσοστό (%) : 20</u>
<u>Δείγματα Κ.Αιγ. : 18</u>	<u>Θετικά : 6</u>	<u>Ποσοστό (%) : 33,33</u>
<u>Δείγματα Κ.Πρ. : 12</u>	<u>Θετικά : 7</u>	<u>Ποσοστό (%) : 58,33</u>

Σύμφωνα με βιβλιογραφικά δεδομένα, στις αίγες τα αποτελέσματα στα δείγματα εντέρου είναι αρκετά ικανοποιητικά, αντίθετα τα αποτελέσματα κοπράνων δεν είναι τα αναμενόμενα, λόγω του ότι το μυκοβακτήριο απομονώνεται ευκολότερα στα ζώα αυτά.

Στα πρόβατα τα αποτελέσματα στα δείγματα εντέρου είναι και αυτά πολύ ικανοποιητικά, όπως επίσης ικανοποιητικά (ανωτέρω των προσδοκιών μας), είναι και τα αποτελέσματα στα δείγματα κοπράνων.

Η απομόνωση του *Map* είναι αρκετά δύσκολη από δείγματα κοπράνων. Αυτό οφείλεται κυρίως, στην διαλείπουσα απέκκρισή του.

Για να είναι μια καλλιέργεια θετική θα πρέπει 1gr κοπράνων να περιέχει τουλάχιστον 100 μυκοβακτήρια.

Τα αιγοπρόβατα σε σχέση με τα βοοειδή απεκκρίνουν μικρότερο αριθμό μυκοβακτηρίων.

Συντήρηση των δειγμάτων, σε κατάψυξη, στους -70°C.

Έρευνα για την εκτίμηση της συντήρησης των δειγμάτων σε αυτή τη θερμοκρασία και για 4 μήνες, απέδειξε ότι παρατηρείται ελάχιστη απώλεια στον αριθμό των μικροοργανισμών. Ενώ μετά από 6 μήνες στην ίδια θερμοκρασία, παρατηρείται μια ελαφριά πτώση των μυκοβακτηρίων κατά 20%.

Decontamination, με HPC 1%.

Ιδιαίτερη προσοχή θα πρέπει να δίνεται στη χρήση των απολυμαντικών. Πολλά απολυμαντικά γίνονται βακτηριοκτόνα για το *Map* σε υψηλές συγκεντρώσεις ή σε περίπτωση που τα παθολογικά υλικά παραμείνουν για μεγάλο χρονικό διάστημα στο απολυμαντικό.

Ενοφθαλμισμός σε θρεπτικά υποστρώματα.

Τα θρεπτικά υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα ακόλουθα :

1. Herrold's egg yolk medium με μυκοπλακτίνη j.
2. Middlebrook 7H11+Medium.
3. Lowenstein-Jensen με λέκιθο αυγού και μυκοπλακτίνη.

Απομόνωση.

Τα αποτελέσματα της καλλιέργειας είναι τα ακόλουθα :

<u>Δείγματα εντ.αιγών : 4</u>	<u>Απομονώθηκαν : 3</u>	<u>Ποσοστό (%) : 75</u>
<u>Δείγματα Μ.Λ. αιγών : 3</u>	<u>Απομονώθηκαν : 1</u>	<u>Ποσοστό (%) : 33,33</u>
<u>Δείγματα Κοπρ.αιγών : 18</u>	<u>Απομονώθηκαν : 8</u>	<u>Ποσοστό (%) : 44,44</u>
<u>Δείγματα εντ.προβάτων : 3</u>	<u>Απομονώθηκαν : 3</u>	<u>Ποσοστό (%) : 100</u>
<u>Δείγματα Μ.Λ.προβάτων : 1</u>	<u>Απομονώθηκαν : 1</u>	<u>Ποσοστό (%) : 100</u>
<u>Δείγματα Κοπρ.προβάτων : 12</u>	<u>Απομονώθηκαν : 10</u>	<u>Ποσοστό (%) : 83,3</u>
<u>Δείγματα Κοπρ.Εδ. : 32</u>	<u>Απομονώθηκαν : 11</u>	<u>Ποσοστό (%) : 34,3</u>

10. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Με γνώμονα τα αποτελέσματα της έρευνας συμπεραίνουμε τα εξής :

1. Για την μικροσκοπική εξέταση με χρώση Ziehl-Neelsen.

Η μέθοδος αυτή δεν είναι ιδιαίτερα αξιόπιστη. Στις περισσότερες περιπτώσεις μας δίνει αρνητικά αποτελέσματα, ενώ κατά την απομόνωση τα αποτελέσματα στα ίδια δείγματα είναι θετικά.

2. Για την απομόνωση στελεχών *M. paratuberculosis*.

Η απομόνωση των στελεχών *M. paratuberculosis* είναι μία χρονοβόρα και δύσκολη διαδικασία. Παρόλαυτά όμως, μέχρι σήμερα είναι η πιο αξιόπιστη μέθοδος διάγνωσης της Παραφυματίωσης.

3. Για τα θρεπτικά υποστρώματα

Στην έρευνά μας χρησιμοποιήθηκαν τα θρεπτικά υποστρώματα : Middlebrook 7H11+Medium, Lowenstein-Jensen με λέκιθο αυγού και μυκομπακτίνη και Herrold's egg yolk medium με μυκομπακτίνη j.

Το καλλιεργητικό υπόστρωμα που μας έδωσε τα πιο ικανοποιητικά αποτελέσματα ήταν το Middlebrook 7H11+Medium. Αυτό προφανώς οφείλεται στο γεγονός ότι το υπόστρωμα αυτό, είναι περισσότερο εμπλουτισμένο από τα άλλα δύο.

Δεύτερο στην κατάταξη αξιολόγησης έρχεται το θρεπτικό υπόστρωμα Herrold's egg yolk medium με μυκομπακτίνη j. Το οποίο δε μας έδωσε ιδιαίτερα ικανοποιητικά αποτελέσματα. Η ανάπτυξη ήταν μέτρια.

Τελευταίο στην κατάταξή μας έρχεται το θρεπτικό υπόστρωμα Lowenstein-Jensen, τα αποτελέσματα του οποίου δεν ήταν καθόλου ικανοποιητικά. Στο υπόστρωμα αυτό απομονώθηκαν κυρίως στελέχη από παθολογικό υλικό εντέρου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στόχος της έρευνάς μας ήταν η καλλιέργεια και μελέτη στελεχών *M. paratuberculosis* που απομονώθηκαν από αιγοπρόβατα.

Το παθολογικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε ήταν κόπρανα, έντερο και μεσεντερικό λεμφογάγγλιο. Συνολικά εξετάστηκαν 68 δείγματα κοπράνων, 7 δείγματα εντέρου και 4 δείγματα μεσεντερίου λεμφογαγγλίου.

Τα παραπάνω δείγματα συλλέχθηκαν από 9 εκτροφές, εκ των οποίων οι 3 ήταν εκτροφές προβάτων, οι 4 αιγών και οι 2 μικτές εκτροφές. Επίσης ένα ποσοστό των δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν προϋπήρχε στο εργαστήριο μας.

Αρχικά στα δείγματά μας εφαρμόστηκε η μέθοδος εργαστηριακής διάγνωσης με χρώση Ziehl-Neelsen για τον έλεγχο ύπαρξης μυκοβακτηρίων σε αυτά.

Στη συνέχεια ακολούθησε η απομόνωση των στελεχών και η καλλιέργειά τους στα θρεπτικά υποστρώματα Middlebrook 7H11+Medium, Lowenstein-Jensen με λέκιθο αυγού και μυκομπακτίνη και Herrold's egg yolk medium με μυκομπακτίνη j.

Τα αποτελέσματα της απομόνωσης είναι τα ακόλουθα :

- Από τα 4 δείγματα εντέρου αιγών, μυκοβακτήρια απομονώθηκαν από τα 3 (75%).
- Από τα 3 δείγματα μεσεντερίου λεμφογαγγλίου αιγών, μυκοβακτήρια απομονώθηκαν από το 1 (33,33%).
- Από τα 18 δείγματα κοπράνων αιγών, μυκοβακτήρια απομονώθηκαν από τα 8 (44,44%).
- Από τα 3 δείγματα εντέρου προβάτων, μυκοβακτήρια απομονώθηκαν από τα 3 (100%).
- Από το 1 δείγμα μεσεντερίου λεμφογαγγλίου προβάτων, μυκοβακτήρια απομονώθηκαν από το 1 (100%).
- Από τα 12 δείγματα κοπράνων προβάτων, μυκοβακτήρια απομονώθηκαν από τα 10 (83,3%).
- Από τα 32 δείγματα κοπράνων από το έδαφος, μυκοβακτήρια απομονώθηκαν από τα 11 (34,3%).

Τέλος, σε καθένα από τα 3 θρεπτικά υποστρώματα η ανάπτυξη των στελεχών είχε σημαντικές διαφορές στο σχήμα, το χρώμα και τη σύσταση των αποικιών, καθώς επίσης και στο ποσοστό ανάπτυξης τους.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΦΩΤΟΓΡΑΦΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ



Συσκευή ομογενοποίησης stomacher



Φυγόκεντρος



Φυγόκεντρος



Συσκευή ανάδευσης Vortex



Υδατόλουτρο



Ζυγός ακριβείας



Κλίβανος επώασης



Κλίβανος υγρής αποστείρωσης



Αποστειρωμένος χώρος επεξεργασίας υποστρωμάτων



Καταψύκτης (-70°C)



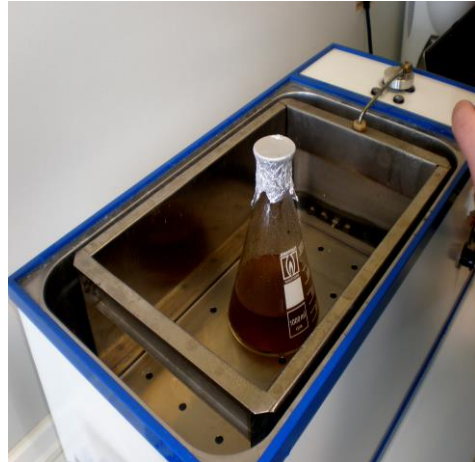
Αποστακτήρας



Σακούλες Stomacher



Διατήρηση υποστρώματος στους 56°C μέσα σε υδατόλουτρο



Διατήρηση υποστρώματος στους 56°C μέσα σε υδατόλουτρο



Προετοιμασία για την παρασκευή υποστρώματος Herrold's



Μυκομπακτίνη j



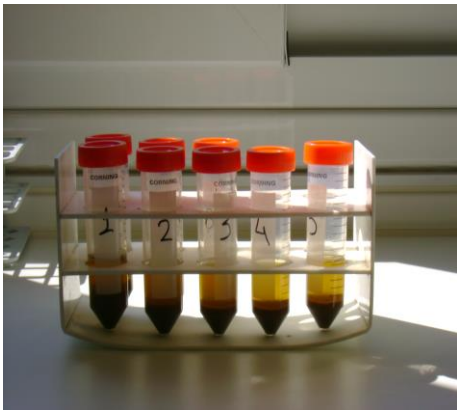
Παρασκευή υποστρώματος M7H11



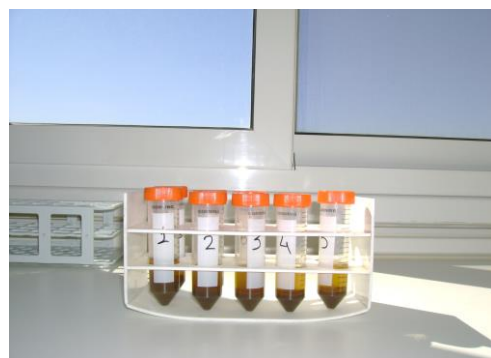
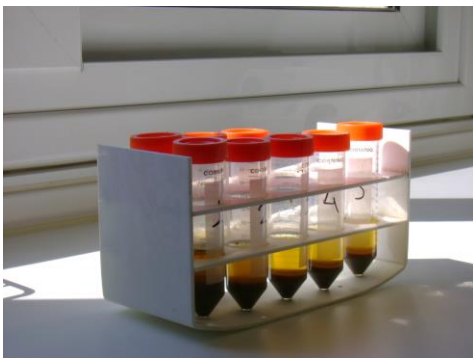
Ορός νεογέννητου μόσχου για την παρασκευή υποστρώματος M7H11



Χρώση Ζ.Ν.



Καθίζηση δειγμάτων κοπράνων, 24h μετά την προσθήκη HPC



Καθίζηση δειγμάτων κοπράνων, 24h μετά την προσθήκη HPC



Ενοφθαλμισμένα υποστρώματα



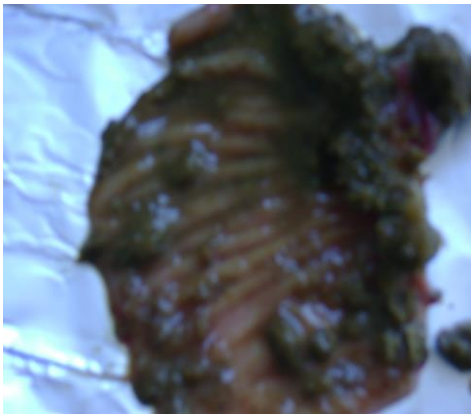
Ενοφθαλμισμένα υποστρώματα σε κλίβανο επώασης



Ενοφθαλμισμένα υποστρώματα σε κλίβανο επώασης



Ενοφθαλμισμένα υποστρώματα σε κλίβανο επώασης



Δείγμα μεσεντερίου λεμφογαγγλίου με πάχυνση και πτύχωση



Δείγμα μεσεντερίου λεμφογαγγλίου με πάχυνση και πτύχωση



Δείγμα εντέρου αίγας με πάχυνση και πτύχωση



Δείγμα εντέρου αίγας με πάχυνση και πτύχωση



Πτύχωση εντέρου βοοειδούς



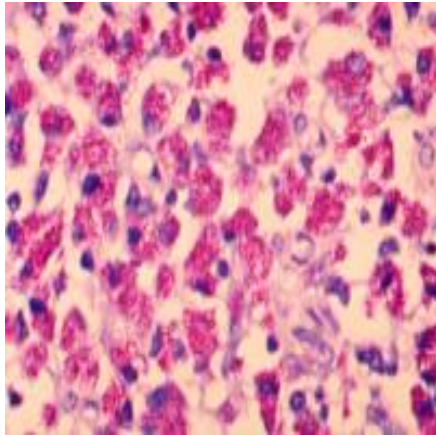
Έντερο βοοειδούς με πτύχωση, πριν την τομή και εξέτασή του για παραφυματίωση



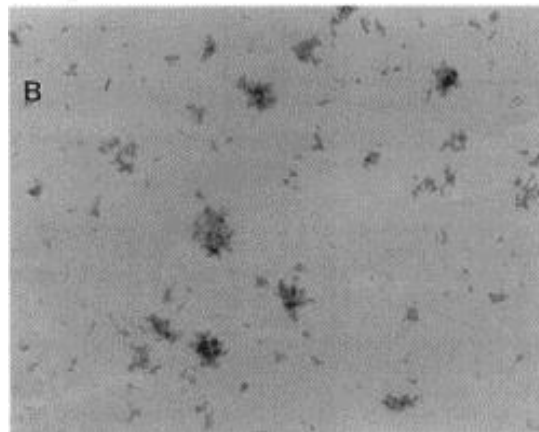
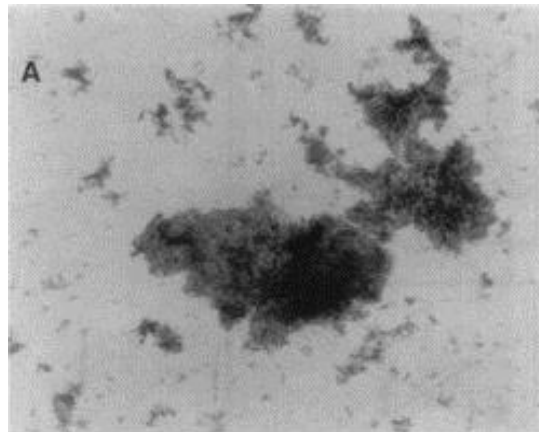
Πτύχωση εντέρων στις νόσους Crohn's και Johne's



Εικόνες από μικροσκόπιο στελεχών Map



Εικόνες από μικροσκόπιο στελεχών Μαρ



Εικόνες από μικροσκόπιο στελεχών Μαρ



Αγελάδα μολυσμένη από παραφυματίωση



Αγελάδα μολυσμένη από παραφυματίωση



Αγελάδα μολυσμένη από παραφυματίωση



Τάυρος μολυσμένος από παραφυματίωση



Βοοειδή μολυσμένα από παραφυματίωση



Αίγα μολυσμένη από παραφυματίωση



Αίγα μολυσμένη από παραφυματίωση



Πρόβατο μολυσμένο από παραφυματίωση



Ελάφι μολυσμένο από παραφυματίωση



Υπόστρωμα L.J. με ανάπτυξη αποικιών Μαρ 5 εβδομάδων



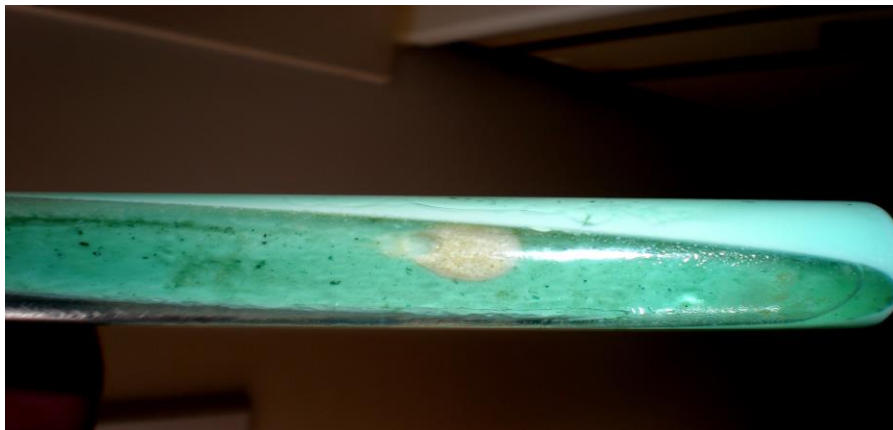
Υποστρώματα L.J. με ανάπτυξη αποικιών Μαρ 2 μηνών



Υποστρώματα L.J. με ανάπτυξη αποικιών Μαρ 2 μηνών



Υπόστρωμα L.J. με ανάπτυξη αποικιών Mar 3 μηνών



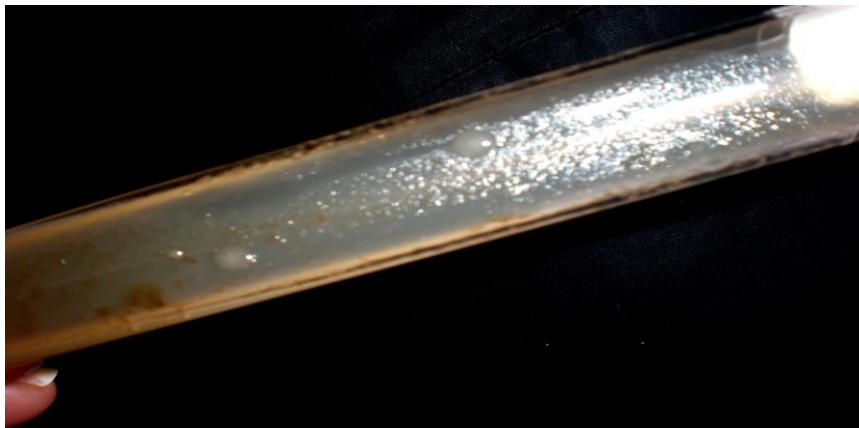
Υπόστρωμα L.J. με ανάπτυξη αποικιών Mar 3 μηνών



Υπόστρωμα L.J. με ανάπτυξη αποικιών Mar 3 μηνών και αποχρωματισμό



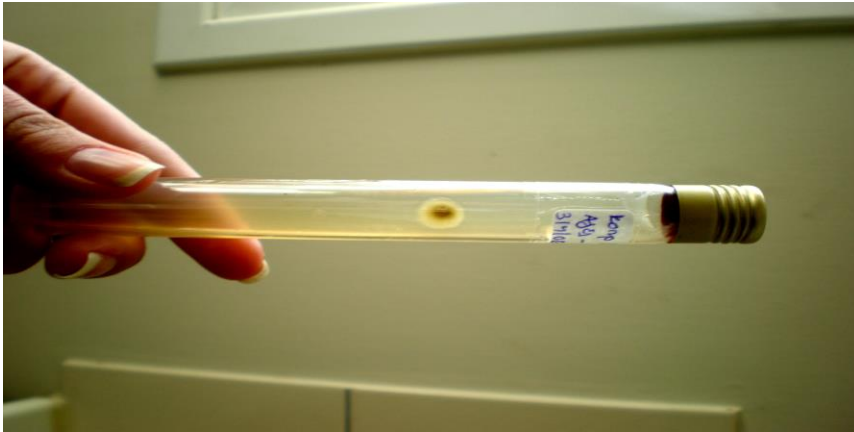
Υπόστρωμα L.J. με ανάπτυξη αποικιών Μαρ 3 μηνών



Υπόστρωμα M7H11 με ανάπτυξη αποικιών Μαρ 3 εβδομάδων



Υπόστρωμα M7H11 με ανάπτυξη αποικιών Μαρ 3 μηνών



Υπόστρωμα M7H11 με ανάπτυξη αποικιών Μαρ 3 μηνών



Υπόστρωμα M7H11 με ανάπτυξη αποικιών Μαρ 3 μηνών



Υπόστρωμα M7H11 με ανάπτυξη αποικιών Μαρ 4 μηνών



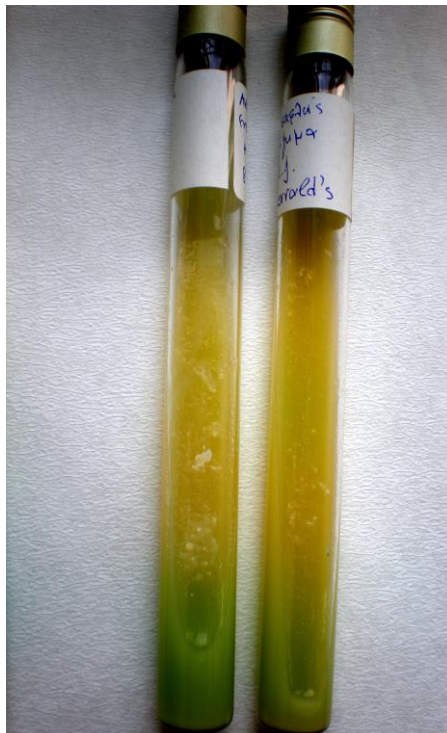
Υποστρώματα M7H11 με ανάπτυξη αποικιών Μαρ 4 μηνών



Υποστρώματα M7H11 με ανάπτυξη αποικιών Μαρ 4 μηνών



Υπόστρωμα M7H11 με ανάπτυξη αποικιών Μαρ 4 μηνών



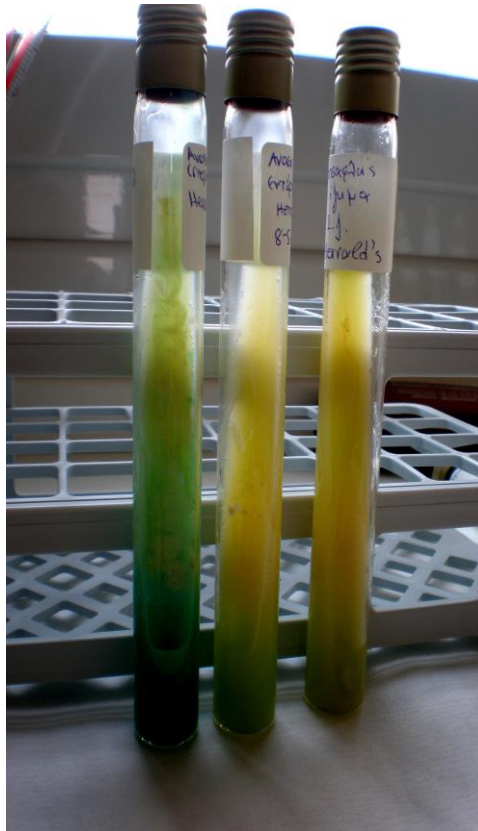
Υποστρώματα Herrold's με ανάπτυξη αποικιών Μαρ 4 μηνών



Υπόστρωμα Herrold's με ανάπτυξη αποικιών Μαρ 4 μηνών



Υπόστρωμα Herrold's με ανάπτυξη αποικιών Μαρ 4 μηνών



Υποστρώματα Herrold's με ανάπτυξη αποικιών Μαρ 4 μηνών



Υποστρώματα Herrold's με ανάπτυξη αποικιών Μαρ 4 μηνών



Ανάπτυξη και στα τρία υποστρώματα (L.J., M7H11, Herrold's) μετά από 3 μήνες

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια ερευνητικού προγράμματος με τίτλο : "Εκτίμηση των μεθόδων καλλιέργειας για την ανάπτυξη του *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Map). Μοριακή τυποποίηση των στελεχών Map με τις μεθόδους PCR-Restriction endonuclease analysis PULSED FIELD gel electrophoresis, στις εγκαταστάσεις του Ινστιτούτου Κτηνιατρικών Ερευνών Θεσσαλονίκης που υπάγεται στο ΕΘ.Ι.ΑΓ.Ε.

Ευχαριστώ θερμά την καθηγήτρια μου κα Μαζαράκη Κυριακή, Κτηνίατρο-Μικροβιολόγο, για την ανάθεση του θέματος, την καθοδήγηση και την ενθάρρυνσή της.

Επίσης, εκφράζω τις θερμότερες ευχαριστίες μου στην κα Δημαρέλη-Μαλλή Ζωή, Κτηνίατρο-Μικροβιολόγο, Αναπληρώτρια Ερευνήτρια του Ινστιτούτου Κτηνιατρικών Ερευνών Θεσσαλονίκης, για την αμέριστη βοήθεια της, τις πολύτιμες συμβουλές και την υπομονή της κατά την διάρκεια της πρακτικής μου άσκησης.

Τέλος, θεωρώ υποχρέωση να ευχαριστήσω όλο το επιστημονικό και εργατοτεχνικό προσωπικό του Ινστιτούτου Κτηνιατρικών Ερευνών για την ποικιλοτρόπως παραχθείσα βοήθειά του.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Σμοκοβίτης Αθανάσιος, 2007 : Φυσιολογία, "Εκδοτικός οίκος Αδελφών Κυριακίδη, 5^η έκδοση".

Μητλιάνγκας Π., Ψύχας Β., Λεοντίδης Σ., 1992 : Παραφυματίωση των βοοειδών "Γεωτεχνικά επιστημονικά θέματα." Τεύχος 1.

Λεοντίδης Σ., Χριστόπουλος Χ., Μητλιάνγκας Π., Γιαντζής Ν., Κοντός Β., 1978 : Παραφυματίωση στα αιγοπρόβατα "1^ο Πανελλήνιο Κτηνιατρικό Συνέδριο".

Dimareli Z., Xenos G., Argyrudis S., Papadopoulos G., 1991¹ : A Survey of ovine and caprine paratuberculosis in the Thessaloniki area, Greece. The Paratuberculosis Newsletter, vol.3 num. 2. June.

Dimareli-Malli Z., Sarris K., Xenos G., Papadopoulos G., 1991² : Comparison of the ELISA, AGID and CF tests for the diagnosis of caprine and ovine paratuberculosis. Proceedings of the third intl. colloq. on Paratuberculosis. Orlando. U.S.A.

Δημαρέλη-Μαλλή Ζ., Μηνάς Α., Σαρρής Κ., Παπαδόπουλος Γ., 1993 : Ταυτοποίηση του *M. avium* paratuberculosis. Πρώτη ταυτοποίηση του *M avium* silvaticum και διαχωρισμός αυτών με τη μέθοδο της PCR σε αίγες, "6^ο Πανελλήνιο Κτηνιατρικό Συνέδριο" Αθήνα 25-28 Νοεμβρίου.

Δημαρέλη-Μαλλή Ζ., 1994 : Μελέτη στελεχών *M. paratuberculosis* αιγών και προβάτων. Παρασκευή νεκρού εμβολίου. Πειραματική μελέτη και δοκιμή αυτού στην πράξη, "Διδακτορική Διατριβή".

Δημαρέλη-Μαλλή Ζ., 1997¹ : Πιθανή συσχέτιση του *M. paratuberculosis* με τη νόσο του Crohn στον άνθρωπο "Δελτίον της Ελληνικής Κτηνιατρικής Εταιρίας".

Δημαρέλη-Μαλλή Ζ., 1997² : Παραφυματίωση των μηρυκαστικών. Νεότερα δεδομένα και μέτρα για τον έλεγχο της νόσου στην Ελλάδα, "Δελτίον της Ελληνικής Κτηνιατρικής Εταιρίας".

Δημαρέλη-Μαλλή Ζ., Σαρρής Κ., Παπαδόπουλος Γ., 1998 : Παραφυματίωση των βοοειδών, "Γεωτεχνικά επιστημονικά θέματα vol.9 No 4".

Merkal R.S., Richards W., 1972 : Inhibition of fungal growth in the cultural isolation of mycobacteria. Appl. Microbiol.

Merkal R.S., & McCullough W.G., 1982 : A New mycobactine, mycobactine j, from Mycobacterium paratuberculosis. Current. Microbiol.

Chiodini R.J., Van Kruiningen H.J. & Merkal R.S. 1984 : Ruminants paratuberculosis (Johne's Disease) : The current status and future prospects.

Jorgensen J.B., 1984 : The diagnosis of clinical paratuberculosis in bovines. Workshop on paratuberculosis. Denmark.

Richards W.D., 1989 : Environmental acidity may be the missing piece in the Johne's disease pyzzle. Johne's Disease CSIRO Australia.

Thorel M.F., 1991 : Toxonomic and genomic research on mycobactine-dependent mycobacteria. Proceedings of the Third Intl. Colloq. on Paratuberculosis. Orlando U.S.A.

Πηγές από το Internet :

<http://www.Johnes.org/gif/photos-elk>.

<http://www.hvms.gr>

http://www.Johnes.org/gif/photos-beef/Guernsey_rear-lg.

<http://images.google.gr/imgres?imgurl>.

<http://www.pets.gr/forum/showthread.php.?t=2097>

http://www.easreth.gr/politismos-perivallon/ktinotrofia_diaxeir_monadas_astheneies.htm.

<http://jcm.asm.org/cgi/content/abstract/42/4/1703>

<http://cres.sandiegozoo.org/projects/images/>

<http://www.vri.cz/docs/vetmed/46-8-205.pdf>

http://en.wikipedia.org/wiki/Mycobacterium_avium_subspecies_paratuberculosis

<http://images.google.gr/images?ndsp=18&um=1&hl=el&q=sheep+and+goats+diesies%2Bmycobacterium+paratuberculosis&start=180&sa=N>