

COMBATING BRUCELLOSIS - NEW TRENDS AND NEW CHALLENGES

Vaso Taleski, Zdravkovska Milka, Markovski Velo, Danilova Marina , Jovevska Svetlana
Faculty of Medical Sciences, University "Goce Delcev" Sthip, Macedonia

Abstract

Aim: To present an overview of epidemiology, diagnostics, control and new challenges of brucellosis from the aspect, experiences and challenges of a small country from endemic area as a contribution of combating brucellosis on a global level. Also present a novel reservoirs as a new challenge combating brucellosis.

Material and Methods

Review on epidemiology, various diagnostic methods, assessment upon experience with different measures and approaches to control brucellosis in animals affecting spreading brucellosis in humans.

Results and Discussion

Implementing vaccination for small ruminants (sheep and goats), as a control strategy instead former strategy of "test and slaughter", gives significant results in decreasing the epizooty in animals and human morbidity, in a relative short time, but imperative is to continue with that measures.

Diagnostics would not be a problem due continuously education of veterinary and medical personnel and population, and implementation of various diagnostic tests in most laboratories. Isolation and identification of *Brucella spp.*, as a "gold standard" is not routinely implemented, but isolation with new systems for blood cultures and identification with automated identification, occasionally happens. The number of novel *Brucella* species, isolated more recently from marine mammals, raised many questions about their origin as well as on the evolutionary history and taxonomy of the genus.

The optimal treatment of human brucellosis is still debatable. The preferred treatment should be with dual or triple regimens including an aminoglycoside, to avoid treatment failure and relapses, serious complications, or residual damage from focal disease.

Conclusions

Effective control of brucellosis requires implementation a long term effective control measures. Cooperation of multi-sectorial governmental agencies and cooperation between all countries in endemic region is necessary. International assistance in resources and expertise are more than welcome. Potential of new species to cause disease in humans remains brucellosis continuously challenge as re-emerging zoonosis. A large number of diagnostic tests have been implemented, but new species may require new tests.

Key words: brucellosis, diagnostics, vaccination, control.

BORBA SA BRUCELOZOM - NOVI TRENDOM I NOVI IZAZOVI

Vaso Taleski, Zdravkowska Milka, Markovski Velo, Danilova Marina, Jovevska Svetlana
Fakultet medicinski nauka, Univerzitet "Goce Delchev" Stip, Macedonia

Kratak sadržaj

Cilj:

Prikazati poregled epidemiologije, implementiranih testova, kontrolnih mera i nove izazove bruceloze, is aspekata iskustava i izazova male zemlje iz endemske regije i njen doprinos u borbi sa brucelozom na globalnom nivou.

Material i metodi

Pregled epidemiologije, razlicitih dijagnostickih testova, tretmana, iskustvena procena razlicitih mera i pogleda na kontrolu bruceloze u zivotinja sa uticajem na sirenje bruceloze kod ljudi, literaturni podaci o novim brucelama.

Rezultati i diskusija

Implementacija vakcinacije za sitnu stoku (ovaca i koza), kao strategija za kontrolu bruceloze umesto ranije strategije "testiranje i klanje", daje znacajne rezultate u smanjenju epizootije u zivotinja i morbiditeta kod ljudi, u relativno kratko vremenu, ali sa imperativom da se produzi sa ovim merama. Dijagnoza vise ne treba biti problem zbog kontinuirane edukacije veterinaranih i medicinskih radnika i populacije, kao i implementacije razlicitih dijagnostickih testova u najveći broj laboratorija. Izolacija i identifikacija *Brucella spp.*, kao "zlatni standard" nije rutinski implementirana, ali povremeno, izolacija se vrsi sa novim sistemima za hemokulture a identifikacija pomocu automatskih sistema za identifikaciju. Nove vrste *Brucella*, izoliranih nedavno kod morskih sisara, pokrece brojna pitanja o njihovom poreklu kao i o evoluciji i taksonomiji roda. Optimalan tretman za humanu brucelozu se jos debatira. Pozeljan tretman je sa kombiunacijom dva ili tri antibiotica, dovoljno dugo vremena, da bi se izbegli neuspeh u tretmanu, relapsi, ozbiljne komplikacije ili rezidualna ostecenja zbog fokusnih obolenja.

Zaključak

Efikasna kontrola bruceloze zahteva implementaciju dugorocnih efikasni kontrolnih mera. Saradnja multi-sektorskih vladinih agencija a saradnja drzava u endemskom region je neophodnost. Megjunarodna pomoc u resursima i ekspertizi je uvek dobrodošla. Zbog potencijala novih vrsta da prouzrokuju bolest i kod ljudi, bruceloza ostaje i dalje kontinuirani izazov kao opasna zoonoza. Veliki broj dijagnostickih testova su implementirani, ali nove vrste brucela možda ce zahtevati nove testove.

Ključne reči: bruceloza, dijagnostički testovi, vakcinacija, kontrola.

Uvod

Bruceloza je tipična zoonoza koja još uvek ostaje svetski veterinarski i medicinski problem, sa velikim uticajem na zdravstvenu i ekonomsku situaciju obuhvaćenih regija. I pored toga što je jedna od najčešćih zoonoza spada u grupi zapostavljenih zaraznih obolenja.

Prvi opis obolenja je dao Hippocrates oko 450 BC. Capasso je prezentirao dokaze postojanja koštanih lezija kod ljudi ubijenih prilikom erupcije Vezuva u 79 AD, kao i prisustvo bakterija sa morfologijom *Brucella* u karboniziranom siru (Capasso, 2002). Marston je prvi u 1859 godini opisao brucelozu kao posebno obolenje. Prvi je izolirao uzročnika (*Brucella melitensis*) David Bruce in 1887 na Malti, a da se radi o zoonozi prvi je pokazao Zammit 18 godina kasnije.

Prema podacima WHO, u svetu godišnje oboli oko 500,000 ljudi, sa oko 20.000 slučajeva u Evropi. Oblasti sa visokim rizikom su zemlje Mediterana (Portugal, Španija, Juzni deo Francuske, Italija, Grcka, Turska i Severna Afrika), Južna i Centralna Amerika, Istočna Europa, Azija, Africa, Karibi i Srednji Istok (Corbel, 2006). Nekoliko područja koja su bila tradicionalno endemska, kao Francuska, Izrael i većina Latinske Amerike, postigli su kontrolu nad brucelozom. Međutim u drugim delovima sveta, kao Bliski Istok, stanje se rapidno pogoršalo. U 2005, godišnja incidenca na 100.000 u Siriji je bila 160.30, u Mongoliji 60.60, Irak 52.30 a u Saudijskoj Arabiji 21.40. Sve ukazuje na novu globalnu mapu bruceloze (Papassas i sar., 2006). Ipak, ne postoje dovoljno precizni podaci o epidemiološkoj i epizootološkoj situaciji u pojedinim zemljama u svetu a takođe i na Balkanu. Dugo godina u nekim zemljama je bilo zabranjeno objavljivanje ovih podataka. Zadnjih godina se održavaju značajni međunarodni skupovi posvećeni brucelozi na kojima se prezentiraju relevantni podaci prema kojima i da ne postoji zemlja u region koja je slobodna od bruceloze.

Razvijeni su brojni dijagnostički testovi od izolacije, seroloških testova do molekularne dijagnostike. Genom brucela je kompletno sekvencioniran, ali nedavno otkriće nekoliko novih vrsta kod morskih sisara pokreće brojna pitanja o njihovom proeklu, evoluciji i taksonomiji roda i ukazuje na potrebu od revidiranja globalne mape bruceloze. Zbog potencijala novih vrsta da prouzrokuju bolest i kod ljudi, bruceloza ostaje i dalje kontinuirani izazov kao opasna zoonoza.

Optimalan tretman za humanu brucelozu o kom se još uvek debatira, potreban je da bi se izbegli neuspeh u tretmanu, relapsi, ozbiljne komplikacije ili rezidualna oštećenja zbog fokusnih obolenja.

Iskustva u kontroli bruceloze su različita u pojedinim zemljama. Razmena iskustava uz saradnju svih država u endemskim regionima, kao i međunarodna pomoć u resursima i ekspertizi je neophodnost.

Materijal i metodi

Prikazana je analiza na osnovu dostupnih literaturnih podataka, publikovanih radova na međunarodnim, tematskim, naučnim skupovima u vezi sa brucelozom kao regionalni problem zemalja Centralne i Jugo-istočne Evrope, kao i prikaz nekih sopstvenih iskustava u oblasti dijagnostike humane bruceloze.

Epidemiologija

Podaci o epidemiologiji i epizootologiji bruceloze u endemskom region Balkanskih i okolnih zemalja se povremeno ažuriraju. Značajan rad objavljen 2002 godine prikazuje aktuelnu situaciju sa brucelozom u nekoliko zemalja Centralne i jugo-istočne Europe (Taleski i sar., 2002). Posebno su značajni regionalni i međunarodni tematski naučni skupovi koji se održavaju sve češće. U Republici Makedoniji su održana tri značajna međunarodna skupa. U aprilu 2003 godina u Skoplju i Ohridu je održan skup uz podršku International Atomic Energy Energy Agency (IAEA), Regional Technical Co-operation Project RER/5/012, "Regional Control of Brucellosis in Sheep and Goats", Regional Coordination Meeting. U novembru 2005 je održan međunarodni skup u Skoplju, "Internacionaln research conference for Brucellosis in small ruminants", jedan od skupova COST Action 845, Brucellosis in Animals and Man. U novembru 2009 godine u Strugi je održan tematski naučni skup META Net Project, Brucellosis in SE Mediterranean Region. Simpozijum "Bruceloza u Hrvatskoj i susednim zemljama" je održan u Zagrebu 25 septembra 2013. U ovu seriju značajnih skupova je i naučno-stručni simpozijum "Bruceloza u Jugoistočnoj Evropi", u vremenu od 16-19 Oktobra, 2013 u Nišu, Srbija.

Dugo godina u nekim zemljama je bilo zabranjeno objavljivanje ovih podataka. Zadnjih godina se održavaju značajni međunarodni skupovi posvećeni brucelozu na kojima se prezentiraju relevantni podaci prema kojima i da ne postoji zemlja u region koja je slobodna od bruceloze.

Republika Makedonija je endemsko područje za brucelozu od 1980. Bolest je donešena sa uvozom inficiranih ovaca. U period od 1980 do 2012, bilo je ukupno 11.884 slučajeva bruceloze kod ljudi. Najveći broj obolelih je bio 992 u 1992 (populacija je oko 2.2 miliona). Kao rezultat vakcinacije malih životinja, broj obolelih ljudi je značajno opao od 480 u 2008, na 287, 167 106 i 94 u 2009, 2010, 2011 i 2012, sledstveno (Taleski i sar., 2013).

U zemljama regiona problem za brucelozom je različit. Pored Makedonije, značajne problem imaju još Turska i Grčka, a manje problema Srbija, Kosovo, Crna Gora Bosna i Hercegovina, Albanija, Slovenija, Hrvatska, Rumunjska i Bugarija.

U Srbiji je u periodu od 1980 do 2008 godine bilo prijavljeno 1521 slučaj sa humanom brucelozom (Čekanjac i sar., 2010). U istom period, u Bosni i Hercegovini je bilo 1639 slučajeva sa humanom brucelozom (Obradović, 2010). Podaci iz Bugarske pokazuju izvestaj o samo dva slučajeva humane bruceloze u periodu od 1996 do 2001 (Taleski i sar., 2002), 37 slučajeva u 2005 i 58 u 2007 (Nenova i sar., 2013). Do 1990 Hrvatska je bila slobodna od bruceloze, kada se javlja epizootija kod ovaca i koza u Istri. Dokazan je i rezervoar *B. suis* kod divljih svinja (Taleski i sar. 2013). U Turskoj u 2005, godišnja incidence humane bruceloze je bila 26,20 na 100.000 stanovnika. U zemljama Evropske Unije, trend humane bruceloze u periodu 2006-2010 je u opadanju (ECDC, 2012). U ovom periodu je bilo ukupno 3090 slučajeva od kojih 80% otpada na Grčku (97-121 na 100.000), Španiju (78-196 na 100.000) i Portugal (74-88 na 100.000), tabela 1.

Tabela 1. Morbiditet i incidenca registrovanih i potvrđenih slučajeva sa brucelozom u EU/EEA zemljama, 2006-2010

Country	2010					2009		2008		2007		2006	
	National coverage	Report type	Total cases	Confirmed cases and notification rate per 100 000 population		Cases	Rate	Cases	Rate	Cases	Rate	Cases	Rate
				Cases	Rate								
Austria	Y	C	3	3	0.04	2	0.02	5	0.06	0	0.00	1	0.01
Belgium	Y	C	0	0	0.00	1	0.01	1	0.01	3	0.03	2	0.02
Bulgaria	Y	A	2	2	0.03	3	0.04	8	0.11	9	0.12	3	0.04
Cyprus	Y	C	0	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00
Czech Republic	Y	C	1	1	0.01	0	0.00	1	0.01	0	0.00	0	0.00
Denmark	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Estonia	Y	C	0	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00
Finland	Y	C	0	0	0.00	1	0.02	0	0.00	2	0.04	0	0.00
France	Y	C	20	20	0.03	19	0.03	21	0.03	14	0.02	24	0.04
Germany	Y	C	22	22	0.03	19	0.02	24	0.03	21	0.03	37	0.05
Greece	Y	C	97	97	0.86	106	0.94	304	2.71	101	0.90	121	1.09
Hungary	Y	C	0	0	0.00	0	0.00	0	0.00	1	0.01	-	-
Ireland	Y	C	1	1	0.02	0	0.00	2	0.05	7	0.16	4	0.10
Italy	Y	C	10	10	0.02	23	0.04	163	0.27	179	0.30	456	0.78
Latvia	Y	C	0	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00
Lithuania	Y	C	0	0	0.00	1	0.03	0	0.00	0	0.00	0	0.00
Luxembourg	Y	C	1	1	0.20	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00
Malta	Y	C	0	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00
Netherlands	Y	C	6	6	0.04	3	0.02	3	0.02	2	0.01	6	0.04
Poland	Y	C	0	0	0.00	3	0.01	1	0.00	1	0.00	0	0.00
Portugal	Y	C	88	88	0.83	80	0.75	56	0.53	74	0.70	76	0.72
Romania	Y	C	2	2	0.01	3	0.01	2	0.01	2	0.01	1	0.01
Slovakia	Y	C	1	1	0.02	0	0.00	1	0.02	0	0.00	0	0.00
Slovenia	Y	C	0	0	0.00	2	0.10	2	0.10	1	0.05	0	0.00
Spain	Y	C	103	78	0.17	114	0.25	120	0.27	201	0.45	196	0.45
Sweden	Y	C	12	12	0.13	7	0.08	8	0.09	8	0.09	4	0.04
United Kingdom	Y	C	12	12	0.02	17	0.03	13	0.02	13	0.02	20	0.03
EU total	-	-	381	356	0.07	404	0.08	735	0.15	639	0.13	951	0.20
Iceland	Y	C	0	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00
Liechtenstein	-	-	-	-	-	-	-	0	0.00	0	0.00	-	-
Norway	Y	C	2	2	0.04	0	0.00	0	0.00	0	0.00	3	0.07
Total	-	-	383	358	0.07	404	0.08	735	0.15	639	0.13	954	0.20

Dijagnostika

Dijagnoza humane bruceloze se vrši na osnovu kliničkih ispitivanja i laboratorijskih testova (izolacija i identifikacija, serološki testovi, molekularne metode). Različiti simptomi, sub-kliničke i atipične infekcije, u akutnoj i hroničnoj fazi, znatno otežavaju dijagnozu.

Kultiviranje kao "zlatni standard" je teško, rizično, treba puno vremena i visoko obučeni personal kao i specijalne komore III nivoa bezbednosti. Sa uvođenjem modernih sistema za hemokulture i za automatsku identifikaciju i određivanja antibiograma, uz postojeći rizik, povremeno se izoluju i identifikuju brucele (Cekovska i sar. 2010). U studiji na 90 kultiviranih primeraka izdvojenih polimorfonuklearnih ćelija, dobili smo 16 izolata (17,7%) i svi su potvrđeni PCR-om.

Različite dijagnostičke testove smo implementirali u našoj laboratoriji, neke kao skrining, kao konfirmatorne testove, druge smo koristili samo u studijama. Od aglutinacionih testova smo koristili: Rose Bengal test (RBT)/ Slide Agglutinations test; Standard tube test (SAT) / Wright test; Antihuman globulin test (Coombs); 2-Mercapto-

ethanol test; Micro-technique of 2-Mercaptoethanol test; Complement fixation test (CFT); Indirect enzyme immunoassay (ELISA); Competitive enzyme immunoassay (c-ELISA); Fluorescent polarization assay (FPA); PCR-od primeraka periferne krvi. Za PCR smo koristili The R.A.P.I.D. PCR Real-time system, i prajmere za IS711 i BCSP31. Rezultate koje smo dobili bili su sledeći: Senzitivnost za: kulture 17,7%, RBT 98%, SAT 82%, Coombs 89%, c-ELISA 98%, ELISA 98%, FPA 86 %, R.A.P.I.D PCR-56%, i specifičnost: kulture 100%, RBT 97%, SAT 98%, Coombs 100%, c-ELISA 98%, ELISA 100%, FPA 92%, i R.A.P.I.D. PCR 100% (Taleski, 2010).

Terapija

WHO je dala preporuku za tretman humane bruceloze u 1986 (Joint FAO/WHO expert committee on brucellosis). Preporuka je korišćenje doxycyclina, 100 mg dva puta dnevno u toku 6 nedelja, u kombinaciji sa rifampicinom 600–900 mg dnevno u toku 6 nedelja, ili sa streptomycinom 1 g dnevno u toku 2–3 nedelja. Brojne studije su ukazale da se preporuke ne koriste svuda u svetu kako su propisane, i još važnije što u malom ali značajnom procentu (5% - 15%) ima terapijski neuspeh, najčešće u obliku relapsa.

U Novembru 2006 održan je konsenzualni sastanak specijalista za tretman humane bruceloze, u Janinu u Grčkoj. Nakon panelne diskusije sugeriran je optimalan tretman kod nekomplikovanih slučajeva sa brucelozom, sa 6 nedelja doxiciclina u kombinaciji sa 2-3 nedelje sa streptomycinom ili 6 nedelja sa rifampicinom. Gentamicin bi mogao da se koristi kao alternativa za streptomycin, a sve ostale kombinacije bi bile druga linija tretmana (Ariza i sar., 2007). Ipak, optimalan tretman i dalje je diskutabilan.

Kontrolne mere

Pojava bruceloze uzrokuje ogromne gubitke u produkciji hrane, a nemoguće je proračunati gubitke zbog obolenja kod ljudi kao sto su troškovi lečenja i nesposobnosti za rad za vreme lečenja.

Kontrolne mere obuhvataju:

- 1) "testiranje i klanje životinja",
- 2) higijenske mere i
- 3) vakcinaciju.

Najveći efekat se postiže kombinacijom svih mera (Nicoletti, 2010). Kontrola humane bruceloze je moguća samo uz kontrolu kod životinja, što je zadatak veterinarske službe, koja mora biti vrlo dobro organizovana, kao i da se obezbede finansijska sredstva za implementaciju programa na najmanje 10 godina i saradnja sa ostalim vladinim sektorima. Saradnja sa farmerima je neophodna. Svake mere imaju i prednosti i nedostatke. U Izraelu se je 1970 godine bruceloza pojavila kao endemska bolest kod malih životinja. Od 1993-1997 godine je sprovedena vakcinacija pri čemu je broj obolelih kod životinja i ljudi značajno opao. Međutim brzo nakon prestanka vakcinacije, bolest se ponovo pojavila (Banai, 2010). U Makedoniji je do 2008 godine korišćena strategija "testiraj i ukloni klanjem", ali bez uspeha, broj obolelih životinja i ljudi je bio vrlo visok (400-500 novih slučajeva kog ljudi godišnje). U 2008 ovaj pristup je zamenjen sa vakcinacijom malih životinja (ovaca i koza) sa vakcinom Rev 1, koja se aplicira intraokularno. Rev 1 vakcina se smatra za najboljom vakcinom za profilaksu od infekcije sa *Brucellom melitensis* (Blasco, 2010). Zemlja je bila podeljena na tri vakcinalna regiona: sa visokom, srednjom i niskom (bez bruceloze) prevalencom. Za razlikovanje

Rev 1 sojeva od infektivnih/poljskih sojeva implementirana je PCR-RFLP na bazi mutacije rpsL gena. Kao rezultat vakcinacije, broj humanih slučajeva je značajno opao, od 480 u 2008, do 287, 167, 106 i 94 u 2009, 2010, 2011 i 2012, redosledno. Ovaj program je produžen do 2015 (Naletoski I, 2010), ali se mora produžiti za još najmanje 5 godina.

Nove brucele

Od 1994 godine, pored klasičnih 6 vrsta brucela (*B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. canis*, *B. neotome*, *B. ovis*) počelo je izolovane brucela kod nekih drugih sisara, kao sto su *B. ceti* (kod morskih sisara-kitova, delfina i malih delfina), *B. Pinnipedialis* (kod foka i morskis lavova), *B. microti* (kod vodenih štakora u Českoj i kod divljih crvenih lisica u Austriji) i *B. Inopinata* (izolirana iz implanta grudi i krvi 71 godišnje žene sa kliničkim simptomima bruceloze) (Holger i sar., 2008, 2011, Nymo, 2011).

Taksonomija brucela je još više kontraverzna i još uvek se debatira. Sugerirano je da je divergencija vrsta roda *brucella*, rezultat divergencije njihovih domaćina-sisara, pre 60 miliona godina. Međutim divergencija domaćina za *B. ceti* i *B. pinnipedialis* se nije desila u isto vreme jer se smatra da se kod predaka foka i morskih lavova to dogodilo pre oko 35 miliona godina. Kitovi i delfini su ušli u mora mnogo ranije, pre oko 55 miliona godina. Najnovija ispitivanja ukazuju na to da je najveći broj poznatih, klasičnih brucela divergirao najverojatnije pre oko 86,000 i 296,000 godina. Ova analiza otkriva da divergencija vrsta brucela morskih sisara je nekompatibilna sa divergencijom njihovih domaćina. Moguće je da je infekcija morskih sisara nastala putem lanca ishrane od kopnenih sisara, ali ostaje otvorena mogućnost da su brucele morskih sisara inficirale kopnene domaćine. Prateći evoluciju *B. microti*, prva evolucija je bila divergencija na dve sledeće vrste: *B. suis* i *B. neotomae* (Audic, 2011). Nove vrste brucela i novi rezervoari su novi izazov sa nepredvidljivim mogućim posledicama kao najčešća i opasna zoonoza.

Zaključak

Bruceloza, kao jedna od najčešćih zoonoza, još uvek ostaje svetski veterinarski i medicinski problem, sa velikim uticajem na zdravstvenu i ekonomsku situaciju obuhvaćenih regija.

Preporuke za terapiju su ažurirane, ali optimalan tretman je i dalje diskutabilan.

Efikasna kontrola bruceloze zahteva implementaciju dugoročnih efikasnih kontrolnih mera uz saradnju dobro organizovane veterinarske službe sa multi-sektorskim vladinim agencijama, finansiska sigurnost programa za kontrolu, kao i neophodnu saradnju svih državama u endemskom region.

Zbog potencijala novih vrsta da prouzrokuju bolest i kod ljudi, bruceloza ostaje i dalje kontinuirani izazov kao opasna zoonoza.

Literatura

1. Ariza J., Bosilkovski M., Cascio A., et al. Perspectives for the Treatment of Brucellosis in the 21st Century: The Ioannina Recommendations. *PlosMed Journal*, December 2007, 4(12): e317.
2. Audic S., Lscot M., Claverie JM., et al. The genome sequence of *Brucella pinnipedialis* B2/94 sheds light on the evolutionary history of the genus *Brucella*, *BMC Evol Biol.* 2011; 11: 200.
3. Banai M. Insights into the problem of *B. Melitensis* and Rationalizing a Vaccination Programme in Israel. International Scientific Conference in South Eastern Europe and Mediterranean Region. Struga, Macedonia, 12-14 Nov 2009, Contributions, 2010, 168-79.
4. Blasco JM. Control and Eradication Strategies for *Brucella Melitensis* Infection in Sheep and Goats. International Scientific Conference in South Eastern Europe and Mediterranean Region. Struga, Macedonia, 12-14 Nov 2009, Contributions, 2010, 146-64.
5. Capasso L. Bacteria in two-millenia-old cheese and related epizoonoses in Roman polutations. *J Infect*, 2002; 45: 122-7.
6. Cekovska Z., Petrovska M., Jankoska G., Panovski N., Kaftandzieva A. Isolation, identification and antimicrobial susceptibility of *Brucella* blood culture isolates. International Scientific Conference in South Eastern Europe and Mediterranean Region. Struga, Macedonia, 12-14 Nov 2009, Contributions, 2010, 117-30.
7. Cekanjac R., Mladenovic J., Ristanovic E., Lazic S. Epidemiological characteristics of Brucellosis in Serbia, 1980-2008. International Scientific Conference in South Eastern Europe and Mediterranean Region. Struga, Macedonia, 12-14 Nov 2009, Croatian Medical Journal. *Brucellosis-Diagnosis end Epidemiology.* 2010, 337-44.
8. Corbel M (2006) *Brucellosis in Humans and Animals*: FAO, OIE, WHO. Available: <http://www.who.int/csr/resources/publications/Brucellosis.pdf> Accessed 2012 May 7.
9. ECDC, Annual epidemiological report 2012, 60-4.
10. Holger CS., Hubalek Z., Sedlacek I., at al. *Brucella microti* sp. nov., isolated from the common vole *Microtus arvalis* *IJSEM* February 2008, vol. 58 no. 2, 375-382.
11. Holger CS., Nöckler K., Göllner C., at al. *Brucella inopinata* sp. nov., isolated from a breast implant infection. *IJSEM* April 2010 vol. 60 no. 4 801-808.
12. Joint FAO/WHO expert committee on brucellosis. *World Health Organ Tech Rep Ser.* 1986; 740:1–132.
13. Naletoski I., Kirandziski T., Mitrov D., et al. Gaps in Brucellosis Eradication Campaign in Sheep and Goats in Republic of Macedonia: Lessons Learned. International Scientific Conference in South Eastern Europe and Mediterranean Region. Struga, Macedonia, 12-14 Nov 2009, Croatian Medical Journal. *Brucellosis-Diagnosis end Epidemiology.* 2010,351-6.
14. Nenova R., Tomova I., Kantardjiev T., Likov. B. Brucellosis in Bulgaria – an Overview of the Present Sitation. 8th Balkan Congress of Microbiology. *Microbiologia Balcanica* 2013. Veliko Tarnovo, Bulgaria, October 2nd – 5th, 2013, 60.
15. Nicoletti P. Brucellosis: Past, Present and Future. International Scientific Conference in South Eastern Europe and Mediterranean Region. Struga, Macedonia, 12-14 Nov 2009, Contributions, 2010, 21-31.
16. Nymo I., Nymo H., Tryland M., Godfroid J. A review of *Brucella* infection in marine mammals, with special emphasis on *Brucella pinnipedialis* in the hooded seal (*Cystophora cristata*). *Veterinary Research* 2011, 42:93. <http://www.veterinaryresearch.org/content/42/1/93>.

17. Obradovic Z., Velic R. Epidemiological characteristics of Brucellosis in Federation of Bosnia and Herzegovina. International Scientific Conference in South Eastern Europe and Mediterranean Region. Struga, Macedonia, 12-14 Nov 2009, Croatian Medical Journal. Brucellosis-Diagnosis end Epidemiology. 2010, 345-50.
18. Pappas G., Papadimitriou P., Akritidis N., Christou L., Tsianos VE. The new global map of human brucellosis. The Lancet Infectious Diseases, 2006, Vol. 6, Issue 2, 91-9.
19. Taleski V, Zerva L., Kantardjiev T., Cvetnic Z., Erski-Biljic M., Nikolovski B., Bosnjakovski J., Katalinic-Jankovic V., Panteliadou A., Stojkoski S., Kirandziski T. An overview of the epidemiology and epizootology of brucellosis in selected countries of Central and Southeast Europe. Vet. Microbiol., 2002, 90: 147-55.
20. Taleski V., An Overview of Introducing Various Laboratory Tests for Diagnosis of Human Brucellosis in the Republic of Macedonia. International Scientific Conference in South Eastern Europe and Mediterranean Region. Struga, Macedonia, 12-14 Nov 2009, Macedonian Journal of Medical Sciences, 2010, 1-7.
21. Taleski V., Zdravkovska M., Mrenoski S., Markovski V., Bosnjakovski D. Control of Human brucellosis in Macedonia: Past end Present. The 5th Eurasia Congress of Infectious Diseases, 15-18 May 2013, Tirana, Albania, 445-6..