



Ανίχνευση μυκοπλάσματος σε δείγματα κατσικίσιου γάλακτος από ελληνικές εκτροφές

Detection of mycoplasma in goat milk samples from Greek farms



Scarlat Laura Viorica του Iulian
Λάρισα, 2025

Τριμελής επιτροπή

Γιαννούλης Θεμιστοκλής, Αναπληρωτής Καθηγητής, Γενετική Ζωικών Οργανισμών: Γονιδιωματική, Εξέλιξη και Βιοποικιλότητα, Τμήμα Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας (Επιβλέπων)

Μαμούρης Ζήσης, Καθηγητής Γενετικής Πληθυσμών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας (Συνεπιβλέπων)

Φθενάκης Γεώργιος, Καθηγητής Φυσιοπαθολογίας της Αναπαραγωγής των Ζώων, Τμήμα Κτηνιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Περιεχόμενα

Ευχαριστίες	5
Περίληψη	6
1 Εισαγωγή:	8
1.1 Μυκόπλασμα	8
1.1.1 Τι είναι το μυκόπλασμα	8
1.1.2 Μηχανισμός δράσης μυκοπλασμάτων	10
1.2 Τα μυκοπλάσματα προσβάλλουν και τις αίγες	11
1.2.1 Παθογένεια του μυκοπλάσματος στις Αίγες	12
1.2.2 Μεταδοτική αγαλακτία (Ca)	12
1.2.3 Μεταδοτική πλευροπνευμονία των Αιγών (CCPP)	13
1.3 <i>Mycoplasma agalactiae</i> (Ma)	14
1.3.1 Μεταδοτικότητα	14
1.3.2 Παθογένεια	14
1.3.3 Μηχανισμός Δράσης	16
1.4 <i>Mycoplasma mycoides</i> cluster	16
1.4.1 <i>Mycoplasma mycoides</i> subsp. <i>mycoides</i> Small colony type (MmmSC)	17
1.4.2 <i>Mycoplasma mycoides</i> subsp. <i>Capri</i> (Mmc)	17
1.5 <i>Mycoplasma putrefaciens</i> (Mp)	18
1.6 Μοριακή Ανίχνευση	18
1.6.1 Καλλιέργεια	18
1.6.2 Κυτταρομετρία ροής	18
1.6.3 ELISA	20
1.6.4 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)	22
1.6.6 Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου RT-qPCR	23
1.6.7 Συμπερασματικά	24
1.7 Αλληλούχηση	25
2 Σκοπός	26
3 Υλικά και μέθοδοι	26
3.1 Συλλογή δειγμάτων	27
3.1.1 Επίσκεψη στις φάρμες, συλλογή και απομόνωση δειγμάτων	27

3.1.2 Κλινικά συμπτώματα που οδήγησαν στην συγκεκριμένη έρευνα	28
3.2 Υλικά.....	28
3.2.1 Εκκινητές	28
3.2.2 Αντιδραστήρια	30
3.3 Μέθοδοι.....	30
3.3.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου	30
3.3.2 Καθαρισμός προϊόντων αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου.....	31
3.3.3 Αλληλούχιση θετικών προϊόντων αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης	32
4 Αποτελέσματα	32
5 Συζήτηση	33
Βιβλιογραφία	36

Ευχαριστίες

Η παρούσα πτυχιακή εκπονήθηκε στο εργαστήριο «Γενετικής Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας», από τον Μάρτιο του 2025 έως τον Σεπτέμβριο του 2025. Αρχικά θα ήθελα να εκφράσω την ιδιαίτερη εκτίμηση μου στον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Γιαννούλη Θεμιστοκλή για την συνεχή καθοδήγηση, τις συμβουλές και την πολύτιμη βοήθεια του όλη αυτή την περίοδο, καθώς και για την ευκαιρία που μου έδωσε για την υλοποίηση αυτής την πτυχιακής εργασίας. Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω τον συνεπιβλέποντα μου κ. Μαμούρη Ζίση για την υποστήριξη καθώς και τον κ. Φθενάκη Γεώργιο για τη παροχή δειγμάτων, και τις χρήσιμες κατευθύνσεις του. Ευχαριστίες οφείλω επίσης και σε όλα τα μέλη του εργαστηρίου Γενετικής Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας για την βοήθεια τους και πιο συγκεκριμένα τον Αγγελακόπουλο Ραφαήλ για την πολύτιμη συνδρομή και καθοδήγηση του καθ' όλη την διάρκεια εκπόνηση της πτυχιακής μου εργασίας, τον Ελένη Κωνσταντίνο για το ευχάριστο κλίμα που υπήρχε στο εργαστήριο καθώς και τον κ. Τσιπουρλιάνο Αντρέα για τις χρήσιμες επισημάνσεις του. Θα ήθελα να ευχαριστήσω επίσης και τους φίλους μου Αλεξάνδρα, Παναγιώτη, Κωνσταντία, Σουσάνα και Ορθοδοξία που με στήριξαν με τον τρόπο τους όλο αυτό το διάστημα. Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου και πιο συγκεκριμένα την μητέρα μου για όλη την ψυχική ενθάρρυνση που μου προσέφερε σε όλη αυτή την πορεία.

Περίληψη

Οι αίγες είναι πολύ βασικά ζώα για την παγκόσμια οικονομία, καθώς αποτελούν σημαντική πηγή γάλακτος και κρέατος για όλο τον κόσμο. Υπάρχουν όμως βακτήρια που τις προσβάλλουν δημιουργώντας τους σημαντικά προβλήματα υγείας. Ένα από αυτά τα βακτήρια είναι το μυκόπλάσμα το οποίο μολύνει τις αίγες προκαλώντας μεταδοτική αγαλακτία καθώς και μεταδοτική πλευροπνευμονία των αιγών. Το συγκεκριμένο βακτήριο έχει ανιχνευτεί σε όλο τον κόσμο, αλλά εμφανίζεται με μεγαλύτερη συχνότητα στις χώρες της Μεσογείου. Ένα από τα σημαντικότερα μυκοπλάσματα που μολύνουν τις αίγες είναι το *Mycoplasma Agalactiae* (*Ma*) καθώς είναι το κύριο είδος που προκαλεί την μεταδοτική αγαλακτία. Σημαντικά επίσης είναι και τα μυκοπλάσματα *Mycoplasma mycoides subsp.*, *Mycooides Small Colony type* (*MmmSC*), *Mycoplasma mycoides subsp. Capri* (*Mmc*) και *Mycoplasma Putrefaciens* (*Mr*). Στην παρούσα πτυχιακή εργασία ανιχνεύτηκαν σε δείγματα χύμα κατσικίσιου γάλακτος από όλη την Ελλάδα, με την μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης (PCR) τα μυκοπλάσματα *Ma*, *MmmSC*, *Mmc* και *Mr*. Το προϊόν της PCR αντίδρασης αλληλουχήθηκε για την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων. Συγκεκριμένα από τα 119 δείγματα ανιχνεύτηκε μυκόπλάσμα σε 29 από αυτά, *Ma* σε 16, *MmmSC* σε 9 και *Mr* σε 5 από αυτά.

Abstract

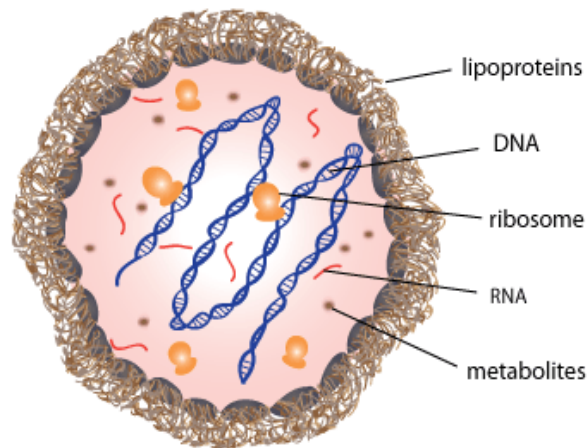
Goats are highly important animals for the global economy, as they represent a major source of both milk and meat worldwide. However, they are susceptible to bacterial infections that cause significant health problems. One of these pathogens is *Mycoplasma*, which infects goats and is responsible for diseases such as contagious agalactia and contagious caprine pleuropneumonia. This bacterium has been detected across the globe, with higher prevalence in Mediterranean countries. Among the most significant *Mycoplasma* species affecting goats is *Mycoplasma agalactiae* (*Ma*), which is the primary causative agent of contagious agalactia. Other relevant species include *Mycoplasma mycoides* subsp. *Mycoides Small Colony type* (*MmmSC*), *Mycoplasma mycoides* subsp. *Capri* (*Mmc*) and *Mycoplasma putrefaciens* (*Mp*). In the present thesis, where analyzed bulk tank milk samples collected from various regions in Greece using the Polymerase Chain Reaction (PCR) method for the detection of *mycoplasma* species (*Ma*, *MmmSC*, *Mmc* and *Mp*). The PCR products were sequenced to confirm the results. Specifically, out of 119 samples analyzed, *Mycoplasma* was detected in 29, with *Ma* identified in 16 cases, *MmmSC* in 9, and *Mp* in 5 samples.

1 Εισαγωγή:

1.1 Μυκόπλασμα

1.1.1 Τι είναι το μυκόπλασμα

Το μυκόπλασμα είναι ένας μικρός και απλός προκαρυωτικός οργανισμός ο οποίος έχει την ικανότητα του αυτοδιπλασιασμού (Thompson et al 2011) και παρουσιάζει εξειδίκευση οργάνων και ιστών. Ανήκει στην τάξη *Mollicutes* (Benedetti et al 2020) η οποία περιλαμβάνει και βακτήρια όπως το ουρεόπλασμα, σπειρόπλασμα, αιμόπλασμα και αχολέπλασμα (Rosales et al 2017). Διαθέτει μόνο τα απαραίτητα κυτταρικά συστατικά τα οποία είναι η πλασματική μεμβράνη, που το διαχωρίζει από το εξωτερικό περιβάλλον, τα ριβοσώματα και ένα δίκλωνο κυκλικό μόριο DNA μήκους 500Kb έως 1360Kb (εικόνα 1). Το γενετικό υλικό των μυκοπλασμάτων έχει χαμηλή περιεκτικότητα σε γουανίνη-κυτοσίνη (G-C) (Benedetti et al 2020) και παρουσιάζει μια ιδιαιτερότητα αφού για να αυξήσει την περιεκτικότητα των πρωτεϊνών του σε τρυπτοφάνη, χρησιμοποιεί το κωδικόνιο λήξης UGA, ως κωδικόνιο της τρυπτοφάνης μαζί με το UGG (Rosati et al 2000). Το γενετικό υλικό των μυκοπλασμάτων είναι οργανωμένο σε οπερόνια εκ των οποίων αρκετά είναι πολυκιστρονικά. Υπό διαφορετικές συνθήκες τα οπερόνια μπορούν να χωριστούν σε μικρότερες μεταγραφικές μονάδες οδηγώντας σε πολλά εναλλακτικά μετάγραφα (Guell et al 2009) και στην συνέχεια λόγω των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων παράγουν πολλές διαφορετικές πρωτεΐνες. (Thompson et al 2011).



Εικόνα 1: Σκίτσο μυκοπλάσματος, φαίνεται η πλασματική του μεμβράνη αποτελείται από διάφορες λιποπρωτεΐνες, το δίκλωνο DNA, τα ριβοσώματα, το μεταγράψωμα των γονιδίων RNA και κάποιοι μεταβολίτες (InvivoGen).

Επειδή διαθέτει μόνο πλασματική μεμβράνη το κυρίαρχο σχήμα ενός κυττάρου του μυκοπλάσματος είναι μία σφαίρα με διάμετρο περίπου 0,3 – 0,8 μm (εικόνα 1). Ωστόσο υπάρχουν *Mollicutes* τα οποία με την βοήθεια του κυτταροσκελετού εμφανίζουν και άλλα σχήματα όπως φιάλης, αχλαδιού και ελικοειδών νημάτων (Razin et al 2010). Τα μυκοπλάσματα είναι θετικά κατά Gram βακτήρια (Thompson et al 2011) που δεν διαθέτουν κυτταρικό τοίχωμα, αλλά έχουν την ικανότητα παραλλαγής των αντιγόνων της πλασματικής τους μεμβράνης (Hotzel et al 2003). Τα μυκοπλάσματα είναι ευαίσθητα στο ωσμωτικό σοκ και στα απορρυπαντικά αλλά είναι ανθεκτικά σε πολλά κοινά αντιβιοτικά όπως η πενικιλίνη. Στις εργαστηριακές καλλιέργειες δημιουργεί αποικίες με σκούρο κέντρο το οποίο έχει την μορφολογία τηγανιτού αυγού (εικόνα 2) (Razin et al 2010) και με την χρώση κατά Gram, λόγω της έλλειψης κυτταρικού τοιχώματος, βάφεται με ροζ χρώμα. (Kumar et al 2014). Κατά την διάρκεια της εξέλιξης, τα μυκοπλάσματα έχουν χάσει ένα τεράστιο μέρος των ρυθμιστικών και μεταβολικών ικανοτήτων ενός θετικού κατά Gram βακτηρίου όπως τον μηχανισμό βιοσύνθεσης της κυτταρικής τους μεμβράνης (Halbedel et al 2007) με αποτέλεσμα να εξαρτώνται εντελώς από τον ξενιστή για την επιβίωση τους (Rosales et al 2017). Τα μυκοπλάσματα μπορούν να βρίσκονται έξω από το κύτταρο και να δρουν ως παράσιτα της επιφάνειας της μεμβράνης, αλλά διεισδύουν και μέσα στα κύτταρα των ξενιστών (Benedetti et al 2020).



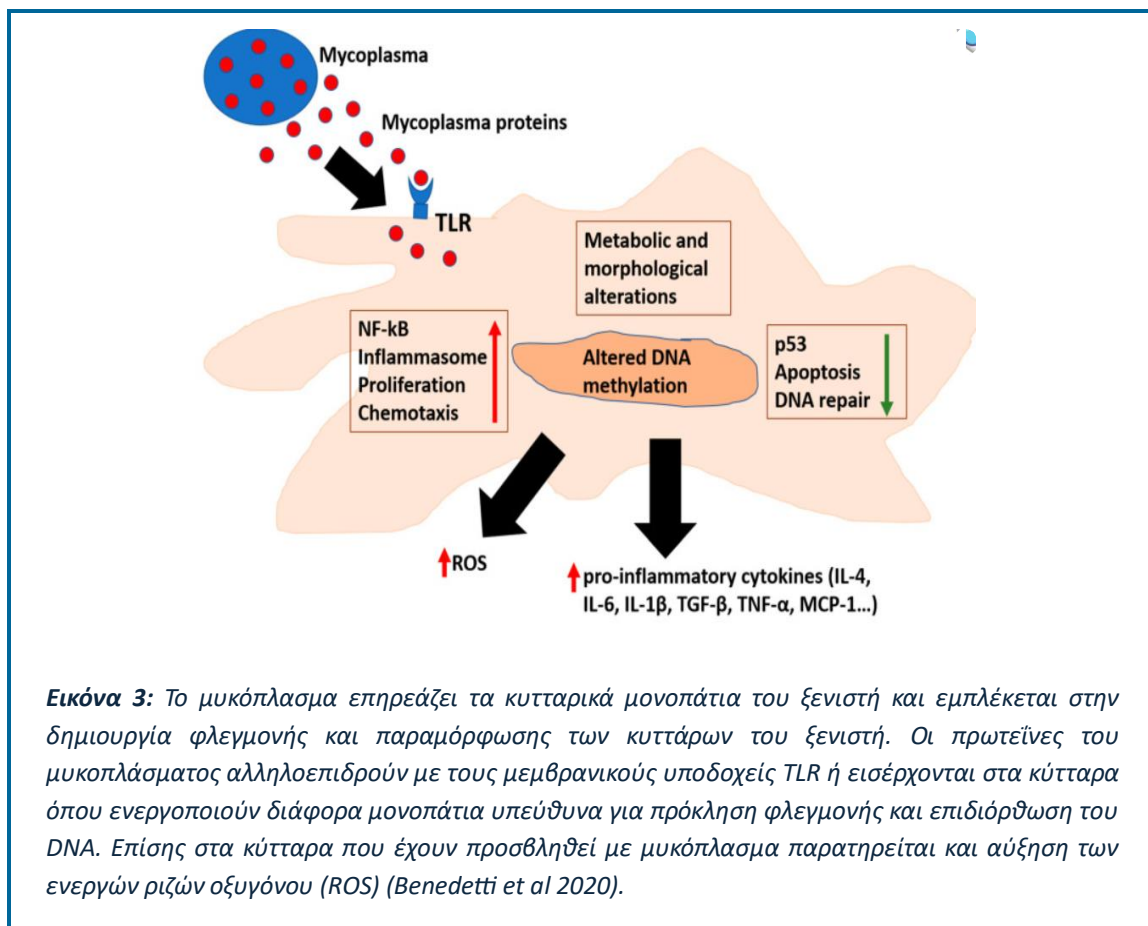
Εικόνα 2: Μυκοπλασματικές αποικίες με χαρακτηριστική μορφή 'τηγανιτού αυγού' (Assuncao et al 2007).

Τα μυκοπλάσματα είναι παρασιτικά βακτήρια που ανάλογα το είδος προσβάλλουν διάφορα είδη όπως τα θηλαστικά, συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου, τα ερπετά, τα ψάρια, τα αρθρόποδα και τα φυτά (Halbedel et al 2007). Αν και είναι ειδικά για το είδος, στενά συγγενικά είδη ζώων μπορεί να προσβάλλονται από το ίδιο είδος μυκοπλάσματος (Ruffin et al

2001). Συνήθως τα μυκοπλάσματα που προσβάλλουν αίγες δεν προσβάλλουν και ανθρώπους, ωστόσο υπάρχει στην βιβλιογραφία ένα περιστατικό κατά το οποίο απομονώθηκε από έναν άνθρωπο το *Mycoplasma capricolum subsp. Capricolum*. Το άτομο αυτό παρουσίασε πυρετό, σηψαιμία και συμπτώματα μηνιγγίτιδας. Είναι η μόνη περίπτωση όπου ένας άνθρωπος μολύνθηκε από μυκόπλασμα των αιγών (Sprickler et al 2018). Τα μυκοπλάσματα μπορούν επίσης να δημιουργήσουν και συμβιωτικές σχέσεις με είδη όπως τα ισόποδα, τα ωδικά πουλιά, κάποια ψάρια καθώς και με κάποια κοράλλια (Halbedel et al 2007).

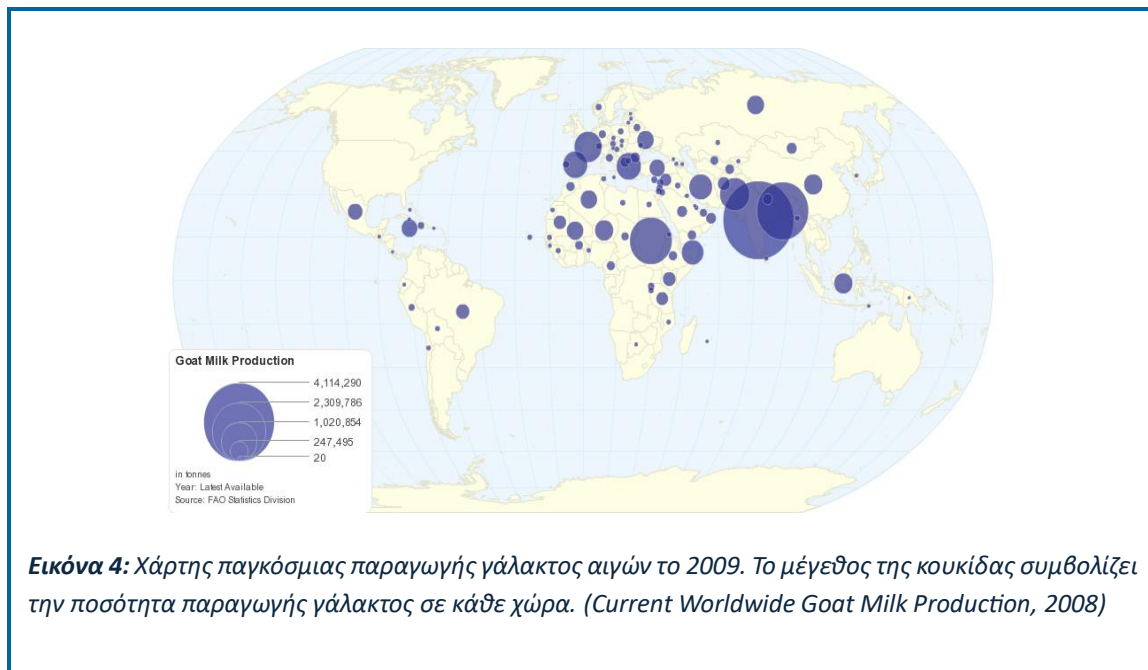
1.1.2 Μηχανισμός δράσης μυκοπλασμάτων

Τα μυκοπλάσματα έχουν αρκετές μεμβρανικές πρωτεΐνες που σχετίζονται με τα λιπίδια (lipid phosphate phosphatases - LPPs). Σε αντίθεση με τα βακτήρια με κυτταρικό τοίχωμα, τα οποία έχουν μικρότερο αριθμό αυτών των μορίων, τα δύο τρίτα της μάζας της μεμβράνης του μυκοπλάσματος αντιστοιχούν σε LPPs. Αυτά τα μόρια που εκτίθενται στην βακτηριακή επιφάνεια, μπορεί να έχουν τις ίδιες λειτουργίες με τις περιπλασματικές πρωτεΐνες στα Gram-αρνητικά βακτήρια και είναι γνωστό ότι μεσολαβούν στην προσκόλληση, την εισβολή, την ανοσοτροποποίηση και την ανοσολογική αποφυγή, παίζοντας σημαντικό ρόλο στην παθογένεια του μυκοπλάσματος (Barbosa et al 2022). Η κυτταρική προσκόλληση στα μυκοπλάσματα είναι απαραίτητη για τον αποικισμό και τη λοιμογόνο δράση του μυκοπλάσματος, καθώς τα μη προσκολλημένα μυκοπλασματικά στελέχη είναι μη λοιμώδη και έτσι θεωρείται σημαντικός παράγοντας παθογένειας (Hegde et al 2018). Αυτά τα βακτήρια έχουν ατελείς μεταβολικές οδούς και προσκολλώνται στα κύτταρα του ξενιστή για να λάβουν θρεπτικά συστατικά (Barbosa et al 2022). Τα περισσότερα μυκοπλάσματα διαθέτουν ένα 'όργανίδιο προσκόλλησης' στο οποίο συγκεντρώνονται αρκετές προσκολλητικές ουσίες και αυτό επιτρέπει την προσκόλληση του στα κύτταρα του ξενιστή και στην συνέχεια την διασπορά του μυκοπλάσματος. Σε κάποια μυκοπλάσματα έχει αποδειχθεί ότι μία δομή που μοιάζει με κάψουλα βρίσκεται στην εξωτερική επιφάνεια του κυττάρου και αυτή η δομή μπορεί να σχετίζεται με λοιμογόνο δράση, παρέχοντας στα μυκοπλάσματα την ικανότητα να αποφεύγουν το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή (Fleury et al 2001). Άλλα μυκοπλάσματα δεν έχουν συγκεκριμένη δομή για προσκόλληση αλλά εμφανίζουν ικανότητες κυτταρικής προσκόλλησης που προκαλούνται από άλλες πρωτεΐνες (Barbosa et al 2022). Τα μυκοπλάσματα αλληλεπιδρούν με ειδικούς κυτταρικούς υποδοχείς κάποιων κυττάρων του ξενιστή, όπως οι υποδοχείς TLR, και έτσι επηρεάζουν τα κυτταρικά μονοπάτια του ξενιστή. Κάποια σημαντικά μονοπάτια που επηρεάζονται είναι αυτά που εμπλέκονται στην δημιουργία φλεγμονής. Επίσης αρκετά στελέχη του μυκοπλάσματος καταστέλλουν τη μεταγραφική δραστηριότητα του παράγοντα p53, με αποτέλεσμα τη μειωμένη απόπτωση των κατεστραμμένων κυττάρων. Επιπλέον ορισμένα μυκοπλάσματα προκαλούν ογκογένεση καθώς έχει παρατηρηθεί συσσώρευση ανωμαλιών και φαινοτυπικών αλλαγών στα κύτταρα (εικόνα 3). Τα κύτταρα-στόχοι μπορεί να είναι τα επιθηλιακά κύτταρα και τα λευκοκύτταρα του ξενιστή (Benedetti et al 2020).



1.2 Τα μυκοπλάσματα προσβάλλουν και τις αίγες

Ένας από τους πολλούς ξενιστές του μυκοπλάσματος είναι οι αίγες (DaMassa et al 1992). Οι αίγες είναι από τα πρώτα ζώα που εξημερώθηκαν από τον άνθρωπο (Bhandari et al 2021) και είναι πολύ σημαντικά, καθώς αποτελούν πηγή κρέατος και γάλακτος. Οι αίγες μπορούν να επιβιώσουν σε περιοχές όπου είναι αδύνατον να επιβιώσουν άλλα γαλακτοπαραγωγικά ζώα όπως η αγελάδα (DaMassa et al 1992), αφού έχουν υψηλή προσαρμοστικότητα σε διαφορετικά περιβάλλοντα και έτσι εκτρέφονται σε όλο τον κόσμο (εικόνα 4). Υπάρχουν πάνω από 1.153 είδη αιγών ανά τον κόσμο οι οποίες ζουν παντού εκτός της Ανταρκτικής. Τα διάφορα αυτά είδη διαφέρουν μεταξύ τους κυρίως ως προς το μέγεθος και το είδος της παραγωγής, για παράδειγμα οι γαλακτοπαραγωγικές αίγες διαφέρουν από τις κρεατοπαραγωγικές. Το κρέας των αιγών αποτελεί εξαιρετική πηγή πρωτεϊνών, χαμηλό σε λιπαρά και χοληστερόλη και πλούσιο σε βιταμίνες και ιχνοστοιχεία. Το Γάλα των αιγών είναι ευρέως καταναλώσιμο και για πολλούς είναι ευκολότερο στην χώνεψη (Bhandari et al 2021).



1.2.1 Παθογένεια του μυκοπλάσματος στις Αίγες

Ανάμεσα στα πιο σημαντικά παθογόνα των αιγών είναι και το μυκόπλασμα, το οποίο προκαλεί σημαντικές απώλειες παγκοσμίως. Η κλινική εικόνα του μυκοπλάσματος συγχέεται εύκολα με άλλες ασθένειες των αιγών, με αποτέλεσμα το ζώο πολλές φορές να πεθαίνει (DaMassa et al 1992). Η μυκοπλασματική μόλυνση των αιγών μπορεί να προκαλέσει διάφορα συμπτώματα όπως πνευμονία, ασθένειες των ματιών, αρθρίτιδα, σηψαιμία (Todaro et al 2014) ασθένειες των γενετικών οργάνων, μαστίτιδα, κερατοεπιπευκίτηδα (Kumar et al 2014), μειωμένη ή πλήρη αναστολή της παραγωγής γάλακτος, θνησιμότητα, αποβολές και κακή ποιότητα ζωής. Τα συμπτώματα της ασθένειας συνήθως υποχωρούν μετά από ένα μήνα αλλά υπάρχει και η χρόνια μορφή που μπορεί να διαρκέσει πάνω από 3 μήνες (Todaro et al 2014). Οι πιο σημαντικές ασθένειες που προκαλούνται είναι η μεταδοτική πλευροπνευμονία των αιγών (CCPP) και η μεταδοτική αγαλακτία (Ca) (Nicholas et al 2002).

1.2.2 Μεταδοτική αγαλακτία (Ca)

Η μεταδοτική αγαλακτία (Contagious agalactia(Ca)) είναι από τις πιο σοβαρές ασθένειες στα μικρά μηρυκαστικά (Kumar et al 2014) με σημαντικές οικονομικές απώλειες (Todaro et al 2014) και υπάρχει στον κατάλογο των ζωικών ασθενειών που έχει θεσπίσει ο Παγκόσμιος Οργανισμός για την υγεία των Ζώων (OIE) (Pourmarat et al 2012). Αρχικά, τα μολυσμένα άτομα παρουσιάζουν κατάθλιψη, ανορεξία, πυρετό (Rahimabadi et al 2017), απροθυμία να ακολουθήσουν το κοπάδι (Kizil et al 2006) και στην συνέχεια παρουσιάζουν τα κύρια συμπτώματα της νόσου, δηλαδή μειωμένη παραγωγή ή έλλειψη παραγωγής γάλακτος, μαστίτιδα (Todaro et al 2014) με τον μαστό να είναι ζεστός και πρησμένος (Spickler et al 2018), αρθρίτιδα, κερατοεπιπευκίτηδα (Jafarizadeh et al 2017), σηψαιμία (Hajizadeh et al 2018), μειωμένη

ανάπτυξη, αποβολές στα ενήλικα ζώα, θνητότητα (Todaro et al 2014) σε σπάνιες περιπτώσεις πατατηρείται και διάρροια ή αναπνευστικά συμπτώματα όπως βήχας ή δύσπνοια (Spickler et al 2018). Παρατηρείται και στα αρσενικά και στα θηλυκά άτομα (Kumar et al 2014) παρόλο που η νοσηρότητα σχετίζεται περισσότερο με θηλυκά άτομα, τα οποία είτε είναι έγκυα είτε παράγουν γάλα (Todaro et al 2014). Η ασθένεια αυτή είναι υπεύθυνη για μεγάλες οικονομικές ελλείψεις κυρίως λόγω της νοσηρότητας παρά της θνησιμότητας στους παγκόσμιους πληθυσμούς αιγοπροβάτων (Kumar et al 2014) καθώς μπορεί να προκληθούν επιπλοκές όπως τύφλωση και αναπηρία. Παρατηρείται σε πάνω από 30 χώρες (Jafarizadeh et al 2017) και θεωρείται ενδημική στις μεσογειακές χώρες, και σε κάποιες περιοχές της Ασίας και της Αφρικής (Assuncao et al 2007).

Η μεταδοτική αγαλακτία συνήθως μεταδίδεται μέσω της αναπνευστικής οδού, της στοματικής οδού ή των μαστικών οδών (Hajizadeh et al 2018) και εξαπλώνεται γρήγορα σε όλο τον πληθυσμό (Bidhendi et al 2011). Η χρονική διάρκεια από την μόλυνση μέχρι την εμφάνιση της ασθένειας ποικίλει από μία εβδομάδα μέχρι δύο μήνες. Το μυκόπλασμα που προκαλεί κάθε φορά την ασθένεια μεταφέρεται μέσω της κυκλοφορίας του αίματος σε όργανα όπως τα μάτια, τον μαστό και τις αρθρώσεις. Σε μολυσμένα μηρυκαστικά, το μυκόπλασμα μπορεί να διατηρηθεί για 1 έως 8 χρόνια μετά το τέλος των συμπτωμάτων της νόσου, κάτι το οποίο αποτελεί πηγή μόλυνσης για τα υπόλοιπα ζώα (Hajizadeh et al 2018). Η κύρια οικονομική επίπτωση είναι στην ποιότητα και την ποσότητα του γάλακτος. Στα δείγματα γάλακτος των αιγών που έχουν εμφανιστεί τα συμπτώματα της αγαλακτίας, κυρίως μαστίτιδα, έχουμε αυξημένο αριθμό σωματικών κυττάρων κάτι το οποίο δεν συμβαίνει στις ασυμπτωματικές αίγες. Δηλαδή ο αριθμός των σωματικών κυττάρων στα δείγματα γάλακτος διασφαλίζει την ποιότητα του (Contreras et al 2008).

Η μεταδοτική αγαλακτία προκαλείται κυρίως από 5 είδη μυκοπλάσματος, το *Mycoplasma agalactiae*, *Mycoplasma putrefaciens*, *Mycoplasma Mycoides subsp. Capri*, *Mycoplasma capricolum subsp. Capricolum* (Jafarizadeh et al 2017), *Mycoplasma mycoides subsp. Mycoides large colony type*. Τα κύρια μυκοπλάσματα που προκαλούν την μεταδοτική αγαλακτία στις περισσότερες μεσογειακές χώρες είναι το *Mycoplasma Agalactiae* και το *Mycoplasma Mycoides subsp. Capri* (Amores et al 2010). Η κλινική συμπεριφορά της μεταδοτικής αγαλακτίας ποικίλει και εξαρτάται άμεσα από το παθογόνο μυκόπλασμα το οποίο εμπλέκεται στην ασθένεια, το στοχευμένο είδος, την φυλή, τον τύπο της εκτροφής ή τον βαθμό εξημέρωσης των μυρिकाστικών (Migliore et al 2021).

1.2.3 Μεταδοτική πνευμονία των Αιγών (CCPP)

Η μεταδοτική πνευμονία των Αιγών (contagious caprine pleuropneumonia (CCPP)) προκαλείται κυρίως από *Mycoplasma capricolum subsp. Capripneumoniae* αλλά και άλλα είδη μυκοπλάσματος προκαλούν την συγκεκριμένη νόσο όπως είναι το *Mycoplasma mycoides subsp. Mycoides Small colony type* και το *Mycoplasma mycoides subsp. Capri*. Είναι ευρέως γνωστό ότι προκαλούν σημαντικές απώλειες στις αίγες (Nicholas, 2002). Η ασθένεια χαρακτηρίζεται από πολύ υψηλή νοσηρότητα (περίπου 100%) και θνησιμότητα (80-100%), επηρεάζοντας τις αίγες σε πάνω από 40 χώρες όλου του κόσμου και αποτελώντας σημαντική απειλή. Τα αρχικά κλινικά

συμπτώματα της νόσου είναι η ρινική έκκριση, βήχα, δύσπνοια, πυρεξία, γενική αδιαθεσία και σε μεταγενέστερα στάδια τα άτομα παρουσιάζουν σοβαρή πνευμονοπνευμονία, συσώρευση υγρού στην υπεζωκοτική κοιλότητα, συμφώρηση πνευμόνων και σχηματισμός συμφύσεων (Yatoo et al 2019).

1.3 *Mycoplasma agalactiae* (Ma)

1.3.1 Μεταδοτικότητα

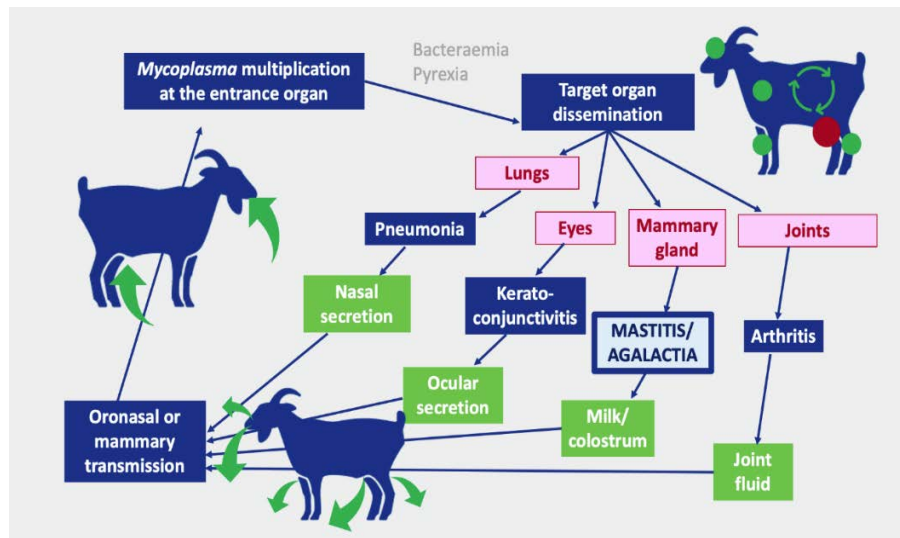
Το *Mycoplasma Agalactiae* είναι ένα πολυμορφικό βακτήριο με μέγεθος μεταξύ 124 – 250 νανόμετρα και έχει ένα πολύ μικρό γονιδίωμα (Kumar et al 2014). Έχει απομονωθεί κυρίως από τις χώρες της μεσογείου και από τις χώρες της μέσης ανατολής, στις οποίες φαίνεται να είναι ευρέως διασκορπισμένο (Hotzel et al 2003). Είναι μία ασθένεια που πλήττει κυρίως τα ζώα που ζουν σε περιθωριακές εκτάσεις, μολύνοντας κυρίως αίγες που εκτρέφονται για γάλα και γαλακτοκομικά προϊόντα και συνήθως χρησιμοποιούν παραδοσιακές μεθόδους κτηνοτροφίας που περιλαμβάνουν χειροκίνητη αρμέγηση, αντί για παραγωγή βιομηχανικής κλίμακας (Rosales et al 2017). Η μετάδοση του μυκοπλάσματος γίνεται κυρίως από μολυσμένα άτομα σε υγιή μέσω της επαφής. Οι κύριες πηγές μόλυνσης είναι οι εκκρίσεις από τα αυτιά, τα μάτια, την μύτη καθώς και μέσω των κοπράνων, του γάλακτος, των ούρων και των εκκρίσεων από αρθρικές βλάβες. Έχει αναφερθεί επίσης ότι μπορεί να μεταδοθεί μέσω σεξουαλικής επαφής από μολυσμένο αρσενικό, στο θηλυκό (Kumar et al 2014). Η μόλυνση μπορεί να γίνει και από άλλες πηγές όπως από κοινά βοσκοτόπια ή πηγές νερού με άλλα ζώα που πάσχουν (Rosales et al 2017). Υπάρχουν αναφορές για έκκριση μυκοπλάσματος στο γάλα ακόμα και μετά από 8 χρόνια μόλυνσης με ήπια ή χωρίς κλινικά συμπτώματα. Έτσι η παρουσία συμπτωματικών φορέων μυκοπλάσματος σε ένα κοπάδι είναι σημαντική ανησυχία. Η παρουσία των αντισωμάτων μπορεί να παρατηρηθεί μέχρι 8 χρόνια κλινικής νόσου σε αίγες (Kumar et al 2014).

Το *Mycoplasma Agalactiae* μολύνει οικόσιτα είδη όπως πρόβατα, αγελάδες καθώς και άγρια είδη όπως: καμήλες (Kumar et al 2014), *Capra Pyrenaica*, *Capra ibex ibex*, *Rupicapra rupicapra*, *Capreolus capreolus* και *Cervus elaphus*. (Spickler et al 2018), έτσι αποτελεί σημαντική απειλή για την πυκνότητα των αγρίων αυτών πληθυσμών, όπως επίσης και για την συντήρηση αυτών. Έχουν παρατηρηθεί στελέχη του μυκοπλάσματος στο είδος *Capra pyrenaica* στην Ισπανία, τα οποία στελέχη φαίνεται να έχουν προέλθει από ένα άλλο είδος αγρίου μηρυκαστικού (τσακάλι) το οποίο υπάρχει στην ίδια γεωγραφική περιοχή. Αυτό μας δείχνει ότι τα άγρια είδη μηρυκαστικών λειτουργούν ως δεξαμενή παθογόνων μικροοργανισμών (Kumar et al 2014).

1.3.2 Παθογένεια

Το *Mycoplasma Agalactiae* είναι το κύριο μυκόπλασμα που προκαλεί την μεταδοτική αγαλακτία (ευθύνεται για το 90% των περιπτώσεων αγαλακτίας) το οποίο κυρίως μολύνει αίγες και πρόβατα αλλά και διάφορα άγρια είδη μηρυκαστικών (Kumar et al 2014), με κύρια κλινικά συμπτώματα την μαστίτιδα, αρθρίτιδα και κερατοεπιπευκίτηδα (Hotzel et al 2003). Παρατηρείται επίσης και αδυναμία κυρίως στα αρσενικά ζώα (Kizil et al 2006). Η κύρια περίοδος εμφάνιση της

νόσου είναι κατά την περίοδο του ζεστού και υγρού καλοκαιριού κατά την οποία ευνοείται η ανάπτυξη του μυκοπλάσματος. Η ασθένεια εμφανίζεται ως χρόνια ή επίμονη λοίμωξη και διαρκεί συνήθως για μήνες, κατά τους οποίους παρατηρούνται κλινικά θετικά ζώα (Kumar et al 2014).



Εικόνα 5: Περιγραφή οργάνων στόχων, παθογένειας και τρόπου μετάδοσης του *Mycoplasma Agalactiae* μεταξύ των αιγών (Puerta et al 2021).

Η κύρια θέση ανάπτυξης του μυκοπλάσματος είναι η βλεννογόνος μεμβράνη της αναπνευστικής οδού και των μαστικών αδένων (εικόνα 5). Η μόλυνση του συνδετικού ιστού στους μαστούς των αιγών προκαλεί φλεγμονή που μετατρέπεται τελικά σε καταρροϊκή ή παρεγχυματική μαστίτιδα, που οδηγούν σε ατροφία των μαστών και αγαλαξία. Τα ζώα που υποφέρουν από μαστίτιδα μπορούν να μολύνουν τα νεαρά μέσω του κολλοστού ή του γάλακτος. (Kumar et al 2014). Έχουν παρατηρηθεί και βλάβες στους πνεύμονες που προκαλούνται από το *Mycoplasma Agalactiae*, το οποίο συμβαίνει σπάνια, (DaMassa et al 1992) καθώς και εκκρήξεις πλευρίτιδας σε αίγες (Kumar et al 2014). Παρατηρείται επίσης επικίνδυνη διόγκωση των αρθρώσεων με την συσώρευση συνοβιακού (αρθρικού) υγρού, κυρίως στους καρπούς και τους αστραγάλους, που προκαλεί αρθρίτιδα (DaMassa et al 1992). Στην χρόνια μορφή της μόλυνσης παρατηρείται και αγκύλωση των άκρων. Οι προσβολές στο μάτι προκαλούν σημαντικές απώλειες του κερατοειδούς, οδηγώντας σε τύφλωση μέσω αγγείωσης και κερατοεπιπευκίτιδας. Προσβολές των αναπαραγωγικών οργάνων παρατηρούνται επίσης σε περιστασιακές αποβολές ή θνητότητα σε έγκυα ζώα, κυρίως λόγω φλεγμονής της μήτρας. Στα αρσενικά ζώα μπορεί να παρατηρηθεί φλεγμονή των όρχεων. Τα ζώα που είναι ευαίσθητα στην μόλυνση είναι κυρίως τα νεαρά, υποσιτισμένα, έγκυα και ανοσοκατεσταλμένα ζώα (Kumar et al 2014).

1.3.3 Μηχανισμός Δράσης

Το *Mycoplasma Agalactiae* αρχικά θεωρούνταν επιφανειακό παθογόνο, αλλά αποδείχθηκε ότι εισβάλλει στα κύτταρα του ξενιστή και εξαπλώνεται στο εσωτερικό του (Hegde et al 2018). Ο κύριος μηχανισμός με τον οποίο η μόλυνση από *Mycoplasma Agalactiae* βλάπτει τα κύτταρα του ξενιστή δεν είναι απόλυτα σαφής και η πιο αξιόπιστη υπόθεση θεωρεί την ανοσολογική απόκριση του ξενιστή ως την κύρια υπεύθυνη για την υπερβολική φλεγμονή και την επακόλουθη καταστροφή των ιστών (Benedetti et al 2020). Το *Mycoplasma Agalactiae* διαθέτει μία ιδιαίτερη ικανότητα να τροποποιεί τις μεμβρανικές λιποπρωτεΐνες του, επιτρέποντας στο βακτήριο να ξεφύγει από την ανοσολογική άμυνα του ξενιστή, κάτι το οποίο είναι ένας γνωστός μηχανισμός που εμπλέκεται στην παθογένεια του, με την δομή αυτών των μεμβρανικών λιπιδίων να είναι γνωστή (Fleury et al 2001). Έτσι το *Mycoplasma Agalactiae* διαθέτει και κάποιες σταθερές μεμβρανικές πρωτεΐνες όπως η πρωτεΐνη P30, η κυταδεσίνη P40, η πρωτεΐνη P48, η λιποπρωτεΐνη MAG_5040, η πυροσταφυλική αφυδρογονάση και η Vrms οι οποίες επίσης ευθύνονται για την παθολογικότητα του συγκεκριμένου μυκοπλάσματος. Οι λιποπρωτεΐνες P40, πυροσταφυλική αφυδρογονάση και οι Vrms έχουν περιγράψει ως προσκολλητικές ή και εισβολικές πρωτεΐνες. Έχει επίσης αποδειχθεί ότι στα μυκοπλάσματα οι προσκολλητίνες μπορούν να αναγνωρίσουν περισσότερους από έναν στόχους και ένας στόχος μπορεί επίσης να συνδεθεί με περισσότερες από μία προσκολλητίνες (Barbosa et al 2022). Οι πρωτεΐνες του περιβλήματος, οι προκλητικές ουσίες και οι μεταφορείς είναι τυπικές πρωτεΐνες της μεμβράνης του μυκοπλάσματος, ενώ η διακύμανση φάσης ή και η δυσλειτουργία της έκφρασης των κυτοκινών είναι χαρακτηριστικά μέσω των οποίων μπορούν να αποφύγουν την ανοσολογική απόκριση του ξενιστή (Rosati et al 2000).

Η in vitro μόλυνση των κυττάρων HeLa με *Mycoplasma Agalactiae* οδήγησε σε ορισμένες μορφολογικές αλλαγές, δηλαδή επιμήκυνση των κυττάρων, συρρίκνωση του κυτταροπλάσματος και σχηματισμό φυσαλίδων στην μεμβράνη. Αυτές οι αλλαγές μαζί με τη συμπύκνωση της χρωματίνης και την αυξημένη ενεργοποίηση της κασπάσης-3, υποδεικνύουν ένα φαινόμενο παρόμοιο με την απόπτωση που οδηγεί σε μειωμένη βιωσιμότητα των κυττάρων και αυξημένη κυτταρική λύση. Επιπλέον, παρατηρήθηκε μια συσχέτιση με το αντιγόνο του *Mycoplasma agalactiae* και την παραγωγή IL-10, IFN-γ, IL-4 και TNF-α σε ένα πειραματικό in vitro μοντέλο που αποτελείται από φλεγμονώδη κύτταρα μαστικών ιστών από αίγες μολυσμένες με *Mycoplasma Agalactiae* (εικόνα 3) (Benedetti et al 2020).

1.4 *Mycoplasma mycoides* cluster

Η κλάση μυκοπλάσματος Mycoides περιλαμβάνει έξι είδη και υποείδη, ορισμένα από τα οποία είναι σημαντικοί παθογόνοι παράγοντες για τα μικρά θηλαστικά με σοβαρές και μεταδοτικές ασθένειες στις αίγες. Τα μυκοπλάσματα Mycoides είναι στενά αλληλοσυνδεδεμένα τόσο ορολογικά όσο και γενετικά (Kumar et al 2011) και περιλαμβάνουν τα είδη: *Mycoplasma mycoides* subsp. *Small colony type* (MmmSC), *Mycoplasma mycoides* subsp. *Mycoides Large colony type*, *Mycoplasma mycoides* subsp. *Capri* (Mmc), *Mycoplasma cpricum* subsp. *Capricolum* (Mcc),

Mycoplasma capricolum subsp. Capripneumoniae (Mccp) (Grand et al 2004), *Mycoplasma Leachii* (Kumar et al 2011).

Εκτός από το *Mycoplasma mycoides subsp. Mycoides Small colony type* και το *Mycoplasma capricolum subsp. Capripneumoniae* που ευθύνονται για μεταδοτικές πνευμονίες, και το *Mycoplasma Lechii* που προκαλεί αρθρίτιδα και μαστίτιδα στα βοοειδή (Kumar et al 2011)., τα άλλα είδη, δηλαδή το *Mycoplasma mycoides subsp. Capri*, *Mycoplasma mycoides subsp. Mycoides Large colony type* και το *Mycoplasma capricolum subsp. capricolum* προκαλούν μαστίτιδα, αρθρίτιδα, κερατοεπιπευκίτηδα, πνευμονία και σηψαιμία στις αίγες. Όμως τα γονίδια 16S rRNA των *Mycoplasma mycoides subsp. Mycoides Large colony type* και *Mycoplasma mycoides subsp. Capri* έχουν 99,9% ομοιότητα το οποίο υποδηλώνει ότι πρέπει να θεωρούνται ένα είδος ανεξάρτητο από το *Mycoplasma mycoides subsp. Mycoides Small colony type*. (Grand et al 2004).

1.4.1 *Mycoplasma mycoides subsp. mycoides Small colony type* (MmmSC)

Το *mycoplasma mycoides subsp. Mycoides small colony type* (MmmSC) είναι ο αιτιολογικός παράγοντας της μεταδοτικής πλευροπνευμονίας των βοοειδών (CBPP) (H. Hotzel J. F et al 2003), όμως έχει παρατηρηθεί ότι κάποια στελέχη μολύνουν και τις αίγες προκαλώντας μεταδοτική πλευροπνευμονία των αιγών (CCPP). Η ασθένεια που προκαλεί μπορεί να μην εντοπιστεί για μήνες, μέχρι να παρατηρηθούν αλλοιώσεις στο σφαγείο. Στις καλλιέργειες, το MmmSC δημιουργούν μικρά στελέχη αποικιών, που τα ξεχωρίζει από το *Mycoplasma mycoides subsp. Mycoides Large colony type* (Nicholas et al 1995). Το MmmSC θεωρείται το πιο παθογόνο προκαλώντας φλεγμονή κυρίως στους πνεύμονες του ξενιστή, συγκεκριμένα προκαλεί πύκνωση των πνευμόνων οδηγώντας σε αναπνευστική δυσχέρεια και θάνατο στο 25-35% των περιπτώσεων. Στη πλειοψηφία όμως των περιπτώσεων, στα μολυσμένα ζώα η πλευροπνευμονία παίρνει χρόνια μορφή, αφού τα ζώα αναρρώσουν από το οξύ στάδιο της νόσου. Εκτός από φλεγμονή παρατηρήθηκε επίσης και αύξηση των ενεργών ριζών οξυγόνου (ROS) τα οποία παράγονται από τον μεταβολισμό της γλυκερόλης κατά την ενεργοποίηση των λευκοκυττάρων του ξενιστή (εικόνα 3) (Benedetti et al 2020).

1.4.2 *Mycoplasma mycoides subsp. Capri* (Mmc)

Η μόλυνση από το *Mycoplasma mycoides subsp. Capri* παρουσιάζει πυρετό, ρηνικές εκκρίσεις, δυσκολία στην αναπνοή, πτώση των αυτιών και χαμηλή παραγωγή γάλακτος και τα κλασσικά συμπτώματα αγαλαξίας χωρίς όμως να παρουσιάζει αρθρίτιδα (Hernandez et al 2006). Τα ποσοστά θνησιμότητας που συνδέονται με το συγκεκριμένο μυκόπλασμα είναι πολύ μικρότερα σε σχέση με τη θνητότητα που προκαλεί το *Mycoplasma capricolum subsp. Capripneumoniae* και κυμαίνονται από 9,8-26,8% (Subbaiyan et al 2020). Το Mmc μπορεί να ανακτηθεί από δείγμα του έξω ακουστικού πόρου υγιών κοπαδιών γαλακτοπαραγωγικών αιγών και από δείγμα σπέρματος ασυμπτωματικών ελαφιών (Corona et al 2013).

1.5 *Mycoplasma putrefaciens* (Mp)

Το *Mycoplasma putrefaciens* προκαλεί αρθρίτιδα και μαστίτιδα και είναι γενετικά στενά συνδεδεμένο με το *Mycoplasma mycoides cluster* (Grand et al 2004). Το *Mycoplasma putrefaciens* προκαλεί με την προσβολή του αύξηση του ποσοστού των λευκοκυττάρων στο γάλα εντός 8 ημερών (Adler et al 1980). Έχει αναφερθεί επίσης ότι προκαλεί μία μυρωδιά σάπιου στο γάλα των αιγών που έχουν προσβληθεί (Sprickler et al 2018). Τα κύρια χαρακτηριστικά της λοίμωξης του συγκεκριμένου μυκοπλάσματος στον μαστό είναι η έλλειψη κλινικών συμπτωμάτων με την ταυτόχρονη ταχεία ανάπτυξη των μικροοργανισμών με αποτέλεσμα την εμφάνιση κυττάρων φλεγμονής στο γάλα και πλήρη διακοπή της γαλουχίας (Adler et al 1980).

1.6 Μοριακή Ανίχνευση

Η μοριακή ανίχνευση του Μυκοπλάσματος γίνεται συνήθως είτε με καλλιέργεια του δείγματος για την απομόνωση και ταυτοποίηση του, είτε με την χρήση της μεθόδου αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR). Έχουν υπάρξει και μελέτες που προσπάθησαν να εντοπίσουν τα είδη μυκοπλάσματος που προκαλούν μεταδωτική αγαλακτία και ανιχνεύονται στο γάλα με κυτταρομετρία ροής (Assuncao et al 2007), καθώς και με την μέθοδο ELISA (Pourmarat et al 2012).

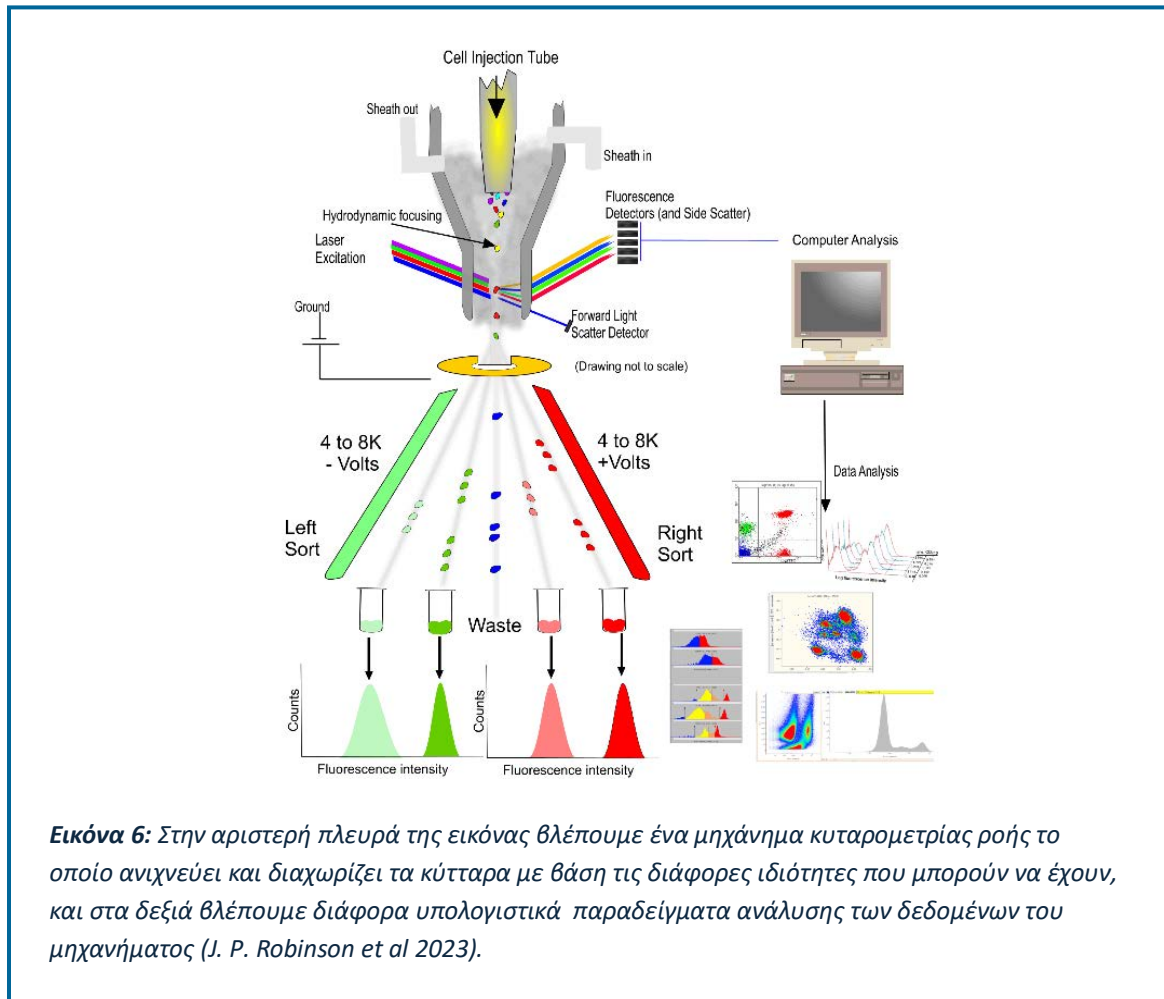
1.6.1 Καλλιέργεια

Για να παρθούν αποτέλεσμα από τις καλλιέργειες των δειγμάτων από δείγματα γάλακτος από δεξαμενές, η καλλιέργεια πρέπει να γίνει τις πρώτες 24 ώρες από την συλλογή του δείγματος (Tatay-Dualde et al 2015). Η καλλιέργεια του μυκοπλάσματος είναι χρονοβόρα καθώς απαιτούνται αρκετές μέρες για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών αυτών (Hotzel et al 1996). Συγκεκριμένα για την ανίχνευσή του μυκοπλάσματος, τα δείγματα καλλιεργούνται σε πλάκες άγαρ για 7 ημέρες στους 37°C. Η διαδικασία αυτή είναι πολύ χρονοβόρα, δαπανηρή, δύσκολη να επιτευχθεί για το μυκόπλασμα και μπορεί επίσης να δείξει και ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα. (Kheirkhah et al 2019)

1.6.2 Κυτταρομετρία ροής

Ως μέθοδος Μοριακής Ανίχνευσης σε γάλα αιγών έχει χρησιμοποιηθεί και η κυτταρομετρία ροής, η οποία είναι μια ευαίσθητη διαδικασία και είναι ταυτόχρονα και ποιοτική και ποσοτική (Gunasekera et al 2000). Κατά την κυτταρομετρία ροής (εικόνα 6) τα κύτταρα ή τα σωματίδια ενός διαλύματος, αναλύονται καθώς περνάει, ένα κύτταρο κάθε φορά, από ένα ή από πολλαπλά λέιζερ μετρώντας και το μέγεθος και την εσωτερική πολυπλοκότητα. Η σκέδαση του φωτός είναι ανεξάρτητη από τον φθορισμό. Για την μέτρηση φθορισμού τα δείγματα προετοιμάζονται είτε με έκφραση φθορίζουσών πρωτεϊνών είτε με χρώση με φθορίζουσες χρωστικές είτε με φθορίζοντα συζευγμένα αντισώματα (McKinnon et al 2018). Κατά την κυτταρομετρία ροής μπορεί να γίνει επίσης και ταξινόμηση των κυττάρων (Telford et al 2023). Για την εφαρμογή της μεθόδου σε δείγματα κατσικίσιου γάλακτος πρέπει να προστεθεί το κατάλληλο ρυθμιστικό διάλειμμα και μία χρωστική, όπως η SYBER GREEN. Με την ανάλυση των δειγμάτων γίνεται διαχωρισμός των μυκοπλασματικών κυττάρων από τα υπόλοιπα συστατικά του

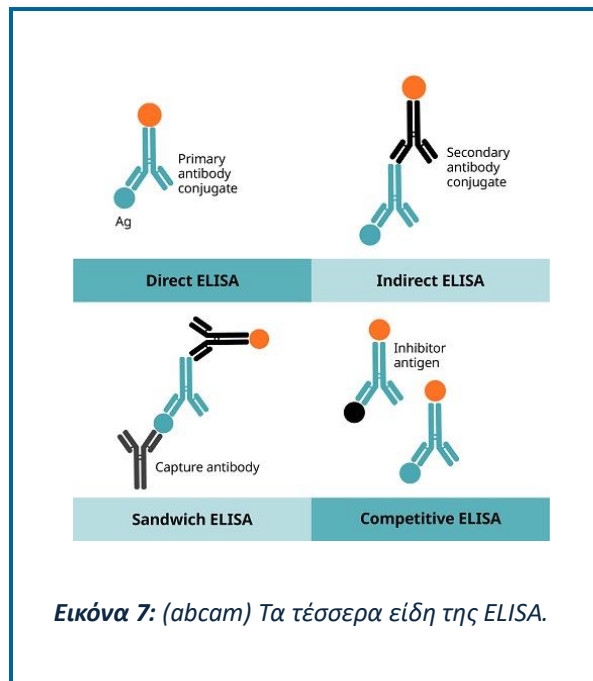
γάλακτος. Όμως η κυτταρομετρία ροής δεν δίνει την δυνατότητα της ανίχνευσης των διαφορετικών ειδών μυκοπλάσματος που μπορεί να υπάρχουν σε ένα δείγμα γάλακτος (Assuncao et al 2007).



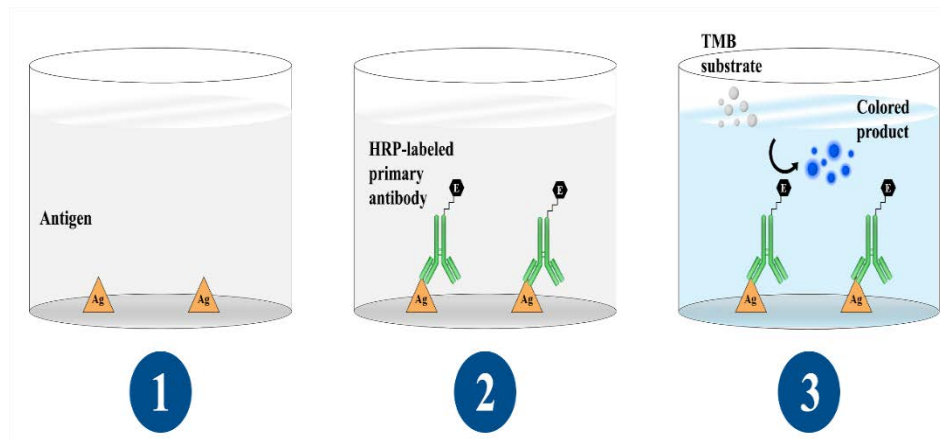
Εικόνα 6: Στην αριστερή πλευρά της εικόνας βλέπουμε ένα μηχάνημα κυτταρομετρίας ροής το οποίο ανιχνεύει και διαχωρίζει τα κύτταρα με βάση τις διάφορες ιδιότητες που μπορούν να έχουν, και στα δεξιά βλέπουμε διάφορα υπολογιστικά παραδείγματα ανάλυσης των δεδομένων του μηχανήματος (J. P. Robinson et al 2023).

1.6.3 ELISA

Η μέθοδος ELISA είναι μία μέθοδος μοριακής ανίχνευσης που βασίζεται στην ύπαρξη επιφανειακών πρωτεϊνών στην πλασματική μεμβράνη του μυκοπλάσματος (Hotzel et al 1996). Οι πρωτεΐνες αυτές αναγνωρίζονται από γνωστά σε εμάς μονοκλωνικά αντισώματα και δεσμεύονται απελευθερώνοντας μία χρωστική, της οποίας η ποσότητα μετριέται φωτομετρικά. Υπάρχουν τέσσερα είδη ELISA (εικόνα 7), η άμεση ELISA, η έμμεση ELISA, η ELISA σάντουιτς και η ανταγωνιστική ELISA. Για όλες τις μεθόδους ELISA συνήθως χρησιμοποιούνται πλάκες πολυστρενίου με 96 πηγάδια.



Η άμεση (Direct) ELISA (εικόνες 7,8) είναι η απλούστερη και η γρηγορότερη αντίδραση από τις υπόλοιπες τρείς. Αρχικά προσθέτουμε το δείγμα στις πλάκες, για να κολλήσουν τα αντιγόνα του δείγματος στις πλάκες, και κάνουμε πλύση. Έπειτα τοποθετούμε ένα σημασμένο με ένζυμο αντίσωμα το οποίο συνδέεται στο αντιγόνο του δείγματος. Γίνεται πλύση και τοποθετείται το υπόστρωμα του ενζύμου, των οποίων η αντίδραση μας δίνει έγχρωμο προϊόν, η ποσότητα του οποίου ανιχνεύεται φωτομετρικά. (Bajare et al 2023).



Εικόνα 8: (ATT Bioquest, 2020) Μέθοδος άμεση ELISA κατά την οποία το αντιγόνο είναι προσκολλημένο στα φρεάτια μιας πλάκας πολυστυρενίου και ένα σημασμένο με ένζυμο πρωτογενές αντίσωμα ειδικό για το αντιγόνο στόχο προστίθεται στο φρεάτιο και συνδέεται απευθείας με το αντιγόνο, στην συνέχεια προστίθεται ένα κατάλληλο ενζυμικό υπόστρωμα το οποίο αντιδρά με το ένζυμο και προσδίδει μία χρωματική αλλαγή της οποίας η ένταση προσδιορίζεται φωτομετρικά (Bajare et al 2023).

Η έμμεση (Indirect) ELISA (εικόνα 7) είναι ευρέως χρησιμοποιούμενη και η διαφορά της με την άμεση είναι ότι δεν είναι το πρωτογενές αντίσωμα εκείνο που συνδέεται με το αντιγόνο αλλά ένα δευτερογενές το οποίο στην συνέχεια συνδέεται με το πρωτογενές και όταν προσθέσουμε το υπόστρωμα του μας δίνει πάλι έγχρωμο προϊόν (Aydin et al 2025).

Η μέθοδος ELISA σάντουιτς (εικόνα 7) είναι η πιο ευαίσθητη μέθοδος και χρησιμοποιείται για την ποσοτικοποίηση ενός αντιγόνου σε ένα άγνωστο δείγμα. Αρχικά προστίθεται στην πλάκα ένα αντίσωμα το οποίο αναγνωρίζει το αντιγόνο του δείγματος, στην συνέχεια προστίθεται ένα δεύτερο αντίσωμα που αναγνωρίζει το αντιγόνο. Τέλος, προστίθεται ένα άλλο αντίσωμα βιοτινυλιωμένο που ανιχνεύει το συλληφθέν αντίσωμα (Bajare et al 2023).

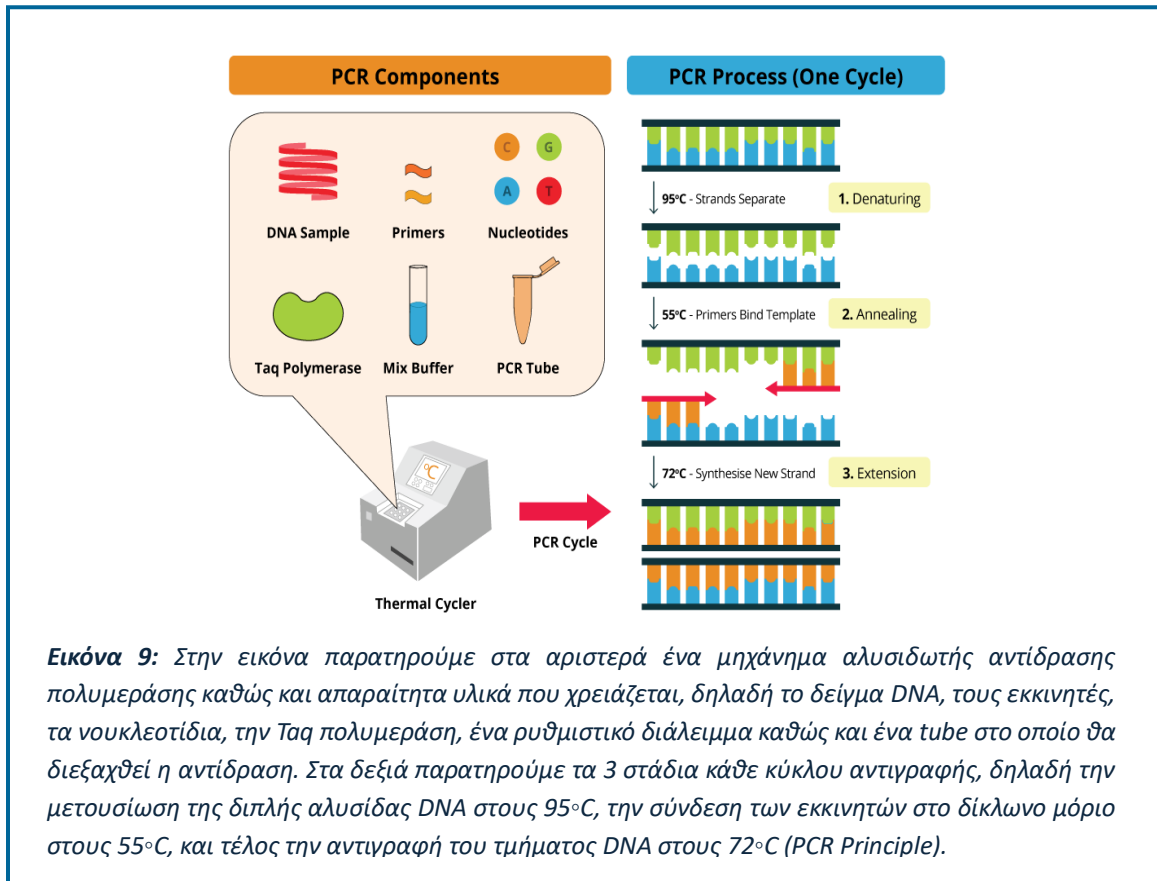
Η Ανταγωνιστική ELISA (εικόνα 7) είναι μία μέθοδος που χρησιμοποιείται για την μέτρηση των αντισωμάτων. Σε αυτή την μέθοδο, η εσωτερική επιφάνεια της πλάκας επικαλύπτεται με αντιγόνο, το οποίο είναι επισημασμένο με ένα ένζυμο δείκτη. Το αντιγόνο του ασθενούς και το επισημασμένο αντιγόνο ανταγωνίζονται για την σύνδεση με το αντίσωμα.

Υπάρχουν επίσης και άλλες δύο μέθοδοι. Η Άμεση κυτταρική ELISA χρησιμοποιείται για την ανίχνευση αντιγόνων και υποδοχέων της κυτταρικής μεμβράνης, δηλαδή τα ενζυμικά σημασμένα αντιγόνα προστίθενται απευθείας στο δείγμα κυττάρων. Η Έμμεση κυτταρική ELISA χρησιμοποιείται πάλι για την ανίχνευση αντισωμάτων της κυτταρικής επιφάνειας με την μόνη διαφορά ότι χρησιμοποιούνται δύο αντισώματα για τον εντοπισμό του αντιγόνου (Aydin et al 2025).

Γενικά οι πρωτεΐνες που στοχεύει η μέθοδος ELISA είναι είτε τα συνολικά αντιγόνα του μυκοπλασματικού στελέχους είτε πρωτεΐνες σύντηξης είτε αντίγραφα κάποιων εξειδικευμένων ανοσογόνων πρωτεϊνών. Η διαγνωστική εξειδίκευση και ευαισθησία της μεθόδου ποικίλει.

Οι διαφορές εξηγούνται ανάλογα το είδος του ζώου, την γεωγραφική τοποθεσία ή το στάδιο μόλυνσης (Pourmarat et al 2012). Όμως δεν μπορούμε να αποκλείσουμε την σύνδεση των μοκλωνικών αντισωμάτων σε πρωτεΐνες άλλων ειδών (Hotzel et al 1996).

1.6.4 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)



Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) θεωρείται μία ταχεία και απλή μέθοδος η οποία διαθέτει υψηλή ευαισθησία (Kheirkhah et al 2019). Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR), είναι μία τεχνική ενίσχυσης νουκλειικών οξέων. Η PCR χρησιμοποιεί την Taq πολυμεράση, μία DNA πολυμεράση η οποία απομονώνεται από το *Thermus aquaticus* και η δράση της ευνοείται σε πολύ υψηλές θερμοκρασίες ενώ με την βοήθεια κατάλληλων εκκινητών αντιγράφει τμήματα DNA. Η τεχνική (εικόνα 9) απαιτεί ένα δείγμα DNA που επιθυμούμε να ενισχύσουμε, δύο πρωταρχικά τμήματα τα οποία είναι συμπληρωματικά και αντιπαράλληλα με την περιοχή του DNA που επιθυμούμε να ενισχύσουμε και με κατεύθυνση 5'→3' (αφού η DNA πολυμεράση ενισχύει μόνο τμήματα με την κατεύθυνση αυτή), δεοξυριβονουκλεοτίδια, την πολυμεράση Taq, ένα ρυθμιστικό διάλυμα και νερό. Η διαδικασία της PCR αποτελείται από τρία στάδια, αρχικά το

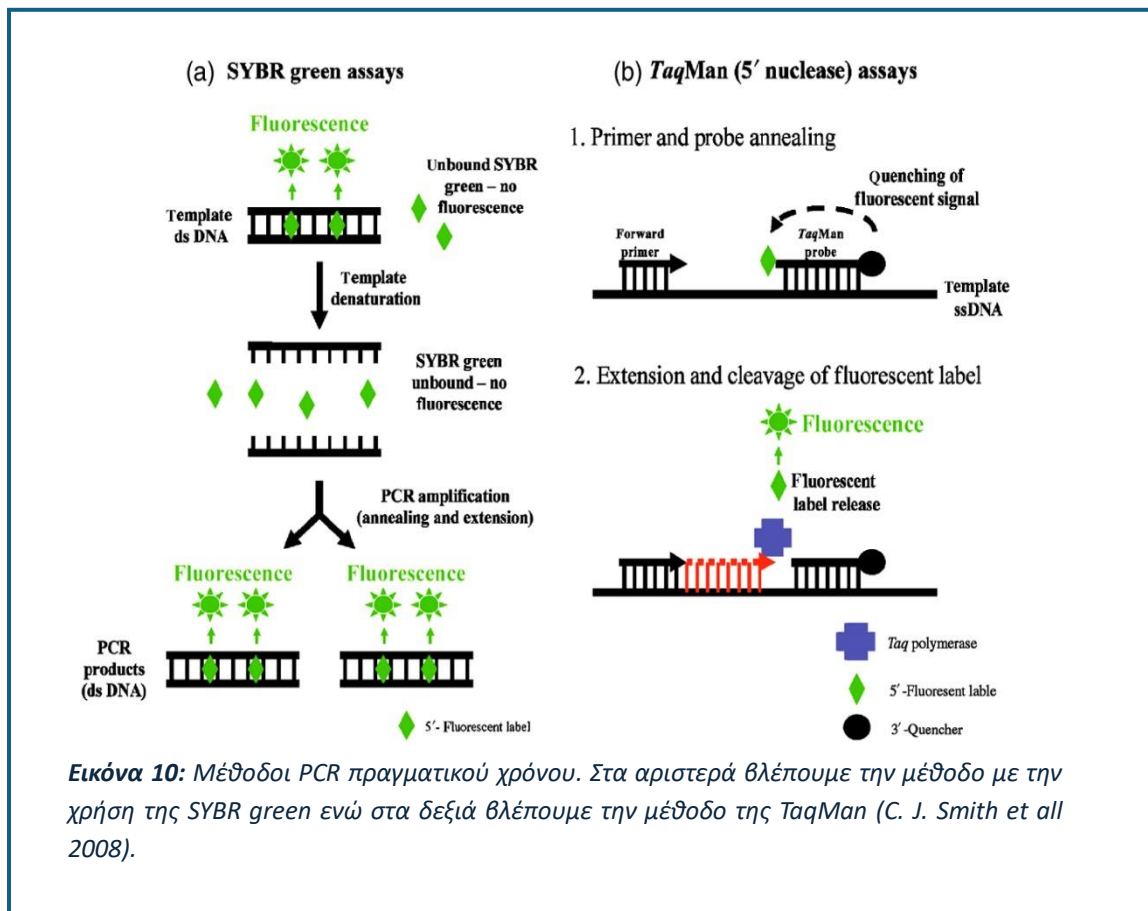
DNA θερμαίνεται στους 95°C για να σπάσουν οι δεσμοί υδρογόνου μεταξύ των συμπληρωματικών αζωτούχων βάσεων, στην συνέχεια έχουμε πτώση της θερμοκρασίας στους 55-72°C για να συνδεθούν οι εκκινητές με τις συμπληρωματικές αλληλουχίες τους πάνω στο DNA και τέλος έχουμε την αντιγραφή του DNA σε θερμοκρασία 75-80°C, η οποία θερμοκρασία είναι βέλτιστη για την δράση της πολυμεράσης Taq. Κάθε στάδιο θεωρείται ένας κύκλος και η παραπάνω διαδικασία επαναλαμβάνεται για περίπου 40 κύκλους (Khehra et al 2025).

1.6.6 Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου RT-qPCR

Η ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου ή αλλιώς RT-qPCR είναι μια αντίδραση ενίσχυσης αλληλουχίας η οποία παράλληλα ελέγχει την ποσότητα του προϊόντος που παράγεται. Βασίζεται στην ανίχνευση φθορισμού για την καταγραφή της συσσώρευσης μεταγραφωμάτων σε πραγματικό χρόνο, συγκεκριμένα χρησιμοποιούνται συνήθως δύο μέθοδοι, η SYBR green και η TaqMan (Smith et al 2008).

Η SYBR green (εικόνα 10) συνδέεται με όλα τα δίκλινα μόρια DNA που υπάρχουν στο διάλυμα αφού εισχωρεί ανάμεσα στα συμπληρωματικά ζεύγη βάσεων, δηλαδή ανάμεσα στις δύο συμπληρωματικές και αντιπαράλληλες αλυσίδες DNA που σχηματίζονται. Όταν η SYBR green συνδέεται με το DNA, μέσω διέγερσης με φως, εκπέμπεται πράσινο φθορίζον σήμα. Η ποσότητα του φθορισμού εξαρτάται από την ποσότητα των δίκλωνων μορίων DNA, άρα όσο αυξάνονται τα μεταγραφώματα του DNA τόσο αυξάνεται και ο φθορισμός της SYBR green (González-Escalona et al 2006). Για να εξασφαλιστεί η ποιότητα των αποτελεσμάτων, δηλαδή ότι το προϊόν που παράγεται προέρχεται μόνο από την αλληλουχία στόχο και όχι από διμερή ή παραπροϊόντα που μπορεί να σχηματίζονται, διεξάγεται και μία καμπύλη τήξης μετά την PCR. Συγκεκριμένα κατά την διάρκεια της καμπύλης το διάλυμα θερμαίνεται και μετριέται η ανίχνευση φθορισμού κάθε φορά που μεταβάλλεται η θερμοκρασία. Με την άνοδο της θερμοκρασίας, το DNA μετουσιώνεται με αποτέλεσμα να ανιχνεύεται λιγότερος φθορισμός και ανάλογα τον ρυθμό μείωσης του φθορισμού μπορούμε να καταλάβουμε το μήκος του προϊόντος, αφού όσο μεγαλύτερο είναι το μόριο DNA τόσο περισσότερο χρόνο χρειάζεται για την πλήρη μετουσίωση του (Smith et al 2008).

Η μέθοδος TaqMan (εικόνα 10) χρησιμοποιεί έναν ανιχνευτή με φθορίζουσα σήμανση που υβριδίζεται σε μία επιπλέον συντηρημένη περιοχή που βρίσκεται εντός της αλληλουχίας στόχου. Ο ανιχνευτής TaqMan συγκεκριμένα έχει στο 5' άκρο του μία φθορίζουσα σήμανση και περιέχει στο 3' άκρο του ένα μόριο παρεμπόδισης φθορισμού (Livak et al 1995). Καθώς η αντίδραση εξελίσσεται η φθορίζουσα ουσία είναι πλέον ανιχνεύσιμη και έτσι μετριέται η ένταση του φθορισμού και επομένως η ποσότητα του προϊόντος που παράγεται. Έτσι η παρουσία του ανιχνευτή TaqMan διασφαλίζει την ενίσχυση μόνο της επιθυμητής αλληλουχίας DNA (Smith et al 2008).



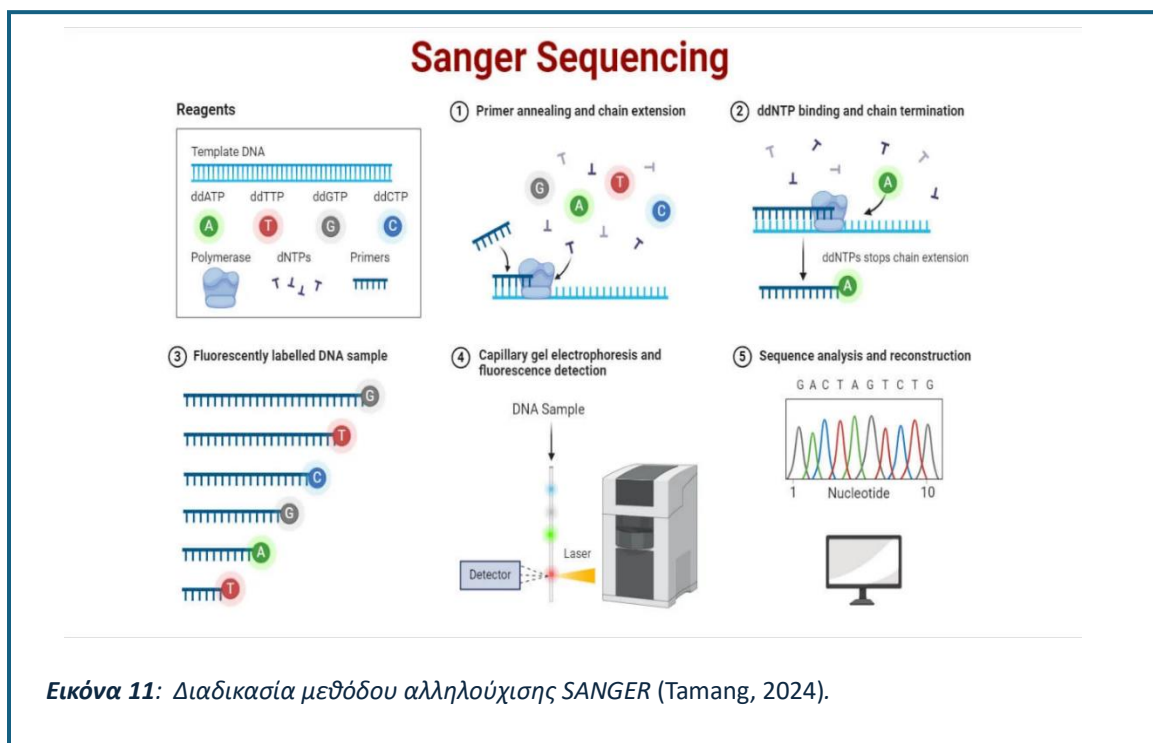
1.6.7 Συμπερασματικά

Η καλλιέργεια των δειγμάτων είναι κοστοβόρα και χρονοβόρα και πολλές φορές δεν υπάρχει σαφής διάγνωση. Γενικά η απομόνωση του μυκοπλάσματος θεωρείται αρκετά δύσκολη διαδικασία καθώς δεν αναπτύσσεται εύκολα σε εργαστηριακές συνθήκες (Rahimabadi et al 2017). Η κυτταρομετρία ροής αν και είναι ευαίσθητη διαδικασία, δεν μας δίνει την δυνατότητα να διαχωρίσουμε τα διάφορα είδη μυκοπλάσματος μεταξύ τους (Assuncao et al 2007). Η μέθοδος ELISA αν και ευρέως χρησιμοποιούμενη διαθέτει κάποιους περιορισμούς αφού το μυκόπλασμα έχει την ιδιαιτερότητα της παραλλαγής των αντιγόνων της πλασματικής του μεμβράνης κάτι το οποίο καθιστά απαραίτητη την καλλιέργεια του μυκοπλάσματος πριν την διεξαγωγή της ELISA αφού δεν μπορεί να αποκλειστεί εντελώς η σύνδεση με άλλα είδη μυκοπλάσματος (Sachse et al 1993). Αντίθετα η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) είναι μια αποτελεσματική μέθοδος για την μοριακή ανίχνευση του μυκοπλάσματος με ευρεία χρήση, παρά το γεγονός ότι το αρνητικό αποτέλεσμα δεν ταυτίζεται με την απουσία του μυκοπλάσματος στο δείγμα (Assuncao et al 2007). Είναι γνωστό ότι μέθοδοι εξαγωγής και καθαρισμού του γενετικού υλικού επηρεάζουν άμεσα τα αποτελέσματα της PCR η οποία μπορεί να έχει διαφορετική ευαισθησία ανάλογα με το πρωτόκολλο που χρησιμοποιείται κάθε φορά, αφού η αποτελεσματικότητα της Taq πολυμεράσης

επηρεάζεται από τα διάφορα ένζυμα που υπάρχουν στο δείγμα και μπορεί να αναστείλουν την αντιγραφή. Τα αποτελέσματα της PCR είναι ανεξάρτητα όμως από το αν το δείγμα που χρησιμοποιείται, στην συγκεκριμένη περίπτωση αν το γάλα, είναι φρέσκο ή είναι κατεψυγμένο (Tatay-Dualde et al 2015). Η μέθοδος μοριακής ανίχνευσης της PCR είναι ο πιο αποτελεσματικός τρόπος για τον εντοπισμό διαφορετικών ειδών Μυκοπλάσματος και με την μέθοδο της PCR πραγματικού χρόνου μας επιτρέπεται και η ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων. Τέλος με την μέθοδο PCR το γενετικό υλικό του μυκοπλάσματος αφού ενισχυθεί μπορεί και να αλληλουχιθεί κάτι το οποίο μας επιτρέπει την περεταίρω μελέτη του (Halium et al 2019).

1.7 Αλληλούχιση

Για την επιπλέον ανάλυση των δειγμάτων πραγματοποιείται αλληλούχιση των δειγμάτων, και πιο συγκεκριμένα πολύ συχνά πραγματοποιείται αλληλούχιση κατά Sanger. Συγκεκριμένα κατά την συγκεκριμένη αλληλούχιση στο ενισχυμένο DNA (εικόνα 11) προστίθεται μια DNA πολυμεράση, οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση της αλληλουχίας καθώς και μία μίξη δεοξυριβονουκλεοτιδίων και τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs). Τα τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (ddNTPs) τα οποία είναι σημασμένα με φθορίζοντα χρωστική σταματούν την επιμήκυνση της αλυσίδας, αφού δεν μπορεί να συνδεθεί με αυτά το επόμενο νουκλεοτίδιο διότι δεν διαθέτουν υδροξυλομάδα στο 3' άκρο της δεοξυριβόζης τους. Έτσι δημιουργούν τμήματα DNA με πολλαπλά μήκη (Crossley et al 2020). Έπειτα τα διαφορετικά σημασμένα ddNTPs ανιχνεύονται από αυτοματοποιημένες μηχανές αλληλούχισης με την χρήση λέιζερ και για κάθε νουκλεοτίδιο που ανιχνεύεται εμφανίζεται μία κορυφή (εικόνα 2), ανάλογα με το χρώμα της κορυφής προκύπτει η αλληλουχία του DNA (Tamang, 2024).



Εικόνα 11: Διαδικασία μεθόδου αλληλούχισης SANGER (Tamang, 2024).

2 Σκοπός

Το μυκόπλασμα είναι ένας προκαρυωτικός οργανισμός ο οποίος προσβάλλει διάφορα ζώα και ανθρώπους. Μεταξύ άλλων το μυκόπλασμα προσβάλλει και οικόσιτα ζώα όπως οι αίγες δημιουργώντας σημαντικά οικονομικά προβλήματα. Το μυκόπλασμα είναι ενδημικό σε πολλές περιοχές και ειδικότερα στις χώρες της μεσογείου όπως είναι και η Ελλάδα. Σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας είναι η διερεύνηση ύπαρξης Μυκοπλάσματος ή πιο συγκεκριμένα των *Mycoplasma Agalactiae*, *Mycoplasma mycoides subsp. Mycoides Small colony type*, *Mycoplasma putrefaciens*, *Mycoplasma mycoides subsp. Capri*, σε δείγματα δεξαμενών γάλακτος αιγών από όλη την Ελλάδα. Ο εντοπισμός κυρίως του *Mycoplasma Agalactiae* που είναι ο βασικός αιτιολογικός παράγοντας της μεταδοτικής αγαλακτίας είναι πολύ σημαντικός για την πρόβλεψη και την θεραπεία της ασθένειας όπως και την γενικότερη ευζωία των αιγών αφού προκαλεί μεταξύ άλλων μειωμένη ή έλλειψη παραγωγή γάλατος, κερατοεπιπευκίτηδα, αρθρίτιδα, σηψαιμία, μαστίτιδα και αποβολές των ενήλικων αιγών.

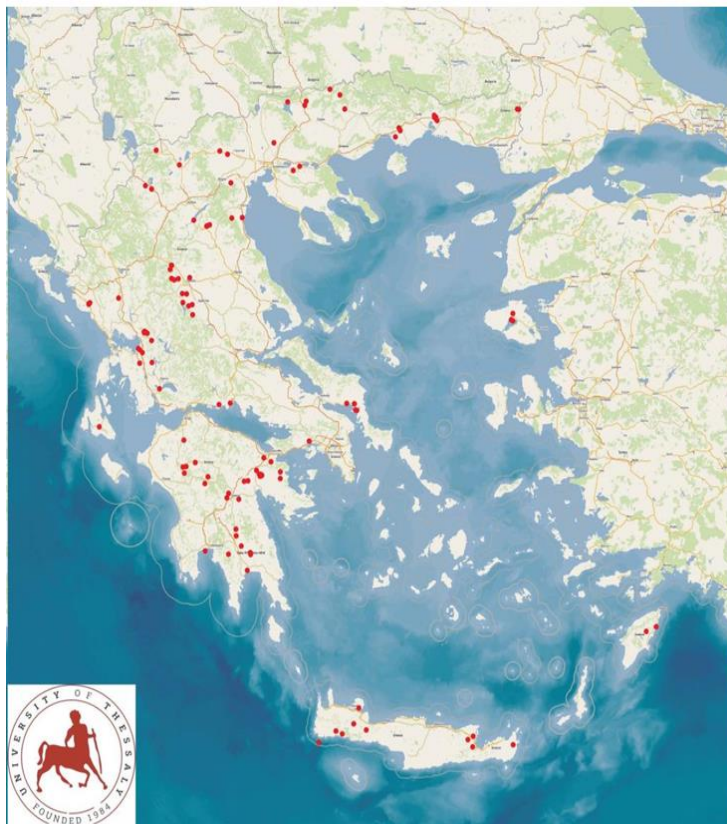
3 Υλικά και μέθοδοι

Το στάδιο 3.1, η συλλογή και η απομόνωση των δειγμάτων, πραγματοποιήθηκε, για τους σκοπούς προηγούμενης μελέτης (Lianou et al 2025) οπότε χρησιμοποιήθηκε και για τις ανάγκες της παρούσας μελέτης.

3.1 Συλλογή δειγμάτων

3.1.1 Επίσκεψη στις φάρμες, συλλογή και απομόνωση δειγμάτων

Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν στην συγκεκριμένη μελέτη, προέρχονται από την μελέτη της Lianou και συνεργατών (2023), όπου συλλέχθηκαν δείγματα από 119 φάρμες αιγών από τον Απρίλιο του 2019 ως τον Ιούλιο του 2020 (εικόνα 12). Οι φάρμες αυτές βρίσκονται στις 13 διοικητικές περιοχές της χώρας. Ο αριθμός των θηλυκών αιγών που υπήρχαν στις φάρμες που ερευνήθηκαν είναι 237 ± 20 και η ποσότητα του παραγόμενου γάλακτος τον χρόνο είναι 201 ± 10 λίτρα το ζώο. Για τις ανάγκες των πειραμάτων, συλλέχθηκε δείγμα χύμα γάλακτος με την βοήθεια πλαστικής αποστειρωμένης πιπέτας, και το αποθήκευσαν σε ασηπτικές συνθήκες. Από κάθε φάρμα λήφθηκαν 4 δείγματα χύμα γάλακτος τα οποία δείγματα στην συνέχεια υποβλήθηκαν σε καταμέτρηση σωματικών κυττάρων και βακτηριολογικές εξετάσεις (D.T. Lianou et al 2023). Τα δύο δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν για βακτηριολογικές εξετάσεις αναμείχθηκαν, φυγοκεντρήθηκαν και το ίζημα χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση DNA με το εμπορικό διαθέσιμο Κιτ (IndiSpin Pathogen Kit; Indical BioScience, Leipzig, Germany) ακολουθώντας τις οδηγίες του πρωτοκόλλου (Lianou et al 2025).



Εικόνα 12: Οι 119 ελληνικές φάρμες από τις οποίες έγινε η συλλογή δειγμάτων γάλακτος αιγών (Lianou et al 2023).

3.1.2 Κλινικά συμπτώματα που οδήγησαν στην συγκεκριμένη έρευνα

Κατά την διεξαγωγή των επισκέψεων στις φάρμες παρατηρήθηκε ότι υπήρχαν ζώα τα οποία έπασχαν από κλινική μαστίτιδα (εικόνα 13) με κάποιες αίγες να παρουσιάζουν πιο έντονη παθολογική κατάσταση από άλλες ανά την Ελλάδα. Αφού η μεταδοτική αγαλακτία είναι ο κύριος αιτιολογικός παράγοντας που προκαλεί μαστίτιδα με ποσοστό 90%, το μυκόπλασμα είναι ένας βασικός ύποπτος της συγκεκριμένης πάθησης.

3.2 Υλικά

3.2.1 Εκκινητές



Εικόνα 13: Οι φάρμες αιγών που παρουσίασαν κλινική μαστίτιδα, η διάμετρος της τελείας είναι ανάλογη με την επίπτωση της παθολογικής κατάστασης (Lianou et al 2023).

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν βρέθηκαν όλοι από την υπάρχουσα βιβλιογραφία (πίνακας 1) και επιλέχθηκαν με το κριτήριο ότι το προϊόν που δίνουν είναι 150 – 350 βάσεις (πίνακας 2) για να διασφαλίσουμε την βέλτιστη ενίσχυση τους κατά την αντίδραση. Οι εκκινητές παραγγέλθηκαν από τη εταιρία Eurofins Genomics και ήρθαν σε λυοφυλιωμένη μορφή, στην συνέχεια διαλυτοποιήθηκαν με απιονισμένο νερό, όπως ανέφερε το πρωτόκολλο, και

χρησιμοποιήθηκαν στην αντίδραση της αλυσιδωτής αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου.

Πίνακας 1: Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την πραγματοποίηση του πειράματος.

	Οργανισμός στόχος	Γονίδιο στόχος	Όνομα εκκινητή	Αλληλουχία εκκινητή (5' → 3')	Όγκος που προστέθη-κε για τελική συγκέντρωση 100pmol/μl	T _m [°C]	G – C περιεκτικότητα
1	<i>Ma</i>	polC	MAPol-1F	F: CATTGAACCTCTTATGTCA TTTACTTTG	1122	59.3	32%
2	<i>Ma</i>	polC	MAPol-5R	R: CTATGTCAGCTTTTGGGT GA	959	58.9	43%
3	<i>MmmSC</i>	conserved hypothetical protein	MSC-382F	F: ATGCAAGAAGTTATTAAT GTTTATCATTC	845	56.8	24%
4	<i>MmmSC</i>	conserved hypothetical protein	MSC-382R	R: CGTAATATATTTGTTTAAC ATATGGAATAA	830	55.8	20%
5	<i>General</i>	16S ribosomal RNA gene	M1F	F: GCTGCGGTGAATACGTTC T	808	56.7	53%
6	<i>General</i>	16S ribosomal RNA gene	M3R	R: TCCCCACGTTCTCGTAGG G	964	61.0	63%
7	<i>Mp</i>	Arc B	Mput 1	F: AAATTGTTGAAAAATTAG CGCGA	768	53.5	30%
8	<i>Mp</i>	Arc B	Mput 2	R: CATATCATCATCAACTAGA TTAATAGTAGCACC	692	61,3	33%
9	<i>Mmc</i>	CAP-21	P4	F: ACTGAGCAATTCCTCTT	877	48,0	41%
10	<i>Mmc</i>	CAP-21	P6	R: TTAATAAGTCTCTATATGA A	919	46,2	19%

Πίνακας 2: Πίνακας που υποδεικνύει τα μήκη των τελικών προϊόντων της αντίδρασης PCR καθώς και την βιβλιογραφία η οποία χρησιμοποιήθηκε.

	Οργανισμός στόχος	Ονόματα εκκινητών	Μήκος προϊόντος (σε βάσεις)	Βιβλιογραφική αναφορά
1	<i>Ma</i>	MAPol-1F MAPol-3R	265	(C. A.M. Becker et al 2012)
2	<i>MmmSC</i>	MSC-382F MSC-382R	106	(S. Lorenzon et al 2008)
3	<i>General</i>	M1F M3R	160	(A.R. Pooladgar et al 2015)
4	<i>Mp</i>	Mput 1 Mput 2	316	(A. Hajizadeh et al 2018)
5	<i>Mmc</i>	P4 P6	192	(V. Kumar et al 2013)

3.2.2 Αντιδραστήρια

Τα συνολικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν:

Για την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου:

- Το μίγμα της KAPA SYBR FAST από την εταιρία Roche, το οποίο διαθέτει την χρωστική SYBR green, την Taq πολυμεράση, δεοξυριβονουκλεοτίδια και κατάλληλο Buffer.
- Τους εκκινητές
- Το απομονωμένο DNA
- Απιονισμένο νερό

Για τον καθαρισμό των PCR προϊόντων χρησιμοποιήθηκε το Monarch® Spin PCR & DNA Cleanup Kit (5μg) (#T1130L) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

3.3 Μέθοδοι

3.3.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου

Για την πραγματοποίηση της αντίδρασης αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου, η οποία θα μας έδειχνε την ύπαρξη μυκοπλάσματος στα δείγματα γάλακτος, αρχικά δημιουργήθηκε ένα διάλυμα, για κάθε είδος που θέλαμε να ανιχνεύσουμε, που περιείχε τους εκκινητές (εμπρόσθιο και ανάστροφο), το μίγμα KAPA SYBR FAST, και νερό με συγκεντρώσεις που φαίνονται στον πίνακα 3. Στην συνέχεια προτέθηκαν 2μl δείγμα απομονωμένου DNA σε κάθε tube και 8 μl από το μίγμα που δημιουργήσαμε. Σε κάθε αντίδραση που πραγματοποιήθηκε, υπήρχε ένα negative control, για τον έλεγχο τυχόν επιμολύνσεων κατά την αντίδραση.

Πίνακας 3: Αναλυτικές ποσότητες των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν στην PCR

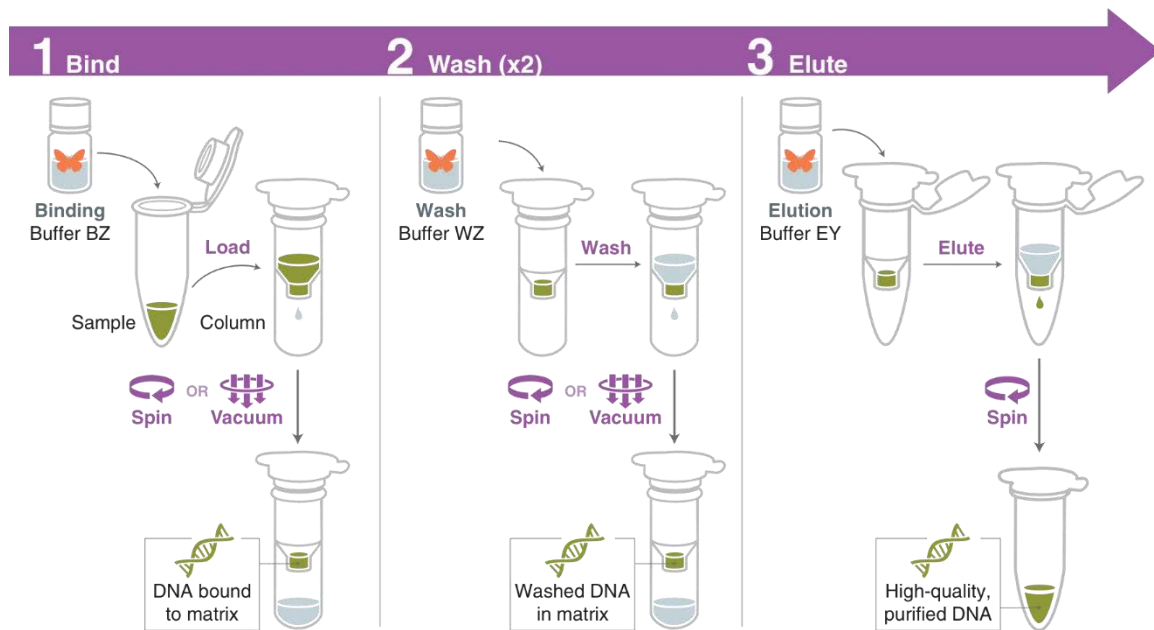
	Αρχική συγκέντρωση	Τελική συγκέντρωση
Εκκινητές (forward και reverse)	10 pmol/μl (forward) 10 pmol/μl (reverse)	3 pmol (forward) 3 pmol (reverse)
KAPA SYBER FAST	2x	1x
DNA	10 ng/μl	20 ng

3.3.2 Καθαρισμός προϊόντων αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου

Για την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων, μερικά δείγματα στάλθηκαν για αλληλούχιση. Για την αποστολή των δειγμάτων ήταν απαραίτητος ο καθαρισμός των ενισχυμένων αλληλουχιών από την πολυμεράση Taq, την SYBR green, το ρυθμιστικό διάλυμα καθώς και τις αλληλουχίες εκκινητών.

Για τον καθαρισμό των προϊόντων της αντίδρασης PCR πραγματικού χρόνου χρησιμοποιήθηκε το Monarch® Spin PCR & DNA Cleanup Kit (5μg) (#T1130L) το οποίο περιέχει τρία ρυθμιστικά διαλύματα, ένα ρυθμιστικό διάλυμα πρόσδεσης του DNA (Monarch Buffer BZ), ένα συμπυκνωμένο ρυθμιστικό διάλυμα πλύσεων (Monarch Buffer WZ) και ένα ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης (Monarch Buffer EY).

Αρχικά προστέθηκαν 10 μl δείγματος και 50 μl ρυθμιστικού διαλύματος πρόσδεσης σε ένα tube, τα οποία αναδεύτηκαν ελαφρώς με πιπετάρισμα του διαλύματος και στην συνέχεια το διάλυμα προστέθηκε σε μία στήλη (column), έπειτα φυγοκεντρείται για ένα λεπτό στα 13.000 RPM (όπως φαίνεται και στην εικόνα 13, στην αριστερή στήλη), το (flow-through) πετιέται. Έπειτα πραγματοποιούνται δύο πλύσεις. Για τις πλύσεις προστίθενται στην στήλη 200μl από το συμπυκνωμένο διάλυμα πρόσδεσης του DNA, και φυγοκεντρείται για ένα λεπτό στα 13.000 RPM (όπως φαίνεται στην εικόνα 13 στην μεσαία στήλη). Η πλύση επαναλαμβάνεται άλλη μία φορά και πετιέται το flow-through. Τέλος η στήλη τοποθετείται σε νέο tube και προστίθεται 5μl ρυθμιστικού διαλύματος έκλουσης. Η στήλη επωάζεται για ένα λεπτό και στην συνέχεια φυγοκεντρείται για ένα λεπτό στα 13.000 RPM (όπως φαίνεται στην εικόνα 13 δεξιά στήλη). Τέλος η στήλη πετιέται και το καθαρό προϊόν της αντίδρασης PCR αποθηκεύεται στην κατάψυξη μέχρι την αποστολή τους για αλληλούχιση.



Εικόνα 13: Συνοπτική απεικόνιση της μεθοδολογίας που χρησιμοποιήθηκε για το Monarch® Spin PCR & DNA Cleanup Kit (5μg) (#T1130L), για τον καθαρισμό του DNA ως πρωίων της PCR πραγματικού χρόνου (NEW ENGLAND Biolabs, n.d.).

3.3.3 Αλληλούχιση θετικών προϊόντων αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης

Το τελικό στάδιο του πειράματος ήταν η αλληλούχιση των δειγμάτων για την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου. Έτσι στάλθηκαν κάποια δείγματα για αλληλούχιση κατά Sanger σε ένα εξειδικευμένο εξωτερικό εργαστήριο. Τα αποτελέσματα της αλληλούχισης στάλθηκαν πίσω στο εργαστήριο ηλεκτρονικά.

4 Αποτελέσματα

Για την επιλογή των θετικών δειγμάτων αξιολογήθηκαν οι καμπύλες που δημιουργήθηκαν στο διάγραμμα τήξης κάθε αντίδρασης. Έτσι γνωρίζοντας τα μήκη των προϊόντων της αντίδρασης PCR κάθε φορά αξιολογήθηκε αν το ενισχυμένο προϊόν προέκυψε από την ενίσχυση της επιθυμητής αλληλουχίας ή κάποιου παραπροϊόντος της αντίδρασης όπως την ενίσχυση διμερών εκκινητών. Έτσι σύμφωνα με τις RT-qPCR που πραγματοποιήθηκαν παρατηρήθηκε ότι από τα 119 δείγματα που μελετήθηκαν ήταν θετικά για μυκόπλασμα τα 29 δείγματα, θετικά για το *Mycoplasma agalactiae* τα 16, για το *Mycoplasma mycoides subsp. Mycoides Small Colony Type* τα 9 και για το *Mycoplasma putrefaciens* τα 5. Δεν ανιχνεύτηκε σε κανένα δείγμα το *Mycoplasma mycoides subsp. Capri*.

Πίνακας 4: Συγκεντρωτικός πίνακας που δείχνει την μυκοπλασματική ανίχνευση.

Μυκοπλάσματα	Συνολική ανίχνευση	Δείγματα στα οποία ανιχνεύτηκε ένα είδος μυκοπλάσματος	Δείγματα που ανιχνεύτηκαν 2 είδη	Δείγματα που ανιχνεύτηκαν όλα τα είδη
General	29	-	-	-
Ma	16	12	2	2
MmmSC	9	3	4	
Mr	5	1	2	

Από την πραγματοποίηση της αλληλούχισης κατά Sanger επιβεβαιώθηκαν τα αποτελέσματα της RT-qPCR. Ποιο συγκεκριμένα τα αποτελέσματα των δειγμάτων επιβεβαίωσαν την ύπαρξη του *Mycoplasma Agalactiae*, αφού από την αλληλούχιση προέκυψαν οι ακόλουθες αλληλουχίες:

Αλληλουχία-1

```
>GCCAAGGTTTCATAAAGCTTAAATCAGGCTATTCATAGTGCCATTGTAACATAGGCGGTAGCATGCGCTTTTG  
GGAAAAGGTACTCAATTTTTTGCATACTTTTAATTAGCCAGTCTGGAACATTATGTTTTTCTAAAAGCCCAAC  
TTCTTCGTTTCGAAAGTCCTTTTCTTTCTAACTTTTCCATCAAAGTAAATGACATAGAGGTTCAATAA
```

Αλληλουχία-2

```
>GCGCTTTTGGGAAAAGTACTCAATTTTTTGCATAATTTTAAKTAGCCAGTCTGGAACATTATGTTTTTCTAA  
AAACCCAACTTCTTCGTTTCGAAAGTCCTTTTCTTTCTAACTTTTCCATCAAAGTAAATGACATAGAARGT  
TC
```

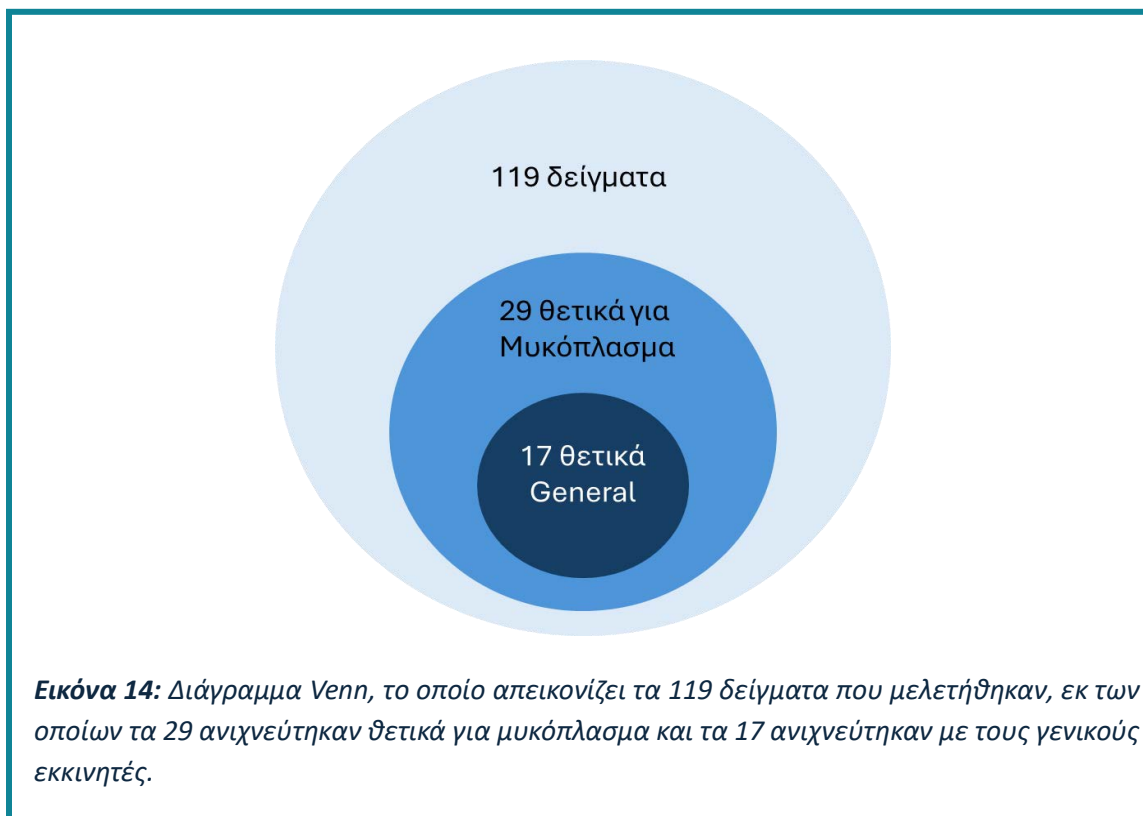
Με την χρήση BLAST επιβεβαιώθηκε ότι και οι 2 παραπάνω αλληλουχίες αντιστοιχούν σε στελέχη του *Mycoplasma agalactiae* με ομοιότητα 100%.

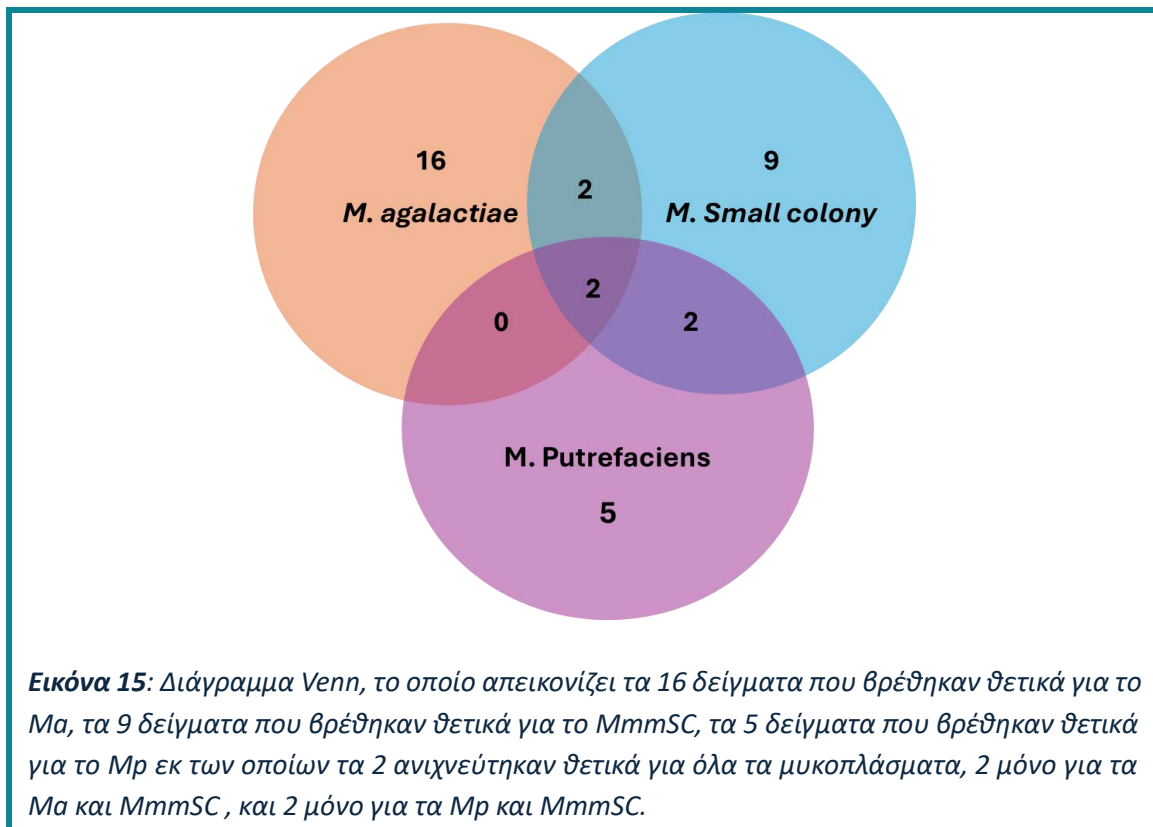
5 Συζήτηση

Οι αίγες είναι πολύ σημαντικά ζώα για την παγκόσμια οικονομία. Έτσι τα παθογόνα που τις προσβάλλουν προκαλούν σημαντικές οικονομικές απώλειες σε όλο τον κόσμο, αλλά κυρίως στις χώρες της μεσογείου. Ένα από αυτά τα παθογόνα είναι το μυκόπλασμα το οποίο προκαλεί σημαντικά προβλήματα στις αίγες όπως είναι η μεταδοτική αγαλακτία και η μεταδοτική πλευροπνευμονία των αιγών (DaMassa et al 1992). Η μεταδοτική αγαλακτία προκαλείται κυρίως από το *Mycoplasma agalactiae*, όμως υπάρχουν και άλλα μυκοπλάσματα που προκαλούν αυτές τις ασθένειες όπως είναι το *Mycoplasma putrefaciens*, *Mycoplasma mycoides subsp. Mycoides Small Colony type*, *Mycoplasma mycoides subsp. Capri* (Hajizadeh et al 2018).

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία ανιχνεύτηκε ύπαρξη μυκοπλάσματος σε δείγματα χύμα κατσικίσιου γάλακτος στην Ελλάδα, πιο συγκεκριμένα από τα 119 δείγματα που αναλύθηκαν βρέθηκαν 29 δείγματα θετικά (πίνακας 4, εικόνα 14) για μυκόπλασμα. Οι εκκινητές για τον εντοπισμό του μυκοπλάσματος ανίχνευσαν μόνο 17 από τα 29 δείγματα ενώ τα υπόλοιπα ήταν

θετικά για κάποια από τα μυκοπλασματικά είδη που μελετήθηκαν, δεν παρουσίασαν θετικό αποτέλεσμα στους γενικούς εκκινητές. Αυτή η διαφορά οφείλεται στην μη ειδικότητα των εκκινητών καθώς μία μετάλλαξη στο σημείο πρόσδεσης των εκκινητών έχει σαν αποτέλεσμα να μην συνδεθούν σωστά ή και καθόλου με αποτέλεσμα να μην ενισχύεται η αλληλουχία. Επιπλέον υπήρχαν 16 θετικά δείγματα (πίνακας 4, εικόνα 15) για το *Ma* κάτι το οποίο είναι αναμενόμενο αφού το συγκεκριμένο μυκόπλασμα είναι υπεύθυνο για το 90% των περιπτώσεων αγαλακτίας, οπότε είναι αναμενόμενο το συγκεκριμένο μυκόπλασμα να εντοπίζεται στις περισσότερες περιπτώσεις. Επιπλέον το *Mycoplasma mycoides subsp. Mycoides Small Colony type* ανιχνεύτηκε συνολικά σε 9 δείγματα, και πιο συγκεκριμένα σε 3 δείγματα ανιχνεύτηκε μόνο το *MmmSC*, σε 2 δείγματα ανιχνεύτηκε μαζί με το *Mr*, σε 2 δείγματα ανιχνεύτηκαν μαζί με το *Ma* ενώ σε 2 δείγματα ανιχνεύτηκαν όλα τα είδη (*Ma*, *Mr*, *MmmSC*). Τέλος το *Mycoplasma putrefaciens* ανιχνεύτηκε συνολικά σε 5 δείγματα, και μόνο του ανιχνεύτηκε μόνο σε 1 δείγμα. Υπάρχει πιθανότητα οι ενισχυτές να ενισχύουν περισσότερα του ενός είδη μυκοπλάσματος τα οποία μοιάζουν γενετικά μεταξύ τους και να μην αποτελούν συνمولύνσεις τα δείγματα στα οποία ανιχνεύτηκαν περισσότερα του ενός μυκοπλασματικά είδη.





Συνοψίζοντας ο αριθμός των θετικών δειγμάτων συνάδει με τον αναμενόμενο αριθμό, αφού η μεταδοτική αγαλακτία δεν είναι ο μόνος αιτιολογικός παράγοντας της μαστίτιδας (εικόνα 13), όμως από ότι αποδείχθηκε και πειραματικά, οφείλεται σε μόλυνση από μυκόπλασμα σε μεγάλο βαθμό. Ένας άλλος παράγοντας είναι το γεγονός ότι το δείγμα γάλακτος δεν προήλθε από αίγες που πάσχουν αλλά από χύμα γάλα δεξαμενής, κάτι το οποίο επηρεάζει τα θετικά αποτελέσματα αφού μπορεί οι αίγες που τυχόν πάσχουν από μυκόπλασμα σε αυτές τις φάρμες να είναι είτε σε μικρό αριθμό ή σε πρώιμο στάδιο μόλυνσης. Με αποτέλεσμα ενώ υπάρχει ο παθογόνος μικροοργανισμός να μην είναι ανιχνεύσιμος.

Με αυτή την πτυχιακή εργασία επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη του μυκοπλάσματος και στην Ελλάδα, κάτι το οποίο συνάδει με την βιβλιογραφία αφού η Ελλάδα είναι μία μεσογειακή χώρα. Έτσι γνωρίζοντας τον κίνδυνο του μυκοπλάσματος μπορούν να γίνουν ενέργειες πρόληψης όπως εμβολισμοί, έγκαιρη διάγνωση και πιθανόν θεραπεία των πασχόντων αιγών, για την καλύτερη ποιότητα ζωής τους και την μείωση των οικονομικών απωλειών που προκύπτουν από την συγκεκριμένη νόσο. Πάνω στο συγκεκριμένο θέμα, για την Ελλάδα, υπάρχουν κάποιες μεταπτυχιακές εργασίες καθώς και δημοσιευμένες μελέτες στην βιβλιογραφία.

Βιβλιογραφία

- A. Contreras, R. E. (2008). Presence of Mycoplasma species and somatic cell counts in bulk-tank goat milk. *Small Ruminants Research*(75), σσ. 247-251. Ανάκτηση από <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2007.11.007>
- A. Hajizadeh, R. G. (2018). Species of Mycoplasma causing contagious agalactia in small ruminants in Northwest Iran. *Veterinaria Italiana*, σσ. 205-210. doi:10.12834/VetIt.831.4072.2
- A. J. DaMassa, P. S. (1992). Mycoplasmas of goats and sheep. *J. Vet Diagn Invest.* doi:10.1177/104063879200400126
- A. Jafarizadeh, S. P. (2017). Detection and isolation of Mycoplasma capricolum Subspecies Capricolum from East Azerbaijan Sheep Folcks. σσ. 243-248. doi:10.22092/ari.2017.113303
- A. Kumar, A. R. (2014). Mycoplasma agalactiae, an Ethiological Agent of Contagious Agalactia in Small Ruminants: A Review. Ανάκτηση από <http://dx.doi.org/10.1155/2014/286752>
- A. Kumar, A. R. (2014). Mycoplasma agalactiae, an Etiological Agent of Contagioys Agalactia in Small Ruminants: A Review. *Veterinary Medicine International*. Ανάκτηση από <http://dx.doi.org/10.1155/2014/286752>
- A. M. Bajare, Y. S. (2023). REVIEW ARTICLE ELISA: THE IMMUNOLOGICAL DIGNOSTIC TOOL. *International Advanced Research Journal in Science, Engineering and Technology*. doi:10.17148/IARJSET.2023.101105
- A. Subbaiyan, P. T. (2020). Multilocus sequence typing of pathogenic Mycoplasma mycoides subsp. capri reveals the predominance of a novel clonal complex among isolates from goats in India. *Springer Nature*, 1149-1157. Ανάκτηση από <https://doi.org/10.1007/s00203-020-02100-w>
- A.R. Pooladgar, R. L. (2015). solation and identification of Mycoplasma agalactiae by culture and polymerase chain reaction (PCR) from affected sheep to Contagious agalactia of Khuzestan province, Iran. *Archives of Razi Institute*. doi:10.7508/ari.2015.01.004
- abcam. (χ.χ.). Ανάκτηση από ELISA principles and types: <https://www.abcam.cn/kits/elisa-principle>
- ATT Bioquest. (2020). Ανάκτηση από Τι είναι η άμεση ELISA;; <https://www.aatbio.com/resources/faq-frequently-asked-questions/What-is-a-Direct-ELISA>

- B. Fleury, D. B. (2001). Characterization and analysis of a stable serotype-associated membrane protein (P30) of *Mycoplasma agalactiae*. *J Clin Microbiol*. doi: 10.1128/JCM.39.8.2814-2822.2001
- B. Kheirkhah, S. A. (2019). Detection of *Mycoplasma agalactiae* by culture and polymerase chain reaction (PCR) methods from Iranian goats . *Advanced Journal of Microbiology Research*.
- B. M. Crossley, J. B.-K. (2020). Guidelines for Sanger sequencing and molecular assay monitoring. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 767-775. doi:10.1177/1040638720905833
- Bhandari, M. L. (2021). The Importance of Goats in the World. *Professional Agricultural Workers Journal*, 6(2). Ανάκτηση από <https://tuspubs.tuskegee.edu/pawj/vol6/iss2/4>
- C. A.M. Becker, F. R. (2012). Development of a multiplex real-time PCR for contagious agalactia diagnosis in small ruminants. *Journal of Microbiological Methods*, 73-79. doi:10.1016/j.mimet.2012.04.020
- C. C. Thompson, N. M. (2011). Towards a genome based taxonomy of mycoplasmas. *Infection, Genetics and Evolution*(11), σσ. 1798-1804. Ανάκτηση από <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.07.020>
- C. Fe, A. S. (2009). Effects on goat milk quality of the presence of mycoplasma spp. in herds without symptoms of contagious agalactia. *Journal of Dairy Research*. doi:10.1017/S002202990800366X
- C. J. Smith, A. M. (2008). Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology*, 6-20. Ανάκτηση από <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2008.00629.x>
- Corona, L. (2013). Proteomic approach for identification of immunogenic proteins of *Mycoplasma mycoides* subsp. capri. *Veterinary Microbiology*, 434-439. Ανάκτηση από <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.08.024>
- Current Worldwide Goat Milk Production*. (2008). Ανάκτηση από ChartsBin: <http://chartsbin.com/view/1487>
- D. C. Ruffin, D. M. (2001). *Mycoplasma* Infections in small ruminants. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 17, σσ. 315-332. Ανάκτηση από [https://doi.org/10.1016/s0746-0720\(15\)30031-1](https://doi.org/10.1016/s0746-0720(15)30031-1)
- D. Le Grand, E. S. (2004). Assessment of PCR for routine identification of species of the *Mycoplasma mycoides* cluster in ruminants. *Veterinary Research*(34), σσ. 635-649. doi:10.1051/vetres:2004037
- D. T. Lianou, T. G. (2025). Detection of *Coxiella burnetii* in Bulk Tank Milk of Dairy Small Ruminant Farms in Greece. *Foods*. doi:10.3390/foods14030460

- D.T. Lianou, C. M. (2023). Data on Mapping 444 Dairy Small Ruminant Farms during a Countrywide Investigation Performed in Greece. *Animals*. Ανάκτηση από <https://doi.org/10.3390/ani13122044>
- E. Rahimabadi, Y. A. (2017). Isolation and identification of Mycoplasma Agalactia Culture and Polymerase Chain Reaction Methods in the Sheep Herds in Guilan Province, Iran. *Archives of Razi Institute*, 72(4), σσ. 219-223. doi:10.22092/ari.2017.113298
- F. Benedetti, S. C. (2020). Mycoplasmas-Host Interaction: Mechanisms of Inflammation and Association with Cellular Transformation. *Microorganisms*. doi:10.3390/microorganisms8091351
- F. Pourmarat, D. L. (2012). Comparative assessment of two commonly used commercial ELISA tests for the serological diagnosis of contagious agalactia of small ruminants caused by Mycoplasma agalactiae. *BMC Veterinary Research*. Ανάκτηση από <https://doi.org/10.1186/1746-6148-8-109>
- H. E. Adler, A. J. (1980). Caprine Mycoplasmosis: Mycoplasma putrefaciens, a New Cause of Mastitis in Goats. *AVMA Publications*.
- H. Hotzel, J. F. (2003). Detection and Differentiation of Ruminant Mycoplasmas. *Methods Mol Biol*, σσ. 216-231. doi:10.1385/1-59259-344-5:231
- H. Hotzel, J. F. (2003). Detection and differentiation of ruminant mycoplasmas. *Methods Molecular Biology*, σσ. 231-245.
- H. Hotzel, K. S. (1996). A PCR scheme for differentiation of organisms belonging to the Mycoplasma mycoides cluster. *Veterinary Microbiology*, 31-43. Ανάκτηση από [https://doi.org/10.1016/0378-1135\(95\)00176-X](https://doi.org/10.1016/0378-1135(95)00176-X)
- InvivoGen, I. W. (χ.χ.). Mycoplasma Contamination of Cell Cultures. *InvivoGen, Inovation Within reach*. Ανάκτηση από <https://www.invivogen.com/review-mycoplasma>
- J. Amores, A. S. (χ.χ.). Viability of mycoplasma agalactiae and Mycoplasma mycoides subsp. capri in goat milk samples stored under different conditions. *Veterinary Microbiology*, 145, 347 - 350. Ανάκτηση από <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.03.030>
- J. DaMassa, P. S. (1992). Mycoplasmas of goats and sheep.
- J. P. Robinson, R. O. (2023). Flow Cytometry: The Next Revolution. *Cells*. Ανάκτηση από <https://doi.org/10.3390/cells12141875>
- J. Tatay-Dualde, A. S.-v.-M. (2015). Sensitivity of two methods to detect Mycoplasma agalactiae in goat milk. doi:10.1186/s13620-015-0049-y
- K J Livak, S. J. (1995). Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *Cold Spring Harbor Laboratory Pres*. doi:10.1101/gr.4.6.357

- K. Sachse, H. P. (1993). Comparison of various diagnostic methods for the detection of *Mycoplasma bovis*. *Rev. sci. tech.*, 571-580.
- L. Hernandez, J. L.-J. (2006). *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* associated with goat respiratory disease and high flock mortality. *Can Vet.*
- L. Khan, G. L.-A. (2001). Distinctive Biochemical Characteristics of *Mycoplasma Agalactiae* and *Mycoplasma Bovis*. *Directorate-General for Research*(5), σσ. 60-63.
- M. Guell, V. V.-B. (2009). Transcriptome complexity in a genome-reduced Bacterium. *Science*, 326, σσ. 1268 - 1271. doi:DOI: 10.1126/science.1176951
- M. I. Yattoo, O. R. (2019). Contagious caprine pleuropneumonia - a comprehensive review. *Vet Q*, 1-25. doi:10.1080/01652176.2019.1580826.
- M. S. Bidhendi, P. K. (2011). Isolation and identification of *Mycoplasma agalactiae* culture and Polymerase Chain Reaction in Sheep Goat Milk Samples in Kordestan Province, Iran. *Archives of Razi Institute*, 66, σσ. 11-16. doi:10.22092/ari.2016.103860
- M. Todaro, R. P. (2014). Determination of milk production losses in Valle del Belice sheep following experimental infection of *Mycoplasma agalactiae*. *Small Ruminant Research*, σσ. 167-172. Ανάκτηση από <http://dx.doi.org/10.1016/j.smallrumres.2014.10.005>
- M.S. Barbosa, L. M.-D. (2022). Host cell interactions of novel antigenic membrane proteins of *Mycoplasma agalactiae*. *BMC Microbiol.* Ανάκτηση από <https://doi.org/10.1186/s12866-022-02512-2>
- McKinnon, K. (2018). Flow Cytometry: An Overview. *Curr Protoc Immunol*. doi:10.1002/cpim.40
- MMA. Halium, F. S. (2019). Isolation and molecular characterization of *Mycoplasma* spp. in sheep and goats in Egipt. *Vet World*, σσ. 664-670. doi:10.14202/vetworld.2019.664-670
- N. González-Escalona, A. F. (2006). Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction analysis of *Vibrio cholerae* cells entering the viable but non-culturable state and starvation in response to cold shock. *Environ Microbiol.* doi:10.1111/j.1462-2920.2005.00943.x
- N. Khehra, I. S. (2025). Polymerase Chain Reaction (PCR). *StatPearls*. Ανάκτηση από <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK589663/>
- NEW ENGLAND Biolabs. (χ.χ.). Ανάκτηση από Monarch® Spin PCR & DNA Cleanup Kit (5μg) (#T1130L) : <https://www.neb.com/en/products/t1130-monarch-spin-pcr-and-dna-cleanup-kit-5-ug?srsltid=AfmBOOpSGUwDeBirCziwBb2BsUZ8bkwCFn72e6b6c-Ew4hAQ4mOsvLzt>
- Nicholas, R. A. (2002). Improvements in the diagnosis and control of diseases of small ruminants in mycoplasmas. *Small Ruminant Research*(45), σσ. 145-149.

- O. Kizil, H. O. (2006). CLINICAL, HAEMATOLOGICAL AND BIOCHEMICAL STUDIES IN GOATS NATURALLY INFECTED WITH MYCOPLASMA AGALACTIAE. *Bulletin in Veterinary Institute in Pulawy*, σσ. 325-328.
- P. Assuncao, H. M. (2007). Detection of mycoplasmas in goat milk by flow cytometry. *Cytometry*, σσ. 1034 - 1038. Ανάκτηση από <https://doi.org/10.1002/cyto.a.20476>
- P. Kumar, A. R. (2011). Isolation and molecular charecterization of Mycoplasma isolates grom goats of Gujarat State, India. *Veterinarski arhiv*, σσ. 443-458. doi:<https://hrcak.srce.hr/70931>
- PCR Principle. (χ.χ.). Ανάκτηση από BOSTER antibody and ELISA experts: https://www.bosterbio.com/protocol-and-troubleshooting/pcr-principle?srsItd=AfmBOooX1oRdkHLKYmES7jRMHXCsbItHMnBdctT81wQbPzh9tOiqR_3d
- Puerta, T. P. (2021). *Learn about Contagious Agalactia: Giving it the relevance it deserves*. Ανάκτηση από What about small ruminants?: <https://aboutsmallruminants.com/contagious-agalactia-udder/>
- R. A.J. Nicholas, J. B. (1995). Mycoplasma mycoides subspecies mycoides (Small Colony Variant): the Agent of Contagious Bovine Pleuropneumonia and Member of the "Mycoplasma mycoides Cluster". *J. Comp. Path*, σσ. 1-27.
- R. S. Rosales, R. P. (2017). Mycoplasmas: Brain invaders? *Veterinary Science*, 113, σσ. 56-61. Ανάκτηση από <http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2017.09.006>
- Razin, S. (1978). The mycoplasmas. *Microbiological reviews*, 414 - 470.
- S. Aydin, E. E. (2025). An overview of ELISA: a review and update on best laboratory practices for quantifying peptides and proteins in biological fluids. *Journal of International Medical Research*. doi:10.1177/03000605251315913
- S. Halbedel, J. S. (2007). Tools for the genetic analysis of Mycoplasma. *International Journal of Medical Microbiology*, 297, σσ. 37-44. doi:10.1016/j.ijmm.2006.11.001
- S. Hegde, M. Z.-D. (2018). Novel role of Vpmas as major adhesins of Mycoplasma agalactiae mediating differential cell adhesion and invasion of Vpma expression variants. *International Journal of Medical Microbiology*, σσ. 263-270. Ανάκτηση από <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2017.11.010>
- S. Lorenzon, L. M.-S. (2008). Specific real-time PCR assays for the detection and quantification of Mycoplasma mycoides subsp. mycoides SC and Mycoplasma capricolum subsp. capripneumoniae. *Molecular and Cellular Probes*, 324-328. doi:10.1016/j.mcp.2008.07.003

- S. Migliore, R. P. (2021). *Mycoplasma agalactiae*: The Sole Cause of Classical Contagious Agalactia? *Animals*. Ανάκτηση από <https://doi.org/10.3390/ani11061782>
- S. Razin, L. H. (2010). Highlights of mycoplasma research - An historical perspective. *Biologicals*, σσ. 183-190. doi:10.1016/j.biologicals.2009.11.008
- S. Rosati, P. R. (2000). Expression and antigenic characterization of recombinant *Mycoplasma agalactiae* P48 major surface protein. *Veterinary Microbiology*, σσ. 201-210. Ανάκτηση από [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(99\)00164-9](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(99)00164-9)
- Spickler, A. R. (2018). *Contagious Agalactia*.
- T. S. Gunasekera, P. V. (2000). A Flow Cytometry Method for Rapid Detection and Enymeration of Total Bacteria in Milk. *Applied and environmental Microbiology*, 3(66), σσ. 1228 - 1232. doi:10.1128/AEM.66.3.1228-1232.2000
- Tamang, S. (2024). Sanger Sequencing: Principle, Steps, Applications, Diagram. *Microbe Notes*.
- Telford, W. G. (2023). Flow cytometry and cell sorting. *Frontiers in Medicine*. doi:10.3389/fmed.2023.1287884
- V. Kumar, R. R. (2013). Isolation and Characterization of *Mycoplasma mycoides* Subspecies capri from Milk of Natural Goat Mastitis Cases. *Veterinary Science*. Ανάκτηση από <https://doi.org/10.1155/2013/593029>