



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΥΓΙΕΙΝΗΣ & ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑΣ

Διευθυντής: Καθηγητής Χρήστος Χατζηχριστοδούλου



Διδακτορική Διατριβή

**«Αναζήτηση της δυνατότητας αξιοποίησης της αναλυτικής
μεθόδου MALDI-TOF στην τυποποίηση της *B.melitensis* σε
δείγματα ανθρώπων, αιγών, προβάτων και γάλακτος»**

υπό

ΣΟΦΙΑΣ Θ. ΧΡΙΣΤΟΦΟΡΙΔΟΥ

Κτηνιάτρου Α.Π.Θ.

MSc Δημόσιας Υγείας & Περιβαλλοντικής Υγιεινής, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο
Θεσσαλίας

Υπεβλήθη για την εκπλήρωση μέρους των
απαιτήσεων για την απόκτηση του
Διδακτορικού Διπλώματος
Λάρισα, 2019

© 2019 Σοφία Χριστοφορίδου

Η διδακτορική διατριβή υλοποιήθηκε με υποτροφία του ΙΚΥ η οποία χρηματοδοτήθηκε από την Πράξη «Πρόγραμμα χορήγησης υποτροφιών για μεταπτυχιακές σπουδές δεύτερου κύκλου σπουδών» από πόρους του ΕΠ «Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού, Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση», 2014-2020 με τη συγχρηματοδότηση του Ευρωπαϊκού Κοινωνικού Ταμείου (Ε.Κ.Τ.) και του Ελληνικού Δημοσίου.



Επιχειρησιακό Πρόγραμμα
Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού,
Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση
Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα (σύμφωνα με τις διατάξεις του άρθρου 202, παράγραφος 2 του Ν.5343/1932).

Εγκρίθηκε από τα Μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής (15^η/29-05-2019 ΓΣΕΣ):

**1^{ος} Εξεταστής
(Επιβλέπων)**

Δρ. Χρήστος Χατζηχριστοδούλου
Καθηγητής, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

2^{ος} Εξεταστής

Δρ. Γεώργιος Ραχιώτης
Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

3^{ος} Εξεταστής

Δρ. Λουκία Αικατερινιάδου
Διευθύντρια Ερευνών, Ινστιτούτο Κτηνιατρικών Ερευνών ΕΛΓΟ «ΔΗΜΗΤΡΑ»

4^{ος} Εξεταστής

Δρ. Ευθυμία Πετεινάκη
Καθηγήτρια, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

5^{ος} Εξεταστής

Δρ. Ματθαίος Σπελέτας
Καθηγητής, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

6^{ος} Εξεταστής

Δρ. Κωνσταντίνος Μακαρίτσης
Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

7^{ος} Εξεταστής

Δρ. Κωνσταντίνος Παπαγιαννίτσης
Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Υγιεινής και Επιδημιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και του Ινστιτούτου Κτηνιατρικών Ερευνών του Ελληνικού Οργανισμού «ΔΗΜΗΤΡΑ» (IKE-ΕΛΓΟ «ΔΗΜΗΤΡΑ»). Η ολοκλήρωση της διατριβής δε θα ήταν εφικτή χωρίς τη συνεισφορά κάποιων ανθρώπων στους οποίους θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες.

Αρχικά, θα ήθελα να απευθύνω τις θερμότερες ευχαριστίες μου στον επιβλέποντα αυτής της διδακτορικής μελέτης και Καθηγητή του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κ. Χρήστο Χατζηχριστοδούλου, για την ανάθεση του θέματος και την εμπιστοσύνη του στο πρόσωπό μου, καθώς και για την πολύτιμη βοήθεια, συμβολή και καθοδήγησή του καθ' όλη τη διάρκεια της μελέτης.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στην Διευθύντρια Ερευνών του ΙΚΕ Δρ. Λουκία Αικατερινιάδου για την αμέριστη βοήθειά της στη συγγραφή της μελέτης καθώς και τη διεξαγωγή των πειραμάτων. Ευχαριστώ, επίσης, τον Αναπληρωτή Καθηγητή του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κ. Γεώργιο Ραχιώτη για την τιμή που μου έκανε να συμμετάσχει στην τριμελή συμβουλευτική επιτροπή της διατριβής καθώς και για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον Διευθυντή Ερευνών και Διευθυντή του ΙΚΕ κ. Αντώνιο Ζδράγκα, για τη βοήθεια και ανεκτίμητη συνεισφορά του στην εκπόνηση της διατριβής, τόσο σε επίπεδο διεξαγωγής των πειραμάτων όσο και σε επίπεδο συγγραφής, ο οποίος ήταν πρόθυμος ανά πάσα στιγμή να προσφέρει τις γνώσεις του και τη βοήθειά του.

Θα ήταν παράλειψή μου να μην ευχαριστήσω την κ. Μαρία Κυρίτση, Βιοπαθολόγο-Μικροβιολόγο της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και την κ. Ευρυδίκη Μπουκουβάλα, Εντεταλμένη Ερευνήτρια του ΙΚΕ, για την πολύτιμη βοήθειά τους καθώς και την άψογη συνεργασία που είχαμε καθ' όλη τη διάρκεια της διδακτορικής διατριβής.

Θερμότατα ευχαριστώ επίσης τον κ. Παναγιώτη Τσάκο, κτηνίατρο του Κέντρου Κτηνιατρικών Ιδρυμάτων Θεσσαλονίκης, την κ. Ευανθία Πετρίδου, Επίκουρη Καθηγήτρια της Κτηνιατρικής Σχολής του Α.Π.Θ., τον κ. Ιωσήφ Παπαπαρασκευά, Επίκουρο Καθηγητή της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, τον κ. Σαμούρη Γεώργιο, Διευθυντή Ερυνών του ΙΚΕ, την κ. Ψαρουλάκη Άννα, Επίκουρη Καθηγήτρια του Πανεπιστημίου Κρήτης και τον κ. Σανδαλάκη Βασίλειο, Μεταδιδακτορικό Ερευνητή της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης για την καθοριστική συμβολή τους στη συγκέντρωση των βακτηριακών στελεχών της μελέτης. Ένα μεγάλο «ευχαριστώ» οφείλω στον Διευθυντή της Γενικής Διεύθυνσης Κτηνιατρικής του Υπουργείου Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων κ. Θωμά Αλεξανδρόπουλο για τη χορήγηση του εμβολιακού στελέχους Rev-1.

Θερμές ευχαριστίες για τη συνεργασία θα ήθελα να απευθύνω και στο προσωπικό του ΙΚΕ και του Εργαστηρίου Υγιεινής και Επιδημιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Τον φιλόλογο Ιωάννη Ζιάρρα ευχαριστώ θερμά για τη γλωσσική επιμέλεια του τελικού κειμένου.

Τέλος, το πιο μεγάλο «ευχαριστώ» δικαιωματικά το οφείλω στους γονείς μου και τον Δημήτρη, οι οποίοι ήταν η δύναμή μου όλο αυτό το χρονικό διάστημα. Η παρούσα διατριβή δε θα ήταν δυνατόν να πραγματοποιηθεί χωρίς την παρουσία, υπομονή, βοήθεια και στήριξή τους - τους την αφιερώνω.

Σ. Θ. Χριστοφορίδου

ΣΥΝΤΟΜΟ ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ

Προσωπικά Στοιχεία

Όνοματεπώνυμο Σοφία Θ. Χριστοφορίδου

Τηλέφωνο 6907377077

E-mail xristof_sof@yahoo.gr

Ακαδημαϊκές Σπουδές

1999-2006 Πτυχίο Κτηνιατρικής ΑΠΘ

Κατεύθυνση Υγιεινής & Τεχνολογίας Τροφίμων Ζωικής

Προέλευσης

2009-2011 MSc Δημόσιας Υγείας και Περιβαλλοντικής Υγιεινής-
Ασφάλεια & Ποιότητα Τροφίμων και Υδάτων, Ιατρική
Σχολή Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

2013-2014 Σεμινάριο στη Μικροβιολογία Υδάτων, Πανεπιστήμιο
Πατρών, Πανεπιστήμιο Αιγαίου, Α.Π.Θ., ΤΕΙ Αθήνας

2014 Σεμινάρια στη Βιοπληροφορική, Πανεπιστήμιο Ουψάλας,
Σουηδία

2014-2019 Υποψήφια Διδάκτωρ Τμήματος Ιατρικής, Πανεπιστήμιο
Θεσσαλίας, Εργαστήριο Υγιεινής & Επιδημιολογίας

Επαγγελματική Εμπειρία

2007-2009 Κτηνίατρος - Υπεύθυνη συντονισμού προγραμμάτων
στείρωσης, περίθαλψης και εμβολιασμού αδέσποτων ζώων σε
11 δήμους της Ανατολικής Θεσσαλονίκης

2010-2011 Κτηνίατρος στο Τμήμα Κτηνιατρικής της Π.Ε. Ξάνθης

2011-2013 Κτηνίατρος σε Ιατρείο Μικρών Ζώων, Αθήνα

2014-2015 Εργαστηριακή Κτηνίατρος σε ερευνητικά προγράμματα,
ΕΛΓΟ-«ΔΗΜΗΤΡΑ» ΙΚΕ

2017-2018	Εργαστηριακή Κτηνίατρος στο Εργαστήριο Αναφοράς Βρουκέλλωσης, Λάρισα
2018-2019	Εργαστηριακή Κτηνίατρος σε ερευνητικό πρόγραμμα, ΕΛΓΟ-«ΔΗΜΗΤΡΑ» ΙΚΕ
2019-σήμερα	Κτηνίατρος στη Διεύθυνση Κτηνιατρικής της Π.Ε. Λάρισας

Επιστημονικό Έργο

Από το 2007 έως σήμερα:

5 δημοσιεύσεις και **2** υπό κρίση, **5** συμμετοχές σε συνέδρια, συμμετοχή σε **5** ερευνητικά προγράμματα

Μέλος Οργανισμών, Επιμελητηρίων, Επιτροπών

Γεωτεχνικό Επιμελητήριο Ελλάδας (2007)

Πανελλήνιος Κτηνιατρικός Σύλλογος (2007)

Ξένες Γλώσσες – Γνώση Ηλεκτρονικών Υπολογιστών

Αγγλικά: Άριστη γνώση

Ισπανικά: Πολύ Καλή Γνώση

Γερμανικά: Καλή Γνώση

Χρήση Η/Υ: Άριστη γνώση

**«Αναζήτηση της δυνατότητας αξιοποίησης της αναλυτικής
μεθόδου MALDI-TOF στην τυποποίηση της B.melitensis σε
δείγματα ανθρώπων, αιγών, προβάτων και γάλακτος»**

ΣΟΦΙΑ ΧΡΙΣΤΟΦΟΡΙΔΟΥ

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Ιατρικής, 2019

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. **Δρ. Χρήστος Χατζηχριστοδούλου** Καθηγητής, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο
Θεσσαλίας (Επιβλέπων)
2. **Δρ. Γεώργιος Ραχιώτης** Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Ιατρικής,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
3. **Δρ. Λουκία Αικατερινιάδου** Διευθύντρια Ερευνών, Ινστιτούτο Κτηνιατρικών
Ερευνών - ΕΛΓΟ «ΔΗΜΗΤΡΑ»

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η βρουκέλλωση αποτελεί μία από τις συχνότερες ζωνόσους στην Ελλάδα. Παρά τη συστηματική εφαρμογή προγραμμάτων αντιμετώπισης από το 1975, η νόσος εξακολουθεί να ενδημεί στην Ελλάδα με σοβαρές επιπτώσεις στη Δημόσια Υγεία και την κτηνοτροφία. Η συχνή υπο-δήλωση του νοσήματος, η εμφάνιση διασταυρούμενων αντιδράσεων με τη χρήση των υπάρχουσών μεθόδων στην καθημερινή διάγνωση της βρουκέλλωσης και η αδυναμία διάκρισης του εμβολιακού στελεχους Rev-1 από τα φυσικά μολυσματικά στελέχη *B. melitensis* με τις συμβατικές τεχνικές αποτελούν μερικά από τα σημαντικότερα προβλήματα των προγραμμάτων επιτήρησης και αντιμετώπισης της νόσου.

Τα τελευταία χρόνια, η φασματομετρία χρόνου πτήσης με Ιοντισμό Εκρόφησης με Λείζερ Υποβοηθούμενο από τη Μήτρα (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight/Mass Spectrometry - MALDI-TOF MS) αποτελεί μία πολλά υποσχόμενη τεχνική για εφαρμογή στη διάγνωση της βρουκέλλωσης. Η μέθοδος έχει την ικανότητα να ταυτοποιεί μικροοργανισμούς συγκρίνοντας το πρωτεϊνικό τους προφίλ με τα πρωτεϊνικά φάσματα βιβλιοθηκών αναφοράς. Αν και πλεονεκτεί έναντι των υπόλοιπων διαγνωστικών τεχνικών, η εφαρμογή της μεθόδου MALDI-TOF MS στη διάγνωση της βρουκέλλωσης παραμένει ακόμα σχετικά περιορισμένη, γεγονός που οφείλεται κυρίως στις μη πλήρως ενημερωμένες βάσεις δεδομένων λόγω της ενδεχόμενης χρήσης του μικροοργανισμού ως βιολογικό όπλο.

Σε αντίθεση με άλλα βακτήρια, η ταυτοποίηση των βρουκελλών σε επίπεδο βιότυπου είναι εξαιρετικά δύσκολη εξαιτίας της μεγάλης γενωμικής ομολογίας μεταξύ των ειδών του γένους. Μέχρι σήμερα, πολλοί ερευνητές προσπάθησαν να τυποποιήσουν τις βρουκέλλες με τη μέθοδο MALDI-TOF MS σημειώνοντας φτωχά αποτελέσματα. Επιπλέον, δε γνωρίζουμε καμία μελέτη που να έχει εξετάσει τη δυνατότητα της μεθόδου στη διάκριση του εμβολιακού στελεχους Rev-1 από φυσικά μολυσματικά στελέχη *B. melitensis*. Σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν να δημιουργηθεί μία βάση δεδομένων ώστε να αξιολογηθεί η μέθοδος MALDI-TOF MS ως προς την ταυτοποίηση των βρουκελλών σε επίπεδο είδους, ενώ μέσω του προσδιορισμού αξιόπιστων κορυφών - βιοδεικτών να συμβάλει στην τυποποίηση των στελεχών *B.*

melitensis και τη διάκριση των φυσικά μολυσματικών στελεχών *B. melitensis* από το εμβολιακό στέλεχος Rev-1.

Απομονώθηκαν εβδομήντα πέντε στελέχη *Brucella* spp. από ασθενείς και ζώα σε τέσσερα γεωγραφικά διαμερίσματα της Ελλάδας κατά τη χρονική περίοδο 1999-2018. Η ταυτοποίηση των στελεχών σε επίπεδο είδους και βιότυπου βασίστηκε στη χρήση των μοριακών και βιοχημικών δοκιμών αντίστοιχα, ενώ η διάκριση των μολυσματικών στελεχών *B. melitensis* από το εμβολιακό στέλεχος Rev-1 προσεγγίστηκε με τη μεθοδολογία της PCR-RFLP. Στη συνέχεια, κατασκευάστηκε μία βιβλιοθήκη αναφοράς με σκοπό την ανάλυση όλων των στελεχών της μελέτης και τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν με αυτά των μοριακών και συμβατικών τεχνικών. Η αξιολόγηση της MALDI-TOF MS στη διάκριση των βιότυπων της *B. melitensis* καθώς και στη διαφοροποίηση της εμβολιακής από τη φυσική λοίμωξη πραγματοποιήθηκε με την ενίσχυση της βιβλιοθήκης αναφοράς με επιπλέον φάσματα. Η επεξεργασία των φασμάτων για την ανίχνευση των βιοδεικτών πραγματοποιήθηκε με το στατιστικό πακέτο MALDIquant του λογισμικού Mass-Up.

Από τα 75 στελέχη που αναλύθηκαν, η μέθοδος MALDI-TOF MS κατάφερε να ταυτοποιήσει 73 στελέχη (97,33%) ως *B. melitensis* και δύο στελέχη (2,67%) ως *B. abortus*, σημειώνοντας στην πλειοψηφία των στελεχών scores > 2.300. Τα αποτελέσματα ήταν 100% συγκρίσιμα με τα αποτελέσματα των μοριακών και βιοχημικών δοκιμών. Η ανάλυση των φασμάτων με το λογισμικό Mass-Up κατέδειξε συνολικά τέσσερις πρωτεϊνικές κορυφές (5207, 8026, 8038 και 9664 Da), που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως πιθανοί βιοδείκτες για τη διάκριση των βιότυπων της *B. melitensis* ($p < 0,05$ και $q < 0,05$). Μετά την ανεύρεση των βιοδεικτών, ακολούθησε η αναζήτησή τους στα προφίλ των 62 στελεχών που δε συμμετείχαν στην κατασκευή της βάσης δεδομένων. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η βιβλιοθήκη αναφοράς μπορεί να τυποποιήσει το 75,81% των στελεχών *B. melitensis* hv. 3. Αντίθετα, η διαχωριστική ικανότητα της μεθόδου δε μπόρεσε να εκτιμηθεί για τους άλλους δύο βιότυπους, καθώς τα μόνα διαθέσιμα στελέχη αξιοποιήθηκαν στην κατασκευή της βάσης. Από τη σύγκριση των πρωτεϊνικών προφίλ των φυσικά μολυσματικών στελεχών *B. melitensis* και των εμβολιακών στελεχών Rev-1 διαπιστώθηκε ότι υπάρχουν δύο στατιστικά σημαντικές κορυφές (3528 και 7328 Da)

που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως πιθανοί βιοδείκτες για τη μεταξύ τους διάκριση ($p < 0,05$ και $q < 0,05$). Κατά την αναζήτηση των δεικτών αυτών στα φάσματα των στελεχών της μελέτης προέκυψε ότι 72 στελέχη (98,63%) ήταν φυσικά μολυσματικά, ενώ μόνο ένα στέλεχος (1,37%) ταυτοποιήθηκε ως εμβολιακό. Τα αποτελέσματα αυτά ήταν σε απόλυτη συμφωνία με τα αποτελέσματα της μεθόδου PCR-RFLP.

Η νέα βιβλιοθήκη αναφοράς μπορεί να ταυτοποιήσει τις βρουκέλλες σε επίπεδο είδους με υψηλή ακρίβεια προσφέροντας παράλληλα μία πιο οικονομική και γρήγορη επιλογή στη διαγνωστική προσέγγιση του νοσήματος. Η μέθοδος δεν επηρεάζεται από άλλους συγγενείς μικροοργανισμούς με το γένος *Brucella*, γεγονός που προσδίδει στη μέθοδο μία υπεροχή έναντι των ορολογικών δοκιμών. Επιπλέον, η ικανότητα της βιβλιοθήκης να διαφοροποιεί την εμβολιακή από τη φυσική λοίμωξη με τη χρήση ειδικών βιοδεικτών θεωρείται μείζονος σημασίας στα προγράμματα επιδημιολογικής επιτήρησης και ελέγχου της βρουκέλλωσης. Ωστόσο, η συνεχής διεύρυνση της βάσης με νέα φάσματα θεωρείται απαραίτητη για την αύξηση της δυναμικής της στην τυποποίηση των στελεχών *B. melitensis* και τη μελλοντική ευρεία εφαρμογή της μεθόδου MALDI-TOF MS στην καθημερινή κλινικο-εργαστηριακή πράξη.

ΛΕΞΕΙΣ-ΚΛΕΙΔΙΑ: *Brucella melitensis*, MALDI-TOF, PCR, RFLP, βιότυπος, βιοδείκτης, ταυτοποίηση, Rev-1.

ABSTRACT

Brucellosis is one of the most common zoonoses in Greece. Despite the intensive implementation of control programs since 1975, the disease still remains endemic in Greece with severe impacts on public health and livestock production. The frequent under-reporting of the disease, the observation of cross-reactions with the use of the existing methods in brucellosis' routine diagnosis and the inability of conventional techniques to distinguish vaccine strain Rev-1 from *B. melitensis* field endemic strains are some of the most significant problems of brucellosis' surveillance and control programs.

In the last years, Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight/Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) has emerged as a very promising technique in brucellosis diagnosis. The method's ability on microorganisms' identification lies on the comparison of their protein profiles with the reference spectra databases. Although MALDI-TOF MS is superior to the conventional and molecular analytical techniques, its use in brucellosis diagnosis is still limited, as *Brucella* spp. is still not incorporated in the developed protein databases due to its potential bioterrorist use.

Unlike other bacteria, identification of brucellae at biotype level is very difficult due to their high intragenetic homology. Until now, several researchers have focused on MALDI-TOF MS identification of brucellae with poor results. Furthermore, to the best of our knowledge, no previous studies have accessed the method's ability to discriminate vaccine strain Rev-1 from *B. melitensis* field endemic strains. The objective of this study was to construct a custom database in order to evaluate MALDI-TOF MS to identify *Brucella* spp. at species level, whereas by the determination of reliable peak biomarkers to discriminate *Brucella melitensis* at biovar level and *Brucella melitensis* field endemic strains from vaccine strain Rev-1.

Seventy-five *Brucella* spp. strains were isolated from patients and animals in four geographical districts of Greece during the period interval 1999-2018. The identification of isolates at species and biotype level was performed by molecular and biochemical tests respectively, whereas the discrimination of *B. melitensis* field endemic strains from vaccine strain Rev-1 was achieved by the PCR-RFLP methodology. Subsequently, all strains were analyzed by the newly constructed

reference database and the results were compared with those obtained via molecular and conventional techniques. Evaluation of MALDI-TOF MS discriminatory power among the three biovars of *B. melitensis* and the differentiation between vaccinal and field infection was performed after supplementing the custom database by additional spectra. Processing of spectra for reliable biomarkers' selection was achieved by the statistical package MALDIquant in Mass-Up software.

Out of 75 strains analyzed by MALDI TOF MS, 73 strains (97,33%) were identified as *B. melitensis* and two strains (2,67%) were identified as *B. abortus*, giving scores > 2.300 in the vast majority of strains. Results were 100% comparable to those obtained by molecular and biochemical tests. The Mass-Up analysis indicated four ion peaks in total (5207, 8026, 8038 and 9664 Da) that could serve as potential discriminating biovar peaks ($p < 0,05$ και $q < 0,05$). After biomarkers' selection was completed, the in-house database was challenged with 62 field strains, not having been used in the database construction. The results indicated that the reference library could identify correctly *B. melitensis* bv.3 isolates at 75,81%. On the contrary, no classification was achieved for *B. melitensis* bv. 1 and *B. melitensis* bv. 2, as the only strains available were used for the in-house database construction. The comparative evaluation of vaccines' and field strains' protein profiles revealed the presence of two statistically significant peaks (3528 and 7328 Da) that could serve as candidate biomarkers for their differentiation ($p < 0,05$ and $q < 0,05$). When the in-house database was challenged with field strains, it was concluded that 72 strains (98,63%) were field endemic strains, whereas only one isolate (1,37%) was identified as vaccine strain. These findings were in total agreement with the results of PCR-RFLP method.

The new custom reference library is able to identify brucellae at species level with high precision offering in the meantime a more economic and rapid choice in the diagnostic approach of the disease. The method does not seem to be affected by other microorganisms highly related to the genus *Brucella*, a fact which provides MALDI-TOF MS a superiority to serological tests. Furthermore, its ability to discriminate vaccine from field endemic strains by the use of reliable biomarkers is of major importance in brucellosis' surveillance and control programs. However, the continuous expansion of the database with additional spectra is considered necessary

to increase the method's dynamic in *B. melitensis* biotyping and for MALDI-TOF MS wide application in the daily clinical practice.

KEYWORDS: *Brucella melitensis*, MALDI-TOF, PCR, RFLP, biotype, biomarker, identification, Rev-1.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	xi
ABSTRACT.....	xv
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ.....	xix
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ	xxiv
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ.....	xxvi
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΩΝ.....	xxviii
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	4
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ	5
2.1. ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ ΒΡΟΥΚΕΛΛΩΣΗΣ.....	5
2.2. ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΒΡΟΥΚΕΛΛΩΝ	8
2.2.1. Μορφολογία & Ταξινόμηση.....	8
2.2.2. Καλλιεργητικά Χαρακτηριστικά	10
2.2.3. Μικροβιολογικά Χαρακτηριστικά.....	11
2.2.4. Αντιγονική δομή μικροβιακού κυττάρου βρουκελλών	12
2.2.4.1. Αντιγόνα Επιφανείας.....	13
2.2.4.2. Πρωτεΐνες εξωτερικής μεμβράνης	15
2.3. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ	16
2.4. ΜΕΤΑΔΟΣΗ-ΟΔΟΙ ΜΟΛΥΝΣΗΣ.....	23
2.5. ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ.	24
2.6. ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΟΛΟΓΙΑ.....	25
2.6.1. Συμπτωματολογία στα ζώα (μικρά μηρυκαστικά).....	25
2.6.2. Συμπτωματολογία στον άνθρωπο.....	26
2.7. ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ ΤΟΥ ΝΟΣΗΜΑΤΟΣ	28
2.7.1. Εργαστηριακή διάγνωση της βρουκέλλωσης στα μικρά μηρυκαστικά- Συμβατικές μέθοδοι.....	28
2.7.1.1. Άμεση μικροσκοπική εξέταση	28
2.7.1.2. Καλλιέργεια.....	30
2.7.1.3. Αλλεργική αντίδραση (Allergic Skin Test-AST).....	31
2.7.1.4. Ορολογικές μέθοδοι	31

2.7.1.4.1. Δοκιμή οροσυγκόλλησης σε σωλήνες (Serum Agglutination Tube Test (SATT)).....	31
2.7.1.4.2. Δοκιμή Ερυθρού της Βεγγάλης (Rose Bengal Plate Test-RBPT).....	32
2.7.1.4.3. Δοκιμή Σύνδεσης του Συμπληρώματος (Complement Fixation Test –CFT).....	32
2.7.1.4.4. Ανοσοενζυμική μέθοδος ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay).....	33
2.7.1.4.5. Δοκιμή πόλωσης του φθορίζοντος φωτός (Fluorescence Polarization Assay).....	34
2.7.2. Εργαστηριακή διάγνωση της βρουκέλλωσης στον άνθρωπο-Συμβατικές μέθοδοι.....	35
2.7.2.1. Καλλιέργεια.....	35
2.7.2.2. Ορολογικές μέθοδοι	36
2.7.2.2.1. Συγκολλητινοαντίδραση Wright (Standard Tube Agglutination Test-SAT).....	36
2.7.2.2.2. Συγκολλητινοαντίδραση RBPT (Rose Bengal Plate Test)	37
2.7.2.2.3. Σύνδεση Συμπληρώματος (Complement Fixation Test-CFT)...	37
2.7.2.2.4. Ενζυμική ανοσοπροσοροφητική μέθοδος (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay-ELISA).....	37
2.7.2.2.5. Δοκιμή αντιανθρώπινης σφαιρίνης (Δοκιμή Coombs).....	38
2.7.2.2.6. Μέθοδος πόλωσης του φθορίζοντος φωτός (FPA)	38
2.7.2.2.7. Ενδοδερμικές μέθοδοι	39
2.7.3. Εργαστηριακή διάγνωση της βρουκέλλωσης στα ζώα και τον άνθρωπο-Μέθοδοι μοριακής βιολογίας.....	39
2.7.3.1. Μέθοδος της αλυσιδωτής ανντίδρασης της πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction-PCR).....	40
2.7.3.2. Μέθοδος της πολυπλεκτικής αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (Multiplex PCR).....	41
2.7.3.3. Μέθοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real Time PCR-RT PCR)	42

2.7.3.4. Πολυμορφισμός μεγέθους περιοριστικών θραυσμάτων (Restriction Fragment Length Polymorphism-RFLP)	42
2.7.4. Εργαστηριακή διάγνωση της βρουκέλλωσης στα ζώα και τον άνθρωπο- Μέθοδοι πρωτεωμικής.....	43
2.7.4.1. Φασματοσκοπία Μάζας MALDI-TOF MS (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry).....	43
2.8. ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΒΡΟΥΚΕΛΛΩΣΗΣ.....	48
2.8.1. Αντιμετώπιση της νόσου στα μικρά μηρυκαστικά.....	48
2.8.2. Θεραπεία της νόσου στον άνθρωπο	49
2.9. ΠΡΟΛΗΨΗ ΒΡΟΥΚΕΛΛΩΣΗΣ	50
2.10. ΣΚΟΠΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	54
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	55
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	56
3.1. ΣΤΕΛΕΧΗ ΜΕΛΕΤΗΣ.....	56
3.2. ΠΡΟΤΥΠΑ ΣΤΕΛΕΧΗ.....	57
3.3. ΑΝΑΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ & ΈΛΕΓΧΟΣ ΚΑΘΑΡΟΤΗΤΑΣ ΣΤΕΛΕΧΩΝ.....	58
3.4. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΓΕΝΩΜΙΚΟΥ DNA (gDNA).....	59
3.5. ΜΟΡΙΑΚΗ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΣΤΕΛΕΧΩΝ	60
3.5.1. Ανάπτυξη Multiplex PCR για ταυτοποίηση στελεχών σε επίπεδο γένους και είδους.....	60
3.5.2. Ταυτοποίηση στελεχών με Real-Time PCR.....	62
3.6. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΜΕ ΤΙΣ ΜΕΘΟΔΟΥΣ ΤΗΣ ΚΛΑΣΣΙΚΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ.....	63
3.6.1. Ανάπτυξη παρουσία CO ₂	63
3.6.2. Ανάπτυξη παρουσία χρωστικών βασικής φουξίνης-θειονίνης.....	63
3.6.3. Παραγωγή υδρόθειου	64
3.6.4. Συγκόλληση με μονοειδικούς αντιορούς A & M.....	64
3.7. ΑΝΑΛΥΣΗ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ PCR-RFLP ΓΙΑ ΤΗ ΔΙΑΚΡΙΣΗ ΑΠΟ ΤΟ ΕΜΒΟΛΙΑΚΟ ΣΤΕΛΕΧΟΣ Rev-1	66
3.8. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ MALDI-TOF MS	67
3.8.1. Κατασκευή της βιβλιοθήκης αναφοράς	67
3.8.1.1. Επιλογή στελεχών για τη λήψη πρότυπων φασμάτων	67

3.8.1.2. Ανάλυση στελεχών με 16S rRNA gene sequencing	67
3.8.1.3. Πρωτόκολλο εκχύλισης πρωτεϊνών	68
3.8.1.4. Προετοιμασία πλάκας	69
3.8.1.5. Ανάλυση με MALDI-TOF MS	69
3.8.1.6. Δημιουργία φασμάτων αναφοράς (Mass Spectral Profiles-MSPs)	70
3.8.1.7. επικύρωση της βιβλιοθήκης αναφοράς MALDI-TOF MS.....	70
3.8.1.8. Κατασκευή MSP δενδρογράμματος.....	71
3.8.2. Διερεύνηση της δυνατότητας χρήσης της μεθόδου MALDI-TOF MS στη διάκριση των βιότυπων του είδους <i>B. melitensis</i>	71
3.8.2.1. Επιλογή στελεχών για φάσματα αναφοράς.....	71
3.8.2.2. Λήψη και επεξεργασία φασμάτων προς αναζήτηση ειδικών βιοδεικτών.....	72
3.8.3. Διερεύνηση της δυνατότητας χρήσης της μεθόδου MALDI-TOF MS στη διάκριση των φυσικά μολυσματικών στελεχών <i>B. melitensis</i> από το εμβολιακό στέλεχος Rev-1.....	72
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	73
4.1. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕ ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ	73
4.1.1. Έλεγχος απομόνωσης gDNA	73
4.1.2. Ταυτοποίηση με multiplex PCR.....	74
4.1.3. Ταυτοποίηση με Real-Time PCR	75
4.2. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕ ΤΙΣ ΜΕΘΟΔΟΥΣ ΤΗΣ ΚΛΑΣΣΙΚΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ.....	76
4.3. ΔΙΑΚΡΙΣΗ ΑΠΟ ΤΟ ΕΜΒΟΛΙΑΚΟ ΣΤΕΛΕΧΟΣ Rev-1 ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ PCR-RFLP.....	83
4.4. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΜΕ MALDI-TOF MS	84
4.4.1. Ταυτοποίηση για τη διάκριση σε επίπεδο είδους	84
4.4.2. Ταυτοποίηση για τη διάκριση σε επίπεδο βιότυπου.....	88
4.4.3. Διάκριση από το εμβολιακό στέλεχος Rev-1	89
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΣΥΖΗΤΗΣΗ	90
5.1. ΓΕΝΙΚΑ.....	90
5.2. ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ ΣΤΗΝ ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΚΑΙ ΤΗΝ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΤΗΣ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ	91

5.3. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΗΝ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΣΕ ΕΠΙΠΕΔΟ ΕΙΔΟΥΣ – ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΜΕ ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ	92
5.4. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ multiplex PCR	93
5.5.ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΠΟΥ ΠΡΟΚΥΠΤΟΥΝ ΑΠΟ ΤΗ ΒΙΟΧΗΜΙΚΗ ΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ <i>B. melitensis</i>	94
5.6. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ MALDI-TOF MS ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΗ ΔΥΝΑΤΟΤΗΤΑ ΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ <i>B. melitensis</i>	95
5.7. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ MALDI-TOF MS ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΗ ΔΙΑΚΡΙΣΗ ΤΩΝ ΦΥΣΙΚΑ ΜΟΛΥΣΜΑΤΙΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ <i>B. melitensis</i> ΑΠΟ ΤΟ ΕΜΒΟΛΙΑΚΟ ΣΤΕΛΕΧΟΣ Rev-1 – ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ PCR-RFLP.	96
5.8. ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΜΕΛΕΤΗΣ	98
5.9. ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ ΓΙΑ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΈΡΕΥΝΑ	98
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	99
Βιβλιογραφία.....	101
<i>Διεθνής Βιβλιογραφία</i>	<i>101</i>
<i>Ελληνική Βιβλιογραφία</i>	<i>131</i>

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Χαρακτηριστικά των ειδών του γένους <i>Brucella</i> (Corbel, 1998; Young, 2005; Pappas et al., 2005; Apostolou et al., 2010; Pappas, 2010; Eisenberg et al., 2012).	9
Πίνακας 2: Διαχωρισμός ειδών και βιοτύπων του γένους <i>Brucella</i> με βάση τα κυριότερα μεταβολικά χαρακτηριστικά (O'Callaghan and MacMillan, 2002).	12
Πίνακας 3: Επιδημιολογικά δεδομένα σχετικά με την παγκόσμια ενδημικότητα της βρουκέλλωσης (Pappas et al., 2006).	17
Πίνακας 4: Χρόνος επιβίωσης της <i>B. melitensis</i> σε συνθήκες ψύξης (4°C) σε διάφορα γαλακτοκομικά προϊόντα (ΚΕΕΛΠΝΟ, 2012d).	21
Πίνακας 5: Δοκιμές διαφοροποίησης των ειδών του γένους <i>Brucella</i> από τους υπόλοιπους Gram (-) αρνητικούς κοκκοβάκιλλους (Al Dahouk et al., 2003a).	29
Πίνακας 6: Σχήματα για τη θεραπεία της βρουκέλλωσης στον άνθρωπο (WHO, 2006; ΚΕΕΛΠΝΟ 2012e).	49
Πίνακας 7: Επιδημιολογικά δεδομένα των στελεχών που χρησιμοποιήθηκαν στο πλαίσιο της μελέτης.	56
Πίνακας 8: Χαρακτηριστικά εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην ανάπτυξη της μεθόδου multiplex PCR.	60
Πίνακας 9: Χαρακτηριστικά εκκινητών της μεθόδου Real-Time PCR.	62
Πίνακας 10: Αποτελέσματα βιοχημικής ταυτοποίησης στελεχών μελέτης.	77
Πίνακας 11: Αποτελέσματα ταυτοποίησης στελεχών με τη νέα βιβλιοθήκη αναφοράς της MALDI-TOF MS.	86

Πίνακας 12: Κορυφές που μπορούν να συμβάλουν στη διάκριση των τριών βιότυπων της *B. melitensis* καθώς και στη διαφοροποίησή τους από το εμβολιακό στέλεχος Rev-1 (p και $q < 0,05$).....89

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

- Εικόνα 1:** Σχηματική δομή του λιποπολυσακχαρίτη (LPS) των ειδών του γένους *Brucella* (Cardoso et al., 2006).13
- Εικόνα 2:** Διαχρονική εξέλιξη της δηλούμενης απόλυτης συχνότητας της βρουκέλλωσης στην Ελλάδα για το χρονικό διάστημα 1981-2014 (ΚΕΕΛΠΝΟ, 2012a; Ερμείδης & συν., 2016). 19
- Εικόνα 3:** Μέση ετήσια επίπτωση (κρούσματα ανά 100.000 πληθυσμού) της βρουκέλλωσης ανά γεωγραφικό διαμέρισμα κατοικίας ασθενούς, Ελλάδα, 2005-2011. Τα δεδομένα για το χρονικό διάστημα 1981-1997 προέρχονται από συγκεντρωτικά στοιχεία των Διευθύνσεων Υγείας, ενώ για το διάστημα 1998-2011 από το σύστημα υποχρεωτικής δήλωσης νοσημάτων του ΚΕΕΛΠΝΟ (ΚΕΕΛΠΝΟ, 2012a).20
- Εικόνα 4:** Σχηματική περιγραφή αρχής λειτουργίας MALDI-TOF MS (Kim et al., 2003).45
- Εικόνα 5:** Σχηματική απεικόνιση του προγράμματος αντιμετώπισης της βρουκέλλωσης στην Ελλάδα. (ΚΕΕΛΠΝΟ, 2012b).53
- Εικόνα 6:** Προσδιορισμός του gDNA που απομονώθηκε. Διαδρομή M: Μάρτυρας μοριακού μεγέθους 1 Kb, Διαδρομές 1-4: γενωμικό DNA από μολυσματικά στελέχη της *B. melitensis*.73
- Εικόνα 7:** Αποτελέσματα ταυτοποίησης των 75 στελεχών με τη μέθοδο multiplex PCR σε επίπεδο γένους (a) και είδους (b). M: Μάρτυρας μοριακού μεγέθους 100 bp, 1: *B. melitensis*, 2: *B. abortus*, 3: *B. suis*, 4: *B. ovis*, 5: *B. canis*, 6: *Staphylococcus aureus*, 7: *Salmonella typhimurium*, 8: *Bacillus megaterium*, 9: *Shigella flexneri*, 10: *Escherichia coli* 8879.74

Εικόνα 8: Αποτελέσματα της ταυτοποίησης των στελεχών με τη μέθοδο Real-Time PCR. Ο ανιχνευτής Cy5 ταυτοποιεί το γένος *Brucella*, ενώ οι ανιχνευτές VIC και FAM ταυτοποιούν τα είδη *B. melitensis* και *B. abortus* αντίστοιχα.....75

Εικόνα 9: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αгарόζης 3% (w/v) των προϊόντων ενίσχυσης του γονιδίου *omp2* από στελέχη της *B. melitensis*. Διαδρομές 1, 3, 5: Προϊόντα ενίσχυσης PCR από τα εμβολιακά στελέχη Rev-1 (Lot numbers: 163881, 181118 και 181119 αντίστοιχα) πριν από την πέψη με το ένζυμο περιορισμού *PstI*; Διαδρομές 2, 4, 6: Θραύσματα PCR από τα εμβολιακά στελέχη Rev-1 (Lot numbers: 163881, 181118 και 181119 αντίστοιχα) μετά την πέψη με το ένζυμο περιορισμού *PstI*; Διαδρομές 7 και 9: Προϊόντα ενίσχυσης PCR από στελέχη *B. melitensis* πριν από την πέψη; Διαδρομή 8: θραύσματα PCR σε φυσικά μολυσματικό στέλεχος *B. melitensis* μετά την πέψη; Διαδρομή 10: θραύσματα PCR στο στέλεχος *B. melitensis* B42 μετά την πέψη (εμβολιακό στέλεχος); M: Μάρτυρας μοριακού μεγέθους 100 bp. Όπως παρατηρούμε και στην εικόνα, το άκοπο τμήμα 282 bp του gDNA καθώς και το μεγαλύτερο θραύσμα πέψης με το ένζυμο περιορισμού *PstI* (238 bp) διακρίνονται ευκρινώς, ενώ το μικρότερο θραύσμα πέψης (44 bp) είναι μόλις ορατό.83

Εικόνα 10: Πρωτεϊνικά προφίλ για την ταυτοποίηση των ειδών του γένους *Brucella* spp. σε επίπεδο είδους με την αναλυτική μέθοδο MALDI-TOF MS. A: *Brucella abortus*, B: *Brucella melitensis*, C: *Brucella ovis* and D: *Brucella suis*.....85

Εικόνα 11: MSP δενδρόγραμμα πρότυπων στελεχών *Brucella* spp. Η απόσταση δίνεται σε au (arbitrary units).87

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΩΝ

Ξενόγλωσσες

Ag/Ab	Antigen/Antibody
AST	Allergic Skin Test
ATCC	American Type Culture Collection
au	arbitrary units
BCV	<i>Brucella</i> Chemical Vaccine
CFT	Complement Fixation Test
CFSPH	Center for Food Security and Public Health
CHCA	α -cyano-4-hydroxycinnamic acid
Ct	cycle threshold
DHB	2,5-dihydroxybenzoic acid
dNTP	deoxyribonucleotide triphosphate
ECDC	European Centre for Disease Prevention and Control
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EEA/EFTA	European Economic Area/European Free Trade Association
ELISA	Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
FA	ferulic acid
FPA	Fluorescence Polarization Assay
Fraction PI	Fraction Phenol Insoluble
FTIS	Fluorescein isothiocyanate
gDNA	genomic DNA
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
IgA/IgG/IgM	Immunoglobulin A/G/M
LC technique	Lysis Centrifugation technique
LPS	Lipopolysaccharide
MALDI-TOF MS	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight Mass Spectrometry
MLSA	Multilocus Sequence Analysis
MLVA	Multiple-Locus Variable number tandem repeat Analysis

MRT	Milk Ring Test
MSP	Main Spectra Profile
OIE	Office International des Epizooties
OMP	Outer Membrane Proteins
PCR	Polymerase Chain Reaction
PFGE	Pulsed-Field Gel Electrophoresis
RBPT	Rose Bengal Plate Test
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
SA	sinapinic acid
SAT	Standard Tube Agglutination Test
SATT	Serum Agglutination Tube Test
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
S/N	Signal to Noise ratio
TFA	Trifluoroacetic acid
TNF	Tumor Necrosis Factor
TSA	Tryptic Soy Agar
TSB	Tryptone Soya Broth
UK	United Kingdom
WHO	World Health Organization

Ελληνικές

Η.Π.Α.	Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής
ΕΕ	Ευρωπαϊκή Ένωση
ΕΝΥ	Εγκεφαλονωτιαίο Υγρό
ΚΕΕΛΠΝΟ	Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων
ΜΒ	Μοριακό Βάρος
ΥΠΑΑΤ	Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης & Τροφίμων

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η βρουκέλλωση αποτελεί μια από τις πιο συχνές ζωοανθρωπονόσους παγκοσμίως (Cutler et al., 2005) με εκτιμώμενα νέα ετήσια περιστατικά περισσότερα του μισού εκατομμυρίου (Pappas et al., 2006). Στην Ελλάδα η βρουκέλλωση είναι κατά βάση επαγγελματικό νόσημα με το 90% των καταγεγραμμένων περιστατικών να αποδίδονται στη μόλυνση με τη *B. melitensis* (Karagiannis et al., 2012; Andriopoulos et al., 2018; Fouskis et al., 2018; Paparaskevas et al., 2018).

Στη χώρα μας εκτρέφεται ένας από τους μεγαλύτερους πληθυσμούς αιγο-προβάτων στην Ευρωπαϊκή Ένωση και επομένως η σπουδαιότητα και κρισιμότητα της βρουκέλλωσης στην εθνική οικονομία, την κτηνοτροφία και τη Δημόσια Υγεία είναι ιδιαίτερα σημαντικές. Για το λόγο αυτό από το 1975 ξεκίνησε η εφαρμογή συστηματικών προγραμμάτων για τον έλεγχο της νόσου (ΥΠΑΑΤ, 2017). Ωστόσο, παρά την ευρεία εφαρμογή των προγραμμάτων, η χώρα μας παραμένει μέχρι σήμερα στη λίστα των 25 χωρών με τη μεγαλύτερη επίπτωση παγκοσμίως (20,9 καταγεγραμμένα περιστατικά / 1.000.000 πληθυσμού ετησίως) (Pappas et al., 2006).

Για τη μείωση της επίπτωσης της βρουκέλλωσης στον άνθρωπο κρίνεται αναγκαία η μείωσή της στο ζωικό πληθυσμό, γεγονός που στηρίζεται στη χρήση διαγνωστικών εργαλείων υψηλής ευαισθησίας και ειδικότητας (Hamdy & Amin, 2002). Τόσο στα ζώα όσο και στον άνθρωπο η διάγνωση της νόσου πραγματοποιείται είτε με αναζήτηση του λοιμογόνου παράγοντα σε παθολογικά υλικά, είτε με ανίχνευση του γονιδιώματος και των ειδικών αντισωμάτων κατά της βρουκέλλας (Apostolou et al., 2010; Deneke et al., 2011). Η καλλιέργεια, αν και θεωρείται η μόνη μέθοδος που μπορεί να θέσει αδιαμφισβήτητα την οριστική διάγνωση της βρουκέλλωσης, είναι χρονοβόρα, επίπονη και εμφανίζει χαμηλή ευαισθησία στις χρόνιες, εντοπισμένες και υποτροπιάζουσες μορφές της νόσου (15-20%) (Espinosa et al., 2009; Al Dahouk et al., 2013; Roushan & Ebrahimpour et al., 2015). Από την άλλη πλευρά, οι ορολογικές δοκιμές είναι μεν γρήγορες και οικονομικές, αλλά συχνά επηρεάζονται από μικροοργανισμούς που φέρουν κοινούς αντιγονικούς επιτόπους με τις βρουκέλλες (Christopher et al., 2010), ενώ επιπλέον αδυνατούν να διακρίνουν τη φυσική από την εμβολιακή λοίμωξη, δυσχεραίνοντας σημαντικά την επιδημιολογική επιτήρηση της νόσου (Banai et al., 1996; ΥΠΑΑΤ, 2017). Πρόσφατα, πολλές μελέτες (Morata et al., 2001; Navarro et al., 2004; Probert et al., 2004; Hinić et al., 2008; Huber et al., 2009;

Santis et al., 2011; Yu & Nielsen, 2010) έχουν στραφεί στη διάγνωση της βρουκέλλωσης με τη βοήθεια μοριακών μεθόδων, τονίζοντας τη μεγάλη ταχύτητα και ευαισθησία που παρουσιάζουν στην ανίχνευση του γονιδιώματος των βρουκελλών. Ωστόσο, και στην περίπτωση των μοριακών τεχνικών υπάρχουν σαφείς περιορισμοί όπως το υψηλό κόστος εξέτασης ανά δείγμα και η ανάγκη για εξειδικευμένο προσωπικό (Carbonnelle et al., 2011).

Μία δυναμική προοπτική στην ταυτοποίηση των βρουκελλών με υψηλή ακρίβεια, χαμηλό κόστος ανάλυσης και ελάχιστο χρόνο λήψης αποτελεσμάτων αποτελεί ο ιονισμός εκρόφησης υποβοηθούμενος από υλικό μήτρας και laser (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight/Mass Spectrometry - MALDI-TOF MS), ο οποίος έχει την ικανότητα να ταυτοποιεί μικροοργανισμούς συγκρίνοντας το πρωτεϊνικό τους προφίλ με τα πρωτεϊνικά φάσματα βιβλιοθηκών αναφοράς (Lay, 2001; Kalogeropoulou et al., 2008). Αν και εμφανίζει αρκετά χαρακτηριστικά που την καθιστούν ιδανική για χρήση σε επίπεδο ρουτίνας, η εφαρμογή της MALDI-TOF MS στη διαγνωστική προσέγγιση της βρουκέλλωσης παραμένει σχετικά περιορισμένη, γεγονός που οφείλεται στις μη πλήρως ενημερωμένες βάσεις δεδομένων εξαιτίας της υψηλής επικινδυνότητας του μικροοργανισμού (Al Dahouk et al., 2013). Μέχρι σήμερα, πολλοί ερευνητές (Ferreira et al., 2010; Lista et al., 2011; Sayour & Sayour, 2015; Mesureur et al., 2018; Sali et al., 2018) προσπάθησαν να τυποποιήσουν τα είδη του γένους *Brucella* με τη μέθοδο MALDI-TOF MS σημειώνοντας φτωχά αποτελέσματα, καθώς η γενωμική ομολογία μεταξύ των ειδών του γένους είναι εξαιρετικά μεγάλη και η αποτελεσματικότητα της μεθόδου επηρεάζεται από την ποιότητα της βάσης δεδομένων που χρησιμοποιείται για το σκοπό αυτό.

Λαμβάνοντας υπόψη, λοιπόν, τις αδυναμίες των μεθόδων που χρησιμοποιούνται σήμερα στη διάγνωση της βρουκέλλωσης και τη σημασία που έχει η αντιμετώπιση του νοσήματος στη διασφάλιση της Δημόσιας Υγείας, κρίθηκε σκόπιμο να αναζητηθεί η δυνατότητα αξιοποίησης της αναλυτικής μεθόδου MALDI-TOF MS στην τυποποίηση της *B. melitensis* σε δείγματα ασθενών και ζώων. Το γεγονός αυτό είναι σημαντικό όχι μόνο επειδή η ταυτοποίηση των βρουκελλών αποτελεί μεγάλη πρόκληση, αλλά και γιατί η μελλοντική ευρεία εφαρμογή της μεθόδου στην καθημερινή κλινικο-εργαστηριακή πράξη θα συμβάλει σημαντικά στην έγκαιρη και έγκυρη διάγνωση του νοσήματος και την οριστική αντιμετώπισή του. Παράλληλα, θα

ενισχύσει την επιδημιολογική επιτήρηση της βρουκέλλωσης με σκοπό την ουσιαστικότερη και πιο οργανωμένη καταγραφή της στη χώρα μας.

Ένα άλλο θέμα που κρίθηκε σκόπιμο να μελετηθεί στο πλαίσιο της παρούσας διατριβής, είναι η χρήση της μεθόδου MALDI-TOF MS στη διάκριση του εμβολιακού στελέχους Rev-1 από τα φυσικά μολυσματικά στελέχη *B. melitensis*. Το εμβολιακό στέλεχος Rev-1, αν και προσφέρει ικανοποιητικού βαθμού ανοσία στα ζώα, μπορεί να προκαλέσει ποικίλα προβλήματα στα προγράμματα ελέγχου της νόσου με κυριότερο την αδυναμία διάκρισής του από τα φυσικά στελέχη *B. melitensis* με τις ορολογικές τεχνικές (Banai et al., 1996; Bardenstein et al., 2002; Saaedzadeh et al., 2013; ΥΠΑΑΤ, 2017). Δεδομένης, λοιπόν, της τρέχουσας κατάστασης στην Ελλάδα και του γεγονότος ότι δεν υπάρχουν μελέτες γνωστές σε εμάς που να χρησιμοποιούν τη μέθοδο MALDI-TOF MS στη διάκριση της εμβολιακής από τη φυσική λοίμωξη, κρίθηκε σκόπιμο και χρήσιμο να αξιολογηθεί η μέθοδος ως προς τη δυνατότητά της να διαχωρίζει τα φυσικά μολυσματικά στελέχη *B. melitensis* από το εμβολιακό στέλεχος Rev-1 μέσω του προσδιορισμού ειδικών βιοδεικτών.

Η διατριβή περιλαμβάνει δύο μέρη, το γενικό και το ειδικό μέρος. Στο γενικό μέρος αναφέρονται τα στοιχεία που σχετίζονται με την ιστορική αναδρομή της νόσου, τα μικροβιολογικά και καλλιεργητικά χαρακτηριστικά, την αντιγονική σύσταση του μικροβίου και την επιδημιολογία της βρουκέλλωσης τόσο στην Ελλάδα όσο και στο εξωτερικό. Ακολούθως περιγράφονται οι τρόποι μετάδοσης της νόσου, η παθογένεια, η συμπτωματολογία στα ζώα και τον άνθρωπο, η αντιμετώπιση και η πρόληψη. Ιδιαίτερη έμφαση δίνεται στις εργαστηριακές μεθόδους και στα μειονεκτήματα που παρουσιάζουν στη διάγνωση της νόσου.

Στο ειδικό μέρος περιγράφονται η μεθοδολογία και τα αποτελέσματα της μελέτης. Ακολουθεί η συζήτηση των ευρημάτων σε σύγκριση με τα δεδομένα της διεθνούς βιβλιογραφίας και παρουσιάζονται τα κυριότερα συμπεράσματα καθώς και οι περιορισμοί της μελέτης.

Η διατριβή αυτή πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Υγιεινής & Επιδημιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας σε συνεργασία με το Ινστιτούτο Κτηνιατρικών Ερευνών του Ελληνικού Γεωργικού Οργανισμού «ΔΗΜΗΤΡΑ».

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ

2.1. ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ ΒΡΟΥΚΕΛΛΩΣΗΣ

Αν και οι πρώτες αναφορές της νόσου εντοπίζονται πολύ παλιά και έχουν περάσει περισσότερα από 100 χρόνια από την πρώτη απομόνωση του υπεύθυνου μικροοργανισμού, η βρουκέλλωση εξακολουθεί να διατηρεί το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας. Για πάρα πολλά χρόνια καταγράφονταν επιδημίες της νόσου, οι οποίες παρά την κοινή τους συμπτωματολογία, αντιμετωπίζονταν ως ξεχωριστές νοσολογικές οντότητες προκαλώντας τεράστια σύγχυση στον επιστημονικό κόσμο. Ενδεικτικό είναι ότι σε εργασία του Hughes που δημοσιεύτηκε το 1897, αναφέρονται 46 διαφορετικές ονομασίες που είχαν αποδώσει προηγούμενοι συγγραφείς στη βρουκέλλωση. Όλα αυτά συνεχίστηκαν μέχρι το 1861, όταν ο Marston έδωσε την πρώτη σαφή περιγραφή της κλινικής εικόνας της νόσου, ενώ λίγα χρόνια αργότερα απομονώθηκε για πρώτη φορά ο υπεύθυνος αιτιολογικός παράγοντας από τον Bruce.

Παρακάτω αναφέρονται με χρονολογική σειρά τα σημαντικότερα σημεία στην εξέλιξη και επιδημιολογία της βρουκέλλωσης από την πρώτη εμφάνισή της έως και σήμερα:

450 π.Χ.: ο Ιπποκράτης περιγράφει στο βιβλίο του «Επιδημίες» μία νόσο που παρουσιάζει αρκετές ομοιότητες με τη σημερινή ανθρώπινη βρουκέλλωση. Η νόσος χαρακτηρίζεται από υψηλό πυρετό με συχνή κατάληξη το θάνατο (Hughes, 1897).

1861: γίνεται για πρώτη φορά η ακριβής περιγραφή των συμπτωμάτων της νόσου από τον Βρετανό χειρουργό J. A. Marston (Young, 2005).

1887: ο Βρετανός στρατιωτικός γιατρός David Bruce σε συνεργασία με τον γιατρό Giuseppe Scicluna απομονώνουν για πρώτη φορά τον υπεύθυνο αιτιολογικό παράγοντα σε σπλήνες Βρετανών στρατιωτών. Αρχικά στον μικροοργανισμό αποδίδεται η ονομασία *Micrococcus melitensis*, εξαιτίας της απομόνωσής του στη Μάλτα (η αρχαία ελληνική ονομασία της Μάλτας είναι Μελίτη), ενώ η νόσος ονομάζεται αντίστοιχα «πυρετός της Μάλτας» (Cassar, 1992).

1897: ο Δανός κτηνίατρος Bernhard Bang απομονώνει από αποβληθέντα έμβρυα βοοειδών τον μικροοργανισμό *Bacillus abortus* (Bang, 1897). Έως τότε δεν υπήρχε

καμία συσχέτιση μεταξύ του «πυρετού της Μάλτας» και της νόσου που είχε προσδιορίσει ο Bang. Την ίδια χρονιά οι Wright και Smith ανιχνεύουν ειδικά για τον *Micrococcus melitensis* αντισώματα στο αίμα μολυσμένων ανθρώπων και αιγών και αναπτύσσουν μία μέθοδο (Συγκολλητινοαντίδραση Wright), η οποία μέχρι και σήμερα αποτελεί την κυριότερη διαγνωστική μέθοδο της νόσου στον άνθρωπο (Wright & Semple, 1897).

1905: στη Μάλτα ο Themistocles Zammit απομονώνει τον μικροοργανισμό από το αίμα μολυσμένων αιγών (Zammit, 1905), ενώ την ίδια χρονιά με την απομόνωση του μικροβίου από το γάλα μολυσμένης αίγας ο William Horrocks αποδεικνύει τη μετάδοση του νοσήματος από τα ζώα στον άνθρωπο μέσω της κατανάλωσης μολυσμένου γάλακτος και γαλακτοκομικών προϊόντων (Horrocks, 1905; Horrocks & Kennedy, 1906).

1914: στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής (Η.Π.Α.) απομονώνεται από τον Traum ένα νέο είδος από αποβληθέντα έμβρυα χοίρων, η *B. suis* (Rashman et al., 2006).

1918: η Αμερικανίδα μικροβιολόγος Evans δείχνει τη συσχέτιση μεταξύ της νόσου του Bang και του πυρετού της Μάλτας αποδεικνύοντας ότι οι δύο μικροοργανισμοί διαθέτουν κοινές μορφολογικές, αντιγονικές και καλλιεργητικές ιδιότητες και τους κατατάσσει στο γένος *Bacteriaceae* (Evans, 1918).

1920: οι Meyer και Shaw μετονομάζουν το γένος *Bacteriaceae* σε *Brucella* προς τιμήν του Bruce μετά από πρόταση της μικροβιολόγου Evans (Meyer & Shaw, 1920).

1930: ο Morales-Otero αποδεικνύει ότι η *B. abortus* είναι παθογόνος για τον άνθρωπο (Morales-Otero, 1930).

1931: ο Hardy αποδεικνύει ότι το είδος *B. suis* προκαλεί νόσο στον άνθρωπο (Carmichael, 1967).

1941: εφαρμόζονται οι πρώτοι εμβολιασμοί βοοειδών με το στέλεχος *B. abortus* S19 στις Η.Π.Α. (Rashman et al., 2006).

1952: η διαγνωστική μέθοδος MRT εισάγεται στο πρόγραμμα καταπολέμησης της νόσου στα βοοειδή (Rashman et al., 2006).

1953: στην Αυστραλία και τη Νέα Ζηλανδία οι Buddle και Boyes ταυτοποιούν από κριούς που εμφανίζουν επιδιδυμίτιδα ένα νέο είδος του γένους *Brucella*, τη *B. onis* (Rashman et al., 2006).

1957: απομονώνεται ο μικροοργανισμός *B. neotomae* από αρουραίους δασών, ο οποίος δεν προκαλεί νόσο στον άνθρωπο (Rashman et al., 2006).

1966: ο Carmichael απομονώνει το είδος *B. canis* σε αποβληθέν έμβρυο σκύλου φυλής Beagle (Carmichael, 1967).

1994: απομονώνονται για πρώτη φορά τα στελέχη που προσβάλλουν τα θαλάσσια θηλαστικά (Ewalt et al., 1994; Ross et al., 1994), τα οποία προτείνεται να ταξινομηθούν σε δύο είδη, τη *B. pinnipedialis* για τις φώκιες και τη *B. ceti* για τις φάλαινες και τα δελφίνια (Foster et al., 2007).

2003: αναφέρεται για πρώτη φορά μόλυνση των ανθρώπων από τα είδη που προσβάλλουν τα θαλάσσια θηλαστικά (Sohn et al., 2003).

2008: περιγράφεται η απομόνωση δύο νέων ειδών βρουκέλλας, της *B. inopinata* σε εμφύτευμα ανθρώπινου μαστού (De et al., 2008; Scholz et al., 2010) και της *B. microti* από τον κοινό αρουραίο και τις κόκκινες αλεπούδες (Scholz et al., 2008a; Scholz et al., 2009)

2009: απομονώνεται ένα νέο στέλεχος βρουκέλλας σε μπαμπούνους (*Brucella rapionis* sp. nov.), γεγονός που χρήζει ιδιαίτερης σημασίας διότι αφενός είναι η δεύτερη φορά που απομονώνεται βρουκέλλα σε πρωτεύοντα (μετά τον άνθρωπο) και αφετέρου θέτει το ερώτημα μήπως μετά τη θάλασσα το μικρόβιο πέρασε στη ζούγκλα (Schlabritz-Loutsevitch et al., 2009; Whatmore et al., 2014)

2012: απομονώνεται ένα νέο στέλεχος από βουβαλοβάτραχους του είδους *Ptyxicephalus edulis* στην Αφρική, το οποίο αν και φαινοτυπικά εμφανίζει ομοιότητες με το *Ochrobactrum anthropi*, με την ανάλυση των γονιδίων *recA*, *bcspr31*, *omp2a*, *omp2b* και *IS711* και τη βοήθεια της αναλυτικής μεθόδου MLSA (Multilocus Sequence Analysis) θεωρείται ότι ενδεχομένως να αποτελεί ένα νέο είδος του γένους *Brucella* (Eisenberg et al., 2012).

2.2. ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΒΡΟΥΚΕΛΛΩΝ

2.2.1. Μορφολογία & Ταξινόμηση

Η βρουκέλλωση αποτελεί μια χρόνια κοκκιωματώδη λοίμωξη, η οποία οφείλεται σε ενδοκυττάρια, Gram αρνητικά, μη σπορογόνα και χωρίς έλυτρο ή βλεφαρίδες βακτήρια (Alton et al., 1975).

Σύμφωνα με τη 16S rRNA ακολουθία του γονιδιώματος, οι βρουκέλλες ανήκουν στην οικογένεια *Rhizobiaceae*, ταξινομούνται στην α-2 υποομάδα των *Proteobacteria* (Eschenbrenner et al., 2002) και παρουσιάζουν στενή φυλογενετική σχέση με τα είδη *Ochrobactrum*, *Agrobacterium*, *Rickettsia*, *Rhodobacter*, *Bartonella* και *Rhizobium* (Jumas-Bilak et al., 1998; Moreno et al., 1990; Apostolou et al., 2010).

Επειδή τα είδη του γένους *Brucella* παρουσιάζουν μεγάλη γενωμική ομολογία μεταξύ τους (>95%), είχε προταθεί η ταξινόμησή τους σε ένα γένος με μοναδικό είδος τη *B. melitensis*, ενώ τα υπόλοιπα είδη να αποτελούν τους βιότυπους της *B. melitensis* (Verger et al., 1985). Ωστόσο, η πρόταση αυτή δεν έγινε αποδεκτή από το σύνολο της επιστημονικής κοινότητας εξαιτίας πολλών διαφορών που παρουσιάζουν τα είδη μεταξύ τους, όπως στις βιοχημικές και ορολογικές δοκιμές, στην επιλογή διαφορετικών ξενιστών, στη διαφορετική παθογόνο δράση και στην παρουσία ειδικών για κάθε είδος πρωτεϊνών στην εξωτερική μεμβράνη (outer membrane proteins-*omps*) καθώς και γονιδίων (Moreno et al., 2002). Σήμερα, η ταξινόμηση των ειδών του γένους *Brucella* γίνεται με βάση τον ξενιστή, τη λοιμογόνο δύναμη, τα βιοχημικά και τα καλλιεργητικά χαρακτηριστικά (Godfroid et al., 2005).

Οι βιότυποι, τα ζώα-ξενιστές, η γεωγραφική κατανομή και τα είδη που προσβάλλουν τον άνθρωπο περιγράφονται στον πίνακα 1 που ακολουθεί.

Πίνακας 1: Χαρακτηριστικά των ειδών του γένους *Brucella* (Corbel, 1998; Young, 2005; Pappas et al., 2005; Apostolou et al., 2010; Pappas, 2010; Eisenberg et al., 2012).

Είδη	Βιότοποι	Κύριοι ξενιστές	Περιγράφηκε από	Νόσος στον άνθρωπο	Γεωγραφική κατανομή
<i>B. melitensis</i>	1-3	Αίγες, πρόβατα, καμήλες	Bruce, 1887	++++	Χώρες Μέσης Ανατολής, Μεσογείου, Νότια Ινδία, Βόρεια Κίνα, Ρωσία, Αφρική και Μογγολία
<i>B. abortus</i>	1-6, 9	Βοοειδή	Bang, 1897	+++	Ευρώπη, Αμερική, Ασία, Αφρική
<i>B. suis</i>	1-5	Χοίροι, λαγοί, τάρανδοι	Traum, 1914	+	Αμερική, Ρωσία, Κεντρική και Δυτική Ευρώπη, Κίνα
<i>B. canis</i>	-	Κυνοειδή	Carmichael & Bruner, 1968	+	Χώρες Μεσογείου
<i>B. ovis</i>	-	Πρόβατα (κριοί)	Buddle & Boyes, 1953	-	Η.Π.Α.
<i>B. neotomae</i>	-	Τρωκτικά (αρουραίοι της ερήμου)	Stoenner & Lackman, 1957	-	Αμερική, Κεντρική Ευρώπη
<i>B. microti</i>	-	Κοινός αρουραίος, Κόκκινες αλεπούδες	Scholz et al., 2008	-	Κεντρική Ευρώπη
<i>B. inopinata</i>	-	Άγνωστος	De et al., 2008 Scholz et al., 2010	+ Εμφύτευμα μαστού	Αμερική (Ορεγκον)
<i>B. pinnipedialis</i> (προτεινόμενη ονομασία)	-	Φώκιες	Ewalt et al. 1994 Ross et al., 1994	+	Αμερική
<i>B. ceti</i> (προτεινόμενη ονομασία)		Φάλαινες, δελφίνια			
<i>B. parionis</i> (προτεινόμενη ονομασία)	-	Μπαμπούνιοι	Schlabritz-Loutsevitch et al., 2009 Whatmore et al., 2014	Άγνωστο	Η.Π.Α. (Τέξας)
Νέο είδος	-	βουβαλοβάτραχοι <i>Pyxicephalus edulis</i>	Eisenberg et al., 2012	Άγνωστο	Αφρική

2.2.2. Καλλιεργητικά χαρακτηριστικά

Τα είδη του γένους *Brucella* αναπτύσσονται σε θερμοκρασίες 36-38°C και pH 6,6-7,4 σε αερόβιες συνθήκες (European Union Committee, 2001). Εξαιρέση αποτελούν οι *B. abortus* και *B. onis*, οι οποίες στις πρωτοκαλλιέργειες απαιτούν ατμόσφαιρα CO₂ 5-10%. Ο χρόνος της επώασης κυμαίνεται από 48 ώρες έως 20 ημέρες (Κατσιαούνης, 1996).

Οι αποικίες διακρίνονται σε λείες (smooth), ενδιάμεσες (intermediate), τραχείς (rough), βλενώδεις (mucoid) και ψευδολείες (pseudosmooth) (Κατσιαούνης, 1996). Τις πρώτες 2-3 ημέρες ανάπτυξης των βρουκελλών στο εργαστήριο οι αποικίες έχουν χρωματισμό ιριδίζοντα λευκό όμοιο με μαργαριταριού, σχήμα σφαιρικό, διάμετρο 0,5-1 mm και λεία περιφέρεια σαφώς περιγεγραμμένη (λείες αποικίες-Smooth-S). Μετά από χρονικό διάστημα μεγαλύτερο των 4 ημερών, η μορφολογία, η λοιμογόνος δύναμη και η αντιγονικότητα αλλάζει. Οι αποικίες αυξάνονται σε μέγεθος, αποκτούν κυρτή επιφάνεια και το χρώμα τους γίνεται υποκίτρινο έως καστανόφαιο σε ανακλώμενο φωτισμό (τραχείς αποικίες-Rough-R) (Corbel & MacMillan, 1998; Shapiro & Wong, 1999; European Union Committee, 2001). Οι αποικίες ενδιάμεσης μορφής (intermediate) είναι αδιαφανείς, θαμπές, με επιφάνεια λιγότερο κοκκώδη σε σχέση με τις τραχείς, ενώ οι βλενώδεις (mucoid) εμφανίζονται γκριζωπές και ιδιαίτερα γλοιώδεις (Στουρνάρα-Τσελεπίδου, 2008).

Η μορφολογία των αποικιών εξαρτάται από τη σύσταση των λιποπολυσακχαριτών (LPS) των βρουκελλών, οι οποίοι είναι τα κύρια αντιγόνα της εξωτερικής στιβάδας του κυτταρικού τοιχώματος των βρουκελλών. Έτσι, οι LPS που έχουν έναν πολυσακχαρίτη με τύπο αλυσίδων O συσχετίζονται με τις λείες αποικίες, ενώ οι LPS που δεν έχουν O αλυσίδες συσχετίζονται με τις τραχείες αποικίες (R-LPS) (Cardoso et al, 2006). Τα είδη *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis* και *B. neotomae* στην αρχική απομόνωση εμφανίζονται σχεδόν πάντοτε στη φάση S, ενώ οι *B. onis* και *B. canis* βρίσκονται πάντοτε στη φάση R (Κατσιαούνης, 1996).

2.2.3. Μικροβιολογικά χαρακτηριστικά

Για την αρχική απομόνωση των περισσότερων στελεχών του γένους *Brucella* απαιτούνται αμινοξέα και βιταμίνες όπως η βιοτίνη, η θειαμίνη και το νικοτιναμίδιο. Επιπλέον, η προσθήκη ορού αίματος στα θρεπτικά υποστρώματα βελτιώνει την ανάπτυξη σημαντικά, ενώ η παρουσία χολικών αλάτων, σεληνίτη και τελλουρίτη την αναστέλλει πλήρως (European Union Committee, 2001).

Η βρουκέλλα είναι χημειότροφος μικροοργανισμός. Ο μεταβολισμός ορισμένων αμινοξέων, συστατικών του κύκλου της ουρίας και υδατανθράκων αποδεικνύει αφενός τη στενή σχέση μεταξύ των ειδών και αφετέρου χρησιμοποιείται για την ταξινόμηση των βρουκελλών. Η *Brucella melitensis* οξειδώνει την L-αλανίνη, την L-ασπαραγίνη και το L-γλουταμινικό οξύ, αλλά δεν οξειδώνει την L-αργινίνη, τη dl-κυτρουλίνη, τη dl-ορνιθίνη, την L-λυσίνη, την L-αραβινόζη, τη D-γαλακτόζη, τη D-ριβόζη και τη D-ξυλόζη. Η *Brucella abortus* διαφέρει από τη *Brucella melitensis* ως προς το ότι οξειδώνει το υπόστρωμα των υδατανθράκων, ενώ η *Brucella suis* διαφέρει από τα δύο προηγούμενα είδη ως προς το ότι οξειδώνει τα τέσσερα αμινοξέα του κύκλου της ουρίας (L-αλανίνη, L-ασπαραγίνη, L-ασπαρτικό οξύ και L-γλουταμινικό οξύ) (Meyer & Cameron, 1961).

Τα περισσότερα είδη του γένους *Brucella* δεν παράγουν ινδόλη, ανάγουν τα νιτρικά, αντιδρούν θετικά στη δοκιμή της καταλάσης, ενώ η δραστηριότητά τους προς την οξειδάση και την ουρεάση καθώς και η ικανότητά τους για παραγωγή H₂S από τα αμινοξέα ποικίλλει (European Union Committee, 2001).

Η διάκριση των βρουκελλών σε είδος και βιότυπο πραγματοποιείται, κυρίως, με τις εξής δοκιμές:

- Ανάπτυξη παρουσίας ατμόσφαιρας CO₂ 5-10%, ιδιαίτερα για την αρχική απομόνωση του στελέχους
- Παραγωγή H₂S
- Ευαισθησία στις χρωστικές βασική φουξίνη και θειονίνη
- Συγκόλληση με μονοειδικούς ορούς (Stableforth & Jones, 1963; Alton et al., 1988).

Πίνακας 2: Διαχωρισμός ειδών και βιοτύπων του γένους *Brucella* με βάση τα κυριότερα μεταβολικά χαρακτηριστικά (O'Callaghan and MacMillan, 2002).

Είδος/τύπος	Βιότυπος	Ανάπτυξη σε υπόστρωμα με				Συγκόλληση από μονοειδικούς ορούς		
		Ανάγκη CO ₂	Παραγωγή H ₂ S	Βασική. φουζίνη	Θειονίνη	<i>Abortus</i>	<i>Melitensis</i>	<i>Rough</i>
<i>B. melitensis</i>	1	-	-	+	+	-	+	-
	2	-	-	+	+	+	-	-
	3	-	-	+	+	+	+	-
<i>B. abortus</i>	1	+	+	+	-	+	-	-
	2	+	+	-	-	+	-	-
	3	(+) ¹	+	-	+	+	-	-
	4	(+)	+	+	-	-	+	-
	5	-	-	+	+	-	+	-
	6	-	-	+	+	+	-	-
<i>B. suis</i>	9	+	-	+	+	-	+	-
	1	-	++	-	+	+	-	-
	2	-	-	-	+	+	-	-
	3	-	-	+	+	+	-	-
	4	-	-	(-) ²	+	-	+	-
5	-	-	-	+	-	+	-	
<i>B. ovis</i>		+	-	-	+	-	-	+
<i>B. neotomae</i>		-	+	-	-	+	-	-
<i>B. canis</i>		-	-	-	+	-	-	+
<i>B. maris</i>		+ ή -	-	+	+	+	+ ή -	-

¹ (+): τα περισσότερα στελέχη θετικά

² (-): τα περισσότερα στελέχη αρνητικά

2.2.4. Αντιγονική δομή μικροβιακού κυττάρου βρουκελλών

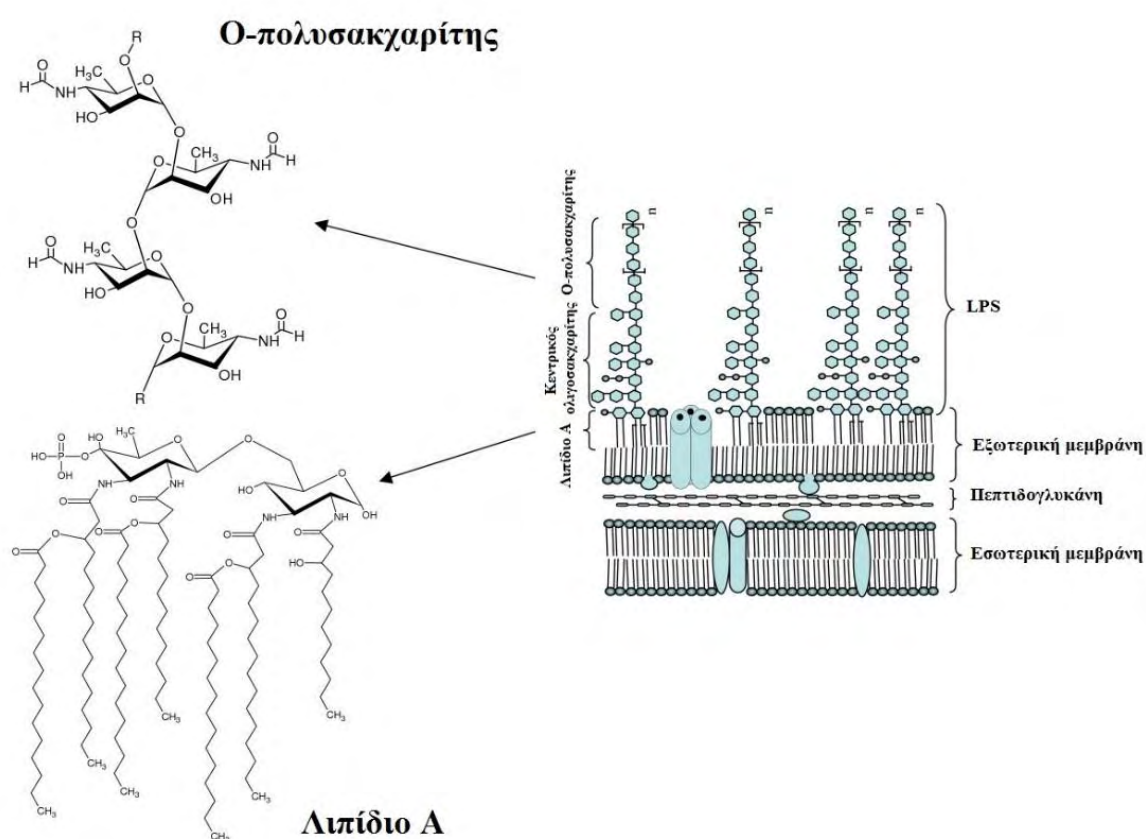
Τα είδη του γένους *Brucella* είναι ενδοκυττάριοι παθογόνοι μικροοργανισμοί, οι οποίοι επιβιώνουν μέσα στα μακροφάγα του ξενιστή μέσω της δημιουργίας μιας μεμβράνης, που αποτρέπει τη λύση από τα λυσοσώματα του ξενιστή και προάγει την ενδοκυτταρική αναπαραγωγή του μικροοργανισμού (Celli & Govel, 2004). Η μοριακή βάση αυτής της ιδιότητας των βρουκελλών παραμένει άγνωστη, ωστόσο μπορεί να συσχετιστεί με τη σύνθεση του κυτταρικού τους τοιχώματος (Moriyón & López-Goñi, 1998).

Το κυτταρικό τοίχωμα των βρουκελλών αποτελείται από την εξωτερική μεμβράνη, το περίπλασμα και την κυτταροπλασματική μεμβράνη (Moriyón & López-Goñi, 1998). Χαρακτηρίζεται από την παρουσία ενός λιποπολυσακχαρίτη, καθώς και πουρινών και πρωτεϊνών της εξωτερικής στιβάδας ενωμένων με το στρώμα των πεπτιδογλυκανών με ομοιοπολικούς δεσμούς (Comerci et al., 2006).

2.2.4.1. Αντιγόνα επιφανείας

Το κύριο αντιγόνο της εξωτερικής στιβάδας του κυτταρικού τοιχώματος των βρουκελλών είναι ο λιποπολυσακχαρίτης (LPS), ο οποίος είναι ζωτικής σημασίας για τη δομική και λειτουργική ακεραιότητα της εξωτερικής μεμβράνης των Gram (-) αρνητικών βακτηρίων, ενώ παράλληλα ευθύνεται για την παθογόνο δράση των βρουκελλών (Laraque et al., 2005).

Ο LPS αποτελείται από τρία βασικά τμήματα: τον Ο-πολυσακχαρίτη, τον κεντρικό ολιγοσακχαρίτη (core oligosaccharide) και το λιπίδιο Α (εικόνα 1).



Εικόνα 1: Σχηματική δομή του λιποπολυσακχαρίτη (LPS) των ειδών του γένους *Brucella* (Cardoso et al., 2006).

Ο Ο-πολυσακχαρίτης των λείων αποικιών των βρουκελλών (Smooth LPS, S-LPS) είναι συνδεδεμένος με τον κεντρικό ολιγοσακχαρίτη, ο οποίος αποτελείται από μανόζη, γλυκόζη, γλυκοζαμίνη, απροσδιόριστα σάκχαρα και 3-deoxy-D-manno-2-octulosonic acid (KDO). Το λιπίδιο Α είναι συνδεδεμένο με τον κεντρικό ολιγοσακχαρίτη και αποτελείται από διαμινογλυκόζη και λιπαρά οξέα (Moreno et al., 1990). Η υδρόφοβη ομάδα του λιπιδίου Α καταλαμβάνει κυρίως την εξωτερική πλευρά της εξωτερικής μεμβράνης του μικροβιακού κυττάρου και θεωρείται υπεύθυνη για τις ιδιότητες των ενδοτοξινών του λιποπολυσακχαρίτη (Cardoso et al., 2006). Ο λιποπολυσακχαρίτης θεωρείται το πιο σημαντικό αντιγόνο του μικροβιακού κυττάρου κατά τη μόλυνση και τον εμβολιασμό, ενώ παράλληλα συμβάλλει ουσιαστικά στη διάγνωση της μόλυνσης από βακτήρια του γένους *Brucella*. Για το λόγο αυτό, οι περισσότερες ορολογικές δοκιμές (RBPT, CFT, i-ELISA) ανιχνεύουν αντισώματα κατά του LPS (Díaz-Aparicio et al., 1993).

Σε όλους τους βιότυπους των λείων-smooth (S) αποικιών των στελεχών του γένους *Brucella* και στην απλή αλυσίδα του Ο-πολυσακχαρίτη υπάρχουν δύο ειδικά αντιγόνα, οι επίτοποι «Α» και «Μ» με τον ένα τύπο κυρίαρχο σε ορισμένους βιότυπους και τον άλλο τύπο κυρίαρχο σε άλλους (Metcalf et al., 1994).

Ο Α επίτοπος βρίσκεται στα κύτταρα των στελεχών της *B. abortus* βιότυπου 1, 2, 3 και 6, της *B. melitensis* βιότυπου 2 και 3, της *B. suis* βιότυπου 1, 2, 3 και 4 και της *B. neotomae* με 1, 2 σύνδεση στην Ο-αλυσίδα. Ο Μ επίτοπος βρίσκεται στα κύτταρα των στελεχών της *B. abortus* βιότυπου 4, 5 και 9, της *B. melitensis* βιότυπου 1 και 3 και της *B. suis* βιότυπου 4 και 5 με 1, 3 σύνδεση στην Ο-αλυσίδα (Perry & Bundle, 1990; Κατσιαούνης, 1996).

Αντιγόνα παρόμοια με τους επίτοπους Α και Μ έχουν βρεθεί και σε άλλα βακτήρια, όπως η *Yersinia enterocolitica* 0:9, η οποία συχνά παρουσιάζει διασταυρούμενες αντιδράσεις με τα είδη του γένους *Brucella* (Metcalf et al., 1994). Άλλοι μικροοργανισμοί που παρουσιάζουν διασταυρούμενες αντιδράσεις με τα είδη του γένους *Brucella* είναι οι *Afipia clevelandensis*, *Francisella tularensis*, *Vibrio cholera*, *Escherichia coli* O:157, *Escherichia hermanni*, *Xanthomonas maltophilia* και *Salmonella urbana* O:30 (Behan & Klein, 1982; Drancourt et al., 1997).

2.2.4.2. Πρωτεΐνες εξωτερικής μεμβράνης

Οι κύριες πρωτεΐνες της εξωτερικής μεμβράνης (omps-outer membrane proteins) του γένους *Brucella* ταυτοποιήθηκαν για πρώτη φορά στις αρχές της δεκαετίας του 1980 (Moriyón & López-Goñi, 1998). Παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον, διότι σχετίζονται με την αντιβιοαντοχή, τη λοιμογόνο δύναμη του μικροοργανισμού καθώς και με τη διεισδυτικότητα του στα κύτταρα του ξενιστή (Connolly et al., 2006). Οι *omp* πρωτεΐνες κωδικοποιούνται από γονίδια, η μεγάλη ποικιλομορφία των οποίων συνέβαλε στη δημιουργία ειδικών δεικτών για την ταυτοποίηση των βρουκελλών σε επίπεδο είδους και βιότυπου (Cloeckert et al., 2002).

Οι πρωτεΐνες *omp* βάσει του μοριακού τους βάρους (MB) στην SDS-PAGE ταξινομούνται σε τρεις κατηγορίες. Στην πρώτη κατηγορία περιλαμβάνονται οι πρωτεΐνες με MB 88-94 kDa, στη δεύτερη κατηγορία οι πρωτεΐνες με MB 43 kDa και 36-38 kDa, ενώ στην τρίτη κατηγορία κατατάσσονται οι πρωτεΐνες με MB 25-27 kDa και 15-31 kDa. Οι πρωτεΐνες αυτές υπάρχουν σε όλα τα είδη με ποσοτικές διαφορές. Επιπλέον, η *B. melitensis* περιέχει δύο άλλες πρωτεΐνες με MB 31 kDa και 39-40 kDa αντίστοιχα (Clockaert et al., 1996).

Στη δεύτερη κατηγορία ανήκουν πρωτεΐνες της ομάδας των πουρινών και μία λιποπρωτεΐνη παρόμοια με την λιποπρωτεΐνη Braun της *E.coli*. Οι πρωτεΐνες της ομάδας των πουρινών κωδικοποιούνται από δύο γονίδια, το *omp2a* και το *omp2b*, τα οποία συνδέονται στενά με το γονιδίωμα της *Brucella* και παρουσιάζουν ομοιογένεια σε ποσοστά μεγαλύτερα από 85% (Moriyón & López-Goñi, 1998).

Στις αρχές της δεκαετίας του 1990, ταυτοποιήθηκαν δύο άλλα γονίδια που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες της τρίτης κατηγορίας, το *omp25* και το *omp31*, τα οποία παρουσιάζουν ομοιογένεια που ανέρχεται σε ποσοστό 34%. Σε σύγκριση με τις πουρίνες, οι πρωτεΐνες *omp25* και *omp31* φέρουν περισσότερους επιτόπους στο τμήμα που καλύπτεται από την εξωτερική στιβάδα του κυτταρικού τοιχώματος (Moriyón & López-Goñi, 1998).

Οι πρωτεΐνες της τρίτης κατηγορίας και πιο συγκεκριμένα η *omp31* εμφανίζονται ως ανοσοκυρίαρχα αντιγόνα στις μολύνσεις κριαριών με τραχείς-rough (R) αποικίες των στελεχών της *B. onis*. Η πρωτεΐνη αυτή, ενώ απουσιάζει από το κυτταρικό τοίχωμα

της *B. abortus*, υπάρχει στα υπόλοιπα είδη του γένους *Brucella* (Cloeckaert et al., 2002). Από την άλλη, η πρωτεΐνη *omp25* εντοπίζεται στην εξωτερική μεμβράνη των βρουκελλών συνδεδεμένη ομοιοπολικά με το υποκείμενο στρώμα των πεπτιδογλυκανών. Η πρωτεΐνη αυτή παίζει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της σταθερότητας της εξωτερικής μεμβράνης, ενώ παράλληλα εμπλέκεται ενεργά στην παθογόνο δράση των *B. melitensis*, *B. abortus* και *B. ovis*, καθώς συμβάλλει στη διείσδυση του μικροοργανισμού στα κύτταρα του ξενιστή (Edmonds et al., 2002). Οι ιδιότητες αυτές οδήγησαν πολλούς ερευνητές στην παρασκευή στελεχών, από τα οποία απουσιάζει η εν λόγω πρωτεΐνη, ώστε να παραχθούν στο μέλλον εμβόλια, τα οποία ενώ εμφανίζουν εξασθενημένη δράση, προσφέρουν στον οργανισμό καλύτερο επίπεδο ανοσίας σε σχέση με το ελαττωμένης λοιμογόνου δύναμης εμβολιακό στέλεχος Rev-1 (Cloeckaert et al., 2002).

2.3. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ

Η βρουκέλλωση, γνωστή και ως «κυματοειδής πυρετός», «μεσογειακός πυρετός» ή «πυρετός της Μάλτας», είναι μία βακτηριακή ζωνόσος με τη μεγαλύτερη εξάπλωση παγκοσμίως. Η νόσος ενδημεί στις αναπτυσσόμενες χώρες με συχνότητα που εξαρτάται από τον επιπολασμό της στα ζώα. Κάθε χρόνο καταγράφονται 500.000 νέα περιστατικά και η επίπτωση της νόσου κυμαίνεται από <0,01-200 περιστατικά/100.000 άτομα (Cutler et al., 2005). Στον Πίνακα 3 που ακολουθεί, παρουσιάζονται τα επιδημιολογικά δεδομένα σχετικά με την ενδημικότητα της νόσου, όπως αυτά αναφέρονται από τα εκάστοτε κράτη (Pappas et al., 2006).

Ωστόσο, ο πραγματικός επιπολασμός της βρουκέλλωσης παραμένει άγνωστος εξαιτίας των μη αποτελεσματικών συστημάτων αναφοράς και επιτήρησης της νόσου σε πολλές χώρες (Dean et al., 2012a). Στην Ελλάδα, και συγκεκριμένα στην Περιφέρεια Ηπείρου, μόνο για το χρονικό διάστημα Απρίλιος 2002-Μάρτιος 2004 έχουν επίσημα καταγραφεί 21 περιστατικά της νόσου στο Υπουργείο Υγείας, ενώ αντίστοιχη μελέτη που διεξήχθη κατά το ίδιο χρονικό διάστημα στην περιοχή από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου των Ιωαννίνων έδειξε ότι καταμετρήθηκαν τουλάχιστον 152 κρούσματα (Avdikou et al., 2005). Γι' αυτόν το λόγο, ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας εκτιμά ότι η πραγματική επίπτωση της νόσου είναι 10-25 φορές μεγαλύτερη από την επίσημα καταγεγραμμένη (WHO, 2006).

Πίνακας 3: Επιδημιολογικά δεδομένα σχετικά με την παγκόσμια ενδημικότητα της βρουκέλλωσης (Pappas et al., 2006).

Επίπτωση βρουκέλλωσης				
>100/10 ⁵ κάτοικων	50-100/10 ⁵ κάτοικων	8-50/10 ⁵ κάτοικων	2-8/10 ⁵ κάτοικων	Άγνωστη (>2/10 ⁵ κάτοικων)
Συρία	Αλβανία	Αλγερία	Αζερμπαϊτζάν	Αίγυπτος
	Αφγανιστάν	Βόρεια Μακεδονία	Αρμενία	Ινδία
	Βοσνία-Ερζεγοβίνη	Ιράκ	Ηνωμένα Αραβικά Εμιράτα	Κίνα
	Κιργιζιστάν	Ιράν	Ιορδανία	Πακιστάν
	Μογγολία	Καζακιστάν	Κουβέιτ	
		Σαουδική Αραβία	Λίβανος	
		Τατζικιστάν	Μεξικό	
		Τουρκία	Ομάν	
			Περού	
			Τουρκμενιστάν	
			Τυνησία	

Η νόσος, παρά την ευρεία εφαρμογή μέτρων για τον έλεγχο της, ενδημεί και αποτελεί πρόβλημα για τη Δημόσια Υγεία σε πολλές χώρες της Μεσογείου, της Βόρειας και Ανατολικής Αφρικής, της Μέσης Ανατολής, της Νότιας και Κεντρικής Ασίας και της Βόρειας και Κεντρικής Αμερικής (Nicoletti, 2010).

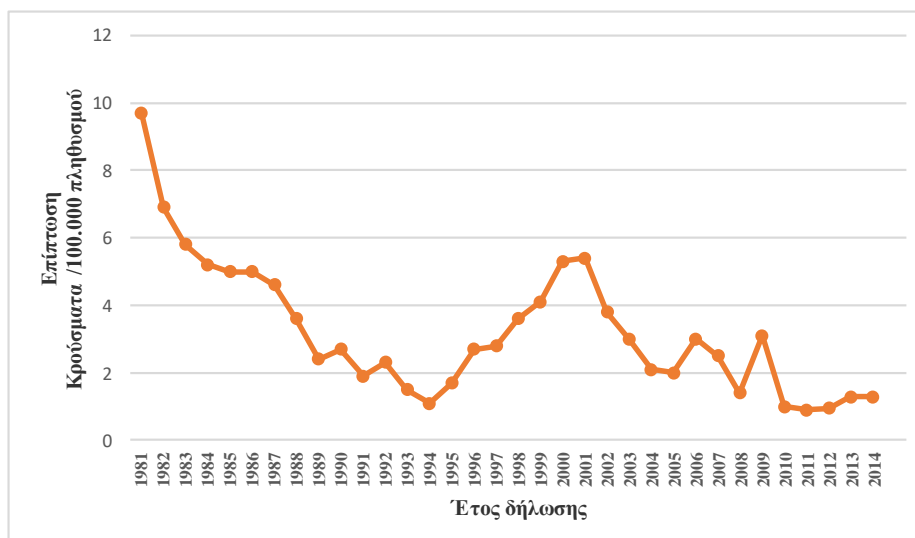
Στην Εγγύς και Μέση Ανατολή η νόσος αποτελεί μείζον πρόβλημα, με τη Συρία να κατέχει την πρώτη θέση ενδημικότητας παγκοσμίως και την Τουρκία να αναφέρει πάνω από 15.000 κρούσματα κάθε χρόνο. Στη Λατινική Αμερική η βρουκέλλωση παρουσιάζει υψηλή ενδημικότητα στο Μεξικό και στο Περού (Pappas, 2010).

Στη ζώνη της Μεσογείου πρόβλημα ενδημικότητας παρατηρείται στις χώρες της Βόρειας Αφρικής, συμπεριλαμβανομένης της Αιγύπτου, ενώ στις Ευρωπαϊκές Μεσογειακές χώρες η ενδημικότητα της νόσου έχει περιορισθεί σημαντικά μέσω της εφαρμογής συστηματικών προγραμμάτων εμβολιασμού στο ζωικό πληθυσμό (Godfroid et al., 2005). Πιο συγκεκριμένα, οι «ελεύθερες βρουκέλλωσης» χώρες της ΕΕ είναι η Σουηδία, η Δανία, η Φινλανδία, η Γερμανία, το Ηνωμένο Βασίλειο (με εξαίρεση τη Βόρεια Ιρλανδία), η Αυστρία, η Ολλανδία, το Βέλγιο, το Λουξεμβούργο,

η Νορβηγία και η Ελβετία (Pappas et al., 2006). Στην Πορτογαλία και την Ισπανία τα ετήσια περιστατικά έχουν μειωθεί σημαντικά σύμφωνα και με τις πλέον πρόσφατες εκθέσεις του ECDC (ECDC, 2010), ενώ στην Ιταλία η νόσος έχει περιορισθεί αποκλειστικά στην Καλαβρία, Καμπανία, Σικελία και Απουλία (Mancini et al., 2014).

Στα Βαλκάνια, η χαλαρότητα των συνοριακών ελέγχων στη διακίνηση των ζώων και των προϊόντων επέτρεψε τη ραγδαία εξάπλωση της νόσου ακόμη και σε περιοχές προγενέστερα ελεύθερες βρουκέλλωσης, όπως η Βουλγαρία, όπου η νόσος εξαπλώθηκε από την Ελλάδα και την Τουρκία με μολυσμένα κοπάδια (Russo et al., 2009). Σήμερα, η κύρια εστία ενδημικότητας των Βαλκανίων παραμένει η Αλβανία, γεγονός που επηρεάζει αρνητικά τις απόπειρες εκρίζωσης της νόσου στις γείτονες χώρες, τη Βόρεια Μακεδονία, το Κοσσυφοπέδιο, τη Βοσνία-Ερζεγοβίνη και την Ελλάδα (Pappas et al., 2006).

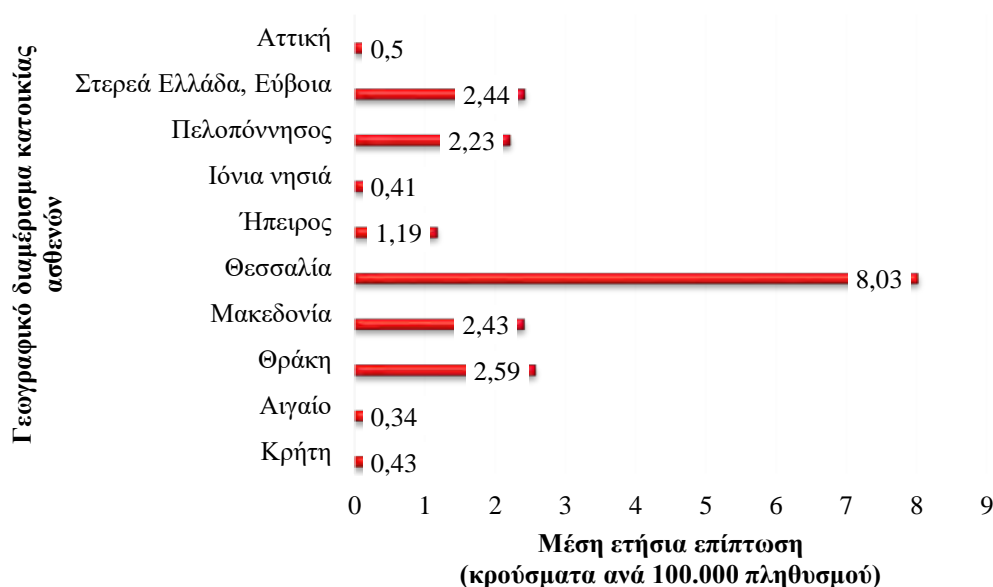
Η Ελλάδα, μία χώρα της ΕΕ με ανεπτυγμένη αιγο-προβατοτροφία, περιλαμβάνεται στη λίστα των 25 χωρών με την υψηλότερη δηλούμενη επίπτωση του νοσήματος παγκοσμίως (20,9 καταγεγραμμένα περιστατικά/1.000.000 πληθυσμού ετησίως) (Pappas et al., 2006). Η διαχρονική επίπτωση της νόσου στην Ελλάδα εμφανίζεται στην Εικόνα 2 (ΚΕΕΛΠΙΝΟ, 2012a). Πιο αναλυτικά, από το 1981 μέχρι το 1993 η επίπτωση της νόσου παρουσίασε σταδιακή μείωση εξαιτίας των μαζικών προγραμμάτων εμβολιασμού σε αμνούς και ερίφια ηλικίας 3-6 μηνών με το ελαττωμένης λοιμογόνου δύναμης εμβόλιο Rev-1 (ΚΕΕΛΠΙΝΟ, 2012b). Το 1993, η παροδική διακοπή των προγραμμάτων εμβολιασμού των μικρών μηρυκαστικών έναντι της βρουκέλλας, αρχικά στις νησιωτικές περιοχές και αργότερα και στην υπόλοιπη Ελλάδα, και η αντικατάστασή τους από το πρόγραμμα ελέγχου και σφαγής, οδήγησε το 1995 στην αύξηση του επιπολασμού στα ζώα (ποσοστό ασθενών ή μολυσμένων ζώων επί του συνολικού πληθυσμού τους) και κατ'επέκταση στην αύξηση των κρουσμάτων βρουκέλλωσης στον άνθρωπο (Godfroid et al., 2005). Η αύξηση του επιπολασμού συνέβαλε το 1998 στην επαναφορά των μαζικών εμβολιασμών στην ηπειρωτική Ελλάδα, την Εύβοια, τη Θάσο, τη Λέσβο και τη Λέρο και τη διατήρηση του προγράμματος της εκρίζωσης στα υπόλοιπα νησιά, όπου ο επιπολασμός της νόσου μεταξύ των ποιμνίων ήταν χαμηλός.



Εικόνα 2: Διαχρονική εξέλιξη της δηλούμενης απόλυτης συχνότητας της βρουκέλλωσης στην Ελλάδα για το χρονικό διάστημα 1981-2014 (ΚΕΕΛΠΝΟ, 2012α; Ερμείδης & συν., 2016).

Για το χρονικό διάστημα 2000-2004, η μέση ετήσια δηλούμενη επίπτωση παρουσίασε μείωση, ενώ από το 2005, που άλλαξε το σύστημα καταγραφής των κρουσμάτων, έως το έτος 2011, η μέση ετήσια δηλούμενη επίπτωση ήταν υψηλότερη από την αντίστοιχη των χωρών της Ευρωπαϊκής Ένωσης και των χωρών της ΕΕΑ/ΕΦΤΑ (2,2/100.000 πληθυσμού) με την υψηλότερη τιμή να καταγράφεται στη Θεσσαλία (8,03/100.000 πληθυσμού) και τη χαμηλότερη στο Νότιο Αιγαίο, την Κρήτη, τα νησιά του Ιονίου και την Αττική (0,34/100.000, 0,43/100.000, 0,41/100.000 και 0,50/100.000 πληθυσμού αντίστοιχα) (Pappas et al., 2006). Από το έτος 2005 έως το έτος 2011, η μόνη αύξηση της επίπτωσης (3,1/100.000 πληθυσμού) καταγράφηκε το έτος 2008 εξαιτίας της επιδημίας της Θάσου με τα 104 κρούσματα λόγω της κατανάλωσης μη παστεριωμένων γαλακτοκομικών προϊόντων στο νησί κατά την περίοδο του Πάσχα (Karagiannis et al., 2012). Αντιθέτως, το χρονικό διάστημα 2009-2011, η μέση δηλούμενη επίπτωση της νόσου παρουσίασε μείωση (0,94-1/100.000) σε σχέση με τα προηγούμενα έτη. Για τα έτη 2012-2014 η μέση ετήσια επίπτωση ήταν 1,28/100.000, ενώ για το 2015 καταγράφηκαν 96 περιστατικά βρουκέλλωσης από τα οποία 26 εντοπίστηκαν στη Δυτική Ελλάδα, 20 στη Θεσσαλία, 12 στο Νομό Αχαΐας, 10 στο Νομό Αιτωλοακαρνανίας και 13 στην στερεά Ελλάδα και την Εύβοια (Ερμείδης & συν., 2016).

Στην Εικόνα 3 παρουσιάζονται αναλυτικά τα κρούσματα ανά 100.000 πληθυσμού στα διάφορα γεωγραφικά διαμερίσματα της Ελλάδας κατά τα έτη 2005-2011 (ΚΕΕΛΠΝΟ, 2012a).



Εικόνα 3: Μέση ετήσια επίπτωση (κρούσματα ανά 100.000 πληθυσμού) της βρουκέλλωσης ανά γεωγραφικό διαμέρισμα κατοικίας ασθενούς, Ελλάδα, 2005-2011. Τα δεδομένα για το χρονικό διάστημα 1981-1997 προέρχονται από συγκεντρωτικά στοιχεία των Διευθύνσεων Υγείας, ενώ για το διάστημα 1998-2011 από το σύστημα υποχρεωτικής δήλωσης νοσημάτων του ΚΕΕΛΠΝΟ (ΚΕΕΛΠΝΟ, 2012a).

Οι παράγοντες κινδύνου που σχετίζονται με τη νόσο κατά το χρονικό διάστημα 2005-2011 είναι:

- **η ηλικία.** Η νόσος παρουσιάζει μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης στην ηλικιακή ομάδα των 55-64 ετών με μέση δηλούμενη ετήσια επίπτωση 2,22/100.000 πληθυσμό, ενώ μικρότερη συχνότητα εμφάνισης στην ηλικιακή ομάδα των 0-4 ετών με μέση δηλούμενη ετήσια επίπτωση 0,53/100.000 πληθυσμό (ΚΕΕΛΠΝΟ, 2012a).
- **το φύλο.** Τα κρούσματα που καταγράφηκαν ήταν σχεδόν διπλάσια στους άντρες από αυτά στις γυναίκες (Apostolou et al., 2010; ΚΕΕΛΠΝΟ, 2012a).
- **η εποχικότητα της νόσου.** Κορύφωση της επίπτωσης παρατηρείται τους μήνες Απρίλιο, Μάιο και Ιούνιο, γεγονός που πιθανώς να οφείλεται στην

έκθεση των κτηνοτρόφων στον παθογόνο παράγοντα κατά τη διάρκεια των τοκετών των μικρών μηρυκαστικών και στην ευκολότερη μετάδοση του μικροοργανισμού κατά την έξοδο των ποιμνίων σε κοινούς βοσκότοπους (Apostolou et al., 2010; ΚΕΕΛΠΝΟ, 2012a). Η αναλογία μεταξύ αρρένων και θηλέων, η ηλικιακή κατανομή και η εποχικότητα των κρουσμάτων στη χώρα μας συμβαδίζει με τα αντίστοιχα δεδομένα των χωρών της ΕΕ (ECDC, 2011).

- **το επάγγελμα.** Στην Ελλάδα, η βρουκέλλωση είναι κατά βάση επαγγελματικό νόσημα, καθώς το 90% των αναφερόμενων κλινικών περιπτώσεων αφορά επαγγελματικές ομάδες, οι οποίες μολύνονται λόγω της άμεσης επαφής τους με το ζωικό κεφάλαιο (κτηνοτρόφοι, κτηνίατροι, εκδοροσφαγείς, προσωπικό εργαστηρίων) (ΚΕΕΛΠΝΟ, 2012c).
- **η κατανάλωση μη παστεριωμένου γάλακτος και προϊόντων αυτού.** Το 10% των καταγεγραμμένων κρουσμάτων αφορά στην κατανάλωση μη παστεριωμένου γάλακτος ή/και γαλακτοκομικών προϊόντων, όπως τυρί που δεν έχει υποστεί ωρίμανση, κρέμα, παγωτό και βούτυρο. Στα σκληρά τυριά (κασέρι, κεφαλοτύρι, γραβιέρα), το μανούρι, τη μηζύθρα, τον ανθότυρο, τη γιαούρτη και το ξινόγαλα η μετάδοση της βρουκέλλωσης πραγματοποιείται δυσκολότερα εξαιτίας του τρόπου παρασκευής τους (ΚΕΕΛΠΝΟ, 2012c; Al Shaalan et al., 2014). Στον Πίνακα 4 που ακολουθεί παρατίθενται στοιχεία σχετικά με το χρόνο επιβίωσης της *B. melitensis* στους 4°C σε διάφορα είδη τροφίμων (ΚΕΕΛΠΝΟ, 2012d).

Πίνακας 4: Χρόνος επιβίωσης της *B. melitensis* σε συνθήκες ψύξης (4°C) σε διάφορα γαλακτοκομικά προϊόντα (ΚΕΕΛΠΝΟ, 2012d).

Είδος γαλακτοκομικού προϊόντος	Χρόνος επιβίωσης σε θερμοκρασία 4°C
Φυσικά μολυσμένο γάλα	48 ημέρες
Κρέμα γάλακτος	140 ημέρες
Βούτυρο αλατισμένο & ανάλατο	6-13 μήνες
Τυρί τύπου Pecorino (τεχνητά επιμολυσμένο)	6 ημέρες
Τυρί τύπου Roquefort (τεχνητά επιμολυσμένο)	60 ημέρες

Η λοίμωξη στον άνθρωπο προκαλείται κυρίως από τα είδη *B. melitensis*, *B. abortus* και *B. suis*. Ωστόσο, η *B. melitensis* θεωρείται το συχνότερο αίτιο βρουκέλλωσης και ενοχοποιείται για την πρόκληση της σοβαρότερης λοίμωξης στον άνθρωπο, καθώς το 90% των δηλωθέντων κρουσμάτων οφείλονται σε αυτήν. Η λοίμωξη από *B. abortus* συνήθως είναι υποκλινική, ενώ η λοίμωξη από *B. suis* εμφανίζει χαμηλό επιπολασμό. Σπανιότερα λοίμωξη προκαλούν η *B. canis* και τα είδη που προσβάλλουν τα θαλάσσια θηλαστικά (Nicoletti, 2010).

Αναφορικά με τους βιότυπους της *B. melitensis*, όλοι οι βιότυποι μπορούν να προκαλέσουν λοίμωξη στα μικρά μηρυκαστικά και τον άνθρωπο. Ωστόσο η γεωγραφική τους κατανομή ποικίλλει. Σύμφωνα με μελέτες που έχουν διενεργηθεί, ο βιότυπος 3 κυριαρχεί σχεδόν αποκλειστικά στις χώρες της Μεσογείου και τη Μέση Ανατολή (Αίγυπτος, Τυνησία, Ιορδανία, Ισραήλ και Τουρκία) (Samadi et al., 2010b), ενώ ο βιότυπος 1 κυριαρχεί στην Κεντρική και Νότια Αμερική (Gaido et al., 2011), με αναφορές παράλληλα και σε ορισμένες χώρες της Μεσογείου, όπως την Τουρκία (Erdenlig, 2011), την Ισπανία (Díaz-Aparicio et al., 1993), τη Λιβύη, το Ομάν και το Ισραήλ (Samadi et al., 2010b).

Στην Ελλάδα, από τις ταυτοποιήσεις στελεχών που έγιναν από το 1970 έως σήμερα, συμπεραίνεται ότι το κύριο αίτιο προσβολής του ανθρώπου είναι η *Brucella melitensis* (Αρσένη & Χατζηβασιλείου, 1971; Παπαπαναγιώτου & συν., 1971; Παναγιωτόπουλος & συν., 1974; Σφηκάκης & συν., 1977; Φούτζηλας & συν., 1978; Τσάγκλας, 1993; Fouskis et al., 2018; Papaparaskevas et al., 2018). Σε ό,τι αφορά τους βιότυπους της *B. melitensis* στον άνθρωπο, μέχρι το 2000 φαίνεται ότι επικρατέστερος ήταν ο βιότυπος 2 (Τζαμουράνης, 1970; Κανσουζίδου-Κανακούδη & συν., 1986; Κανσουζίδου-Κανακούδη & συν., 1996), ενώ σε μεταγενέστερη μελέτη που δημοσιεύτηκε το 2002 παρατηρείται μία μεταβολή και ο βιότυπος 3 είναι εκείνος που κατά κύριο λόγο προκαλεί τη νόσο (Κανσουζίδου-Κανακούδη & συν., 2002). Από το 2002 έως σήμερα, με εξαίρεση τη διερεύνηση μιας επιδημιολογικής έξαρσης που σημειώθηκε στη Θάσο το 2008 (Karagiannis et al., 2012) από κατανάλωση μη παστεριωμένων προϊόντων γάλακτος και κατά την οποία απομονώθηκε ως αίτιο η *B. melitensis* βιότυπος 3, υπάρχει ένα επιδημιολογικό κενό στην επιτήρηση και καταγραφή των βιότυπων που προκαλούν τη νόσο στην Ελλάδα.

Σχετικά με την καταγραφή της βρουκέλλωσης στα μικρά μηρυκαστικά, από τα στοιχεία που έχουμε στη διάθεσή μας, η πρώτη απομόνωση *B. melitensis* αναφέρεται το 1931 (Ananiades & Miaoulis, 1931). Ωστόσο, σήμερα η βρουκέλλωση των αιγών και των προβάτων ενδημεί στη χώρα μας με μεγάλη συχνότητα σε ορισμένες περιοχές όπως η Θεσσαλία (Αλμυρός Βόλου, Τρίκαλα, Ελασσόνα), η κεντρική Πελοπόννησος, η Αιτωλοακαρνανία, η Θεσπρωτία, η Καβάλα, η Ξάνθη, η Ροδόπη και η Φλώρινα (Fouskis et al., 2018). Σε ό,τι αφορά τους βιότυπους των βρουκελλών που προσβάλλουν τα μικρά μηρυκαστικά στη χώρα μας, σε ορισμένες περιοχές της Μακεδονίας – Θράκης, κατά τη διάρκεια των ετών 1977-1985, βρέθηκε ότι ο επικρατέστερος βιότυπος τόσο στα πρόβατα όσο και στις αίγες ήταν η *B. melitensis* βιότυπος 3 σε ποσοστά που κυμαίνονταν μεταξύ 80 – 90%, ενώ ο δεύτερος επικρατέστερος βιότυπος ήταν η *B. melitensis* βιότυπος 1 (Γιαντζής & Καστανίδου, 1984; Yantzis, 1985; Γιαντζής & συν., 1988). Ωστόσο, το 1996 το σύνολο των στελεχών που απομονώθηκαν σε αίγες και πρόβατα ταυτοποιήθηκε ως *B. melitensis* βιότυπος 3 (Κατσιαούνης, 1996). Από το 1996 έως σήμερα δεν υπάρχουν διαθέσιμα δεδομένα σχετικά με τους βιότυπους της *B. melitensis* που απομονώνονται στα μικρά μηρυκαστικά.

2.4. ΜΕΤΑΔΟΣΗ-ΟΔΟΙ ΜΟΛΥΝΣΗΣ

Στα ζώα, η *B. melitensis* συνήθως μεταδίδεται μέσω της επαφής με τον πλακούντα, το αποβληθέν έμβρυο και τα εμβρυϊκά και κοιλικά εκκρίματα των μολυσμένων ζώων μετά από αποβολή. Άλλες πιθανές οδοί μόλυνσης είναι μέσω του πεπτικού σωλήνα, του ανώτερου αναπνευστικού συστήματος, του οφθαλμού και σπανιότερα μέσω των λύσεων της συνεχείας του δέρματος. Ένας αριθμός ζώων μπορεί επιπλέον να μολυνθεί *in utero*, αλλά είναι ακόμα άγνωστο αν στα νεογνά η μόλυνση διατηρείται για μικρό ή μεγάλο χρονικό διάστημα. Επίσης, η μόλυνση του μαστού είναι πολύ συχνή ενώ σε ζώα που εκτρέφονται κάτω από φυσικές συνθήκες, η φυσική οχεία ελάχιστα συμβάλλει στη διάδοση της νόσου (Κατσιαούνης, 1996; CFSPH, 2009).

Στον άνθρωπο, η νόσος μεταδίδεται συνήθως από την κατανάλωση μη παστεριωμένου γάλακτος ή προϊόντων αυτού, με αυτεμβολιασμό (προσωπικό εργαστηρίου) και μέσω λύσεων της συνεχείας του δέρματος με μολυσμένους ιστούς (προϊόντα αποβολών ή τοκετού) ή μολυσμένες επιφάνειες (δάπεδο, στρωμνή)

(CFSPH, 2009). Επίσης, μόλυνση μπορεί να παρατηρηθεί σε κτηνοτρόφους, εκδοροσφαγείς και κτηνιάτρους μέσω της εισπνοής μολυσμένων αερολυμάτων σε εκτροφές, σφαγεία ή εργαστήρια αντίστοιχα (επαγγελματική νόσος) (Mantur, 2006).

2.5. ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ

Η κύρια πύλη εισόδου του παθογόνου στα κύτταρα του ξενιστή πραγματοποιείται πιθανότατα μέσω των Μ κυττάρων που βρίσκονται στην επιφάνεια των επιθηλιακών κυττάρων (Martin Roop II et al., 2009). Μετά την είσοδό τους στον οργανισμό, οι βρουκέλλες προσλαμβάνονται από τα μακροφάγα, τα οποία προσελκύνονται στο σημείο εισόδου με χημειοταξία, μέσα στα οποία επιβιώνουν και πολλαπλασιάζονται. Στη συνέχεια, μέσω των λεμφαγγείων φθάνουν στους επιχώριους λεμφαδένες όπου περνούν στην κυκλοφορία του αίματος (βακτηραιμία) και διασπείρονται σε διάφορους ιστούς του δικτυοενδοθηλιακού συστήματος (ήπαρ, σπλήνα και μυελό των οστών) όπου πολλαπλασιάζονται ενδοκυτταρικά προκαλώντας τον σχηματισμό κοκκιωμάτων (Memish et al., 2000). Σε αυτούς τους ιστούς, οι βρουκέλλες προκαλούν λύση των φαγοκυττάρων και μέσω της περιοδικής απελευθέρωσής τους στην κυκλοφορία του αίματος καταλήγουν σε άλλα όργανα και ιστούς με συνέπεια τις ποικίλλες κλινικές εκδηλώσεις της νόσου (Corbel, 1998).

Η παραμονή και η επιβίωση των βρουκελλών μέσα στα κύτταρα του ξενιστή εξηγεί τη δυσκολία στην ίαση καθώς και τις συχνές υποτροπές της νόσου (Corbel, 1997; Sauret & Vilissova, 2002). Πρωτεύοντα ρόλο στην ενδοκυττάρια επιβίωση των βρουκελλών φαίνεται ότι διαδραματίζει ο λιποπολυσακχαρίτης των βρουκελλών της smooth φάσης (S-LPS), καθώς χαρακτηρίζεται από χαμηλή τοξικότητα, ενώ παράλληλα προκαλεί μικρή έκκριση των ιντερφερονών, του παράγοντα TNFα (Tumor Necrosis Factor) και της ιντερλευκίνης 1. Αντίθετα, προκαλεί υπερέκκριση της ιντερλευκίνης 12 (Caron et al., 1994; Zhan & Cheers, 1995). Επιπλέον, η επιβίωση του βακτηρίου εντός των μακροφάγων συσχετίζεται και με τη σύνθεση των πρωτεϊνών MB 17, 24, 28, 60 και 62 kDa (Lin & Ficht, 1995).

Η εξέλιξη της μόλυνσης επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες όπως την ανοσολογική κατάσταση του ξενιστή, τη λοιμογόνο δύναμη των βακτηρίων και το μικροβιακό φορτίο (10-100 μικρόβια αρκούν για να προκαλέσουν νόσο). Επιπλέον, στα ζώα σημαντικό ρόλο παίζουν η φυλή και το στάδιο της εγκυμοσύνης (European

Union Committee, 2001). Συγκεκριμένα, στα ζώα που κυοφορούν, η *B. melitensis* παρουσιάζει τροπισμό στη μήτρα, τους εμβρυϊκούς υμένες και τον πλακούντα λόγω της παρουσίας ενός αυξητικού παράγοντα, της ερυθριτόλης, η οποία ουσιαστικά υποβοηθά στην ανάπτυξη των λοιμογόνων στελεχών των βρουκελλών. Αντίθετα στη γυναίκα η περιεκτικότητα του πλακούντα σε ερυθριτόλη είναι πολύ χαμηλή γεγονός που εξηγεί το χαμηλό ποσοστό αποβολών στον άνθρωπο (Παπαδόπουλος, 2003).

Μετά τον τοκετό ή την αποβολή, οι μικροοργανισμοί εντοπίζονται κυρίως στο μαστό και τα οπισθομαστικά λεμφογάγγλια, όπου και παραμένουν έως την επόμενη εγκυμοσύνη, χωρίς να αποκλείεται η σταθερή ή περιοδική απέκκρισή τους στο γάλα ή τις γεννητικές εκκρίσεις (Παπαδόπουλος, 2003; Στουρνάρα-Τσελεπίδου, 2008).

Μετά την απέκκριση, τα είδη του γένους *Brucella* μπορούν να επιβιώσουν στο περιβάλλον και τις ζωικές απεκκρίσεις για πολλούς μήνες όταν οι συνθήκες που επικρατούν είναι ευνοϊκές (υψηλή υγρασία, χαμηλή θερμοκρασία και απουσία ηλιακής ακτινοβολίας). Ο χρόνος επιβίωσης αυξάνει σημαντικά όταν η θερμοκρασία του περιβάλλοντος πλησιάζει τους 0°C και σε παρουσία οργανικής ύλης (CFSPH, 2009).

2.6. ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΟΛΟΓΙΑ

2.6.1. Συμπτωματολογία στα ζώα (μικρά μηρυκαστικά)

Στα μικρά μηρυκαστικά η μόλυνση από *B. melitensis* συνήθως προκαλεί αποβολή γύρω στον 4^ο μήνα της εγκυμοσύνης με κατακράτηση του πλακούντα και των εμβρυϊκών υμένων ή οδηγεί στη γέννηση θνησιγενών αμνών και εριφίων. Ο πλακούντας εμφανίζεται οίδηματικός με γκριζωπές νεκρωτικές κοτυληδόνες (Aldomy et al., 1992). Το ποσοστό των αποβολών είναι υψηλότερο την πρώτη χρονιά της μόλυνσης (80%) ενώ από την επόμενη χρονιά τα κρούσματα είναι εμφανώς λιγότερα. Σε γενικές γραμμές, η αίγα παρουσιάζει χαμηλότερα ποσοστά αποβολών από το πρόβατο (καλύτερη προσαρμογή) και επιπλέον διατηρεί τη λοίμωξη για μεγάλο διάστημα σε αντίθεση με το πρόβατο που παρουσιάζει τάση αυτοϊάσης και αυτοαποστειρώσης, δηλαδή μετά από ορισμένο χρονικό διάστημα παύει να είναι φορέας (Παπαδόπουλος, 2003). Στις αίγες, η απέκκριση του μικροοργανισμού στα κολπικά υγρά διαρκεί τουλάχιστον 2-3 μήνες, ενώ στα πρόβατα μόλις 3 εβδομάδες (Alton, 1990). Άλλα συμπτώματα που παρατηρούνται είναι η μείωση της

γαλακτοπαραγωγής και η αρθρίτιδα (WHO, 2006). Η μείωση της γαλακτοπαραγωγής ανέρχεται στο 1/2 ή και στο 1/3 της ημερήσιας παραγωγής και συνοδεύεται από τη διαλείπουσα απέκκριση των βακτηριδίων στο γάλα που αποτελεί κίνδυνο για τη Δημόσια Υγεία. Σε βαριές περιπτώσεις, όπως αποδείχθηκε σε πειραματική μόλυνση, το γάλα μπορεί να έχει την όψη διαυγούς υγρού, μέσα στο οποίο αιωρούνται πήγματα (Madad, 1979).

Τα αποβληθέντα έμβρυα ενδέχεται να βρίσκονται σε διαφορετικά στάδια ανάπτυξης και συνήθως εμφανίζουν βρογχοπνευμονία, συλλογή αιμορραγικού υγρού στη θωρακική κοιλότητα και διογκωμένα λεμφογάγγλια, συκώτι και σπλήνα (Alton, 1990).

Στους κριούς και τράγους, στην οξεία μορφή της νόσου παρατηρείται ορχίτιδα και επιδιδυμίτιδα, ενώ στη χρόνια μορφή μείωση της γονιμότητας και κακή ποιότητα παραγόμενου σπέρματος (Enright, 1990; Leon, 1994).

2.6.2. Συμπτωματολογία στον άνθρωπο

Τα είδη του γένους *Brucella* που φαίνεται να προκαλούν νόσο στον άνθρωπο είναι οι *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. canis* και τα είδη που έχουν απομονωθεί από τα θαλάσσια θηλαστικά. Τα περισσότερα κρούσματα παγκοσμίως οφείλονται στην μόλυνση από *Brucella melitensis*, η οποία προκαλεί οξεία νόσο (<2 μήνες), ενώ η μόλυνση από άλλα είδη του γένους *Brucella* συνήθως προκαλεί την υποξεία (2-12 μήνες) ή τη χρόνια μορφή της νόσου (>1 έτος). Στον άνθρωπο, η βρουκέλλωση εκδηλώνεται με διαλείποντα πυρετό και συχνά συνοδεύεται από κατάπτωση, ανορεξία, αδιαθεσία, σπληνομεγαλία, ηπατομεγαλία και λεμφαδενοπάθεια. Ο χρόνος επώασης μπορεί να διαρκέσει από 1-3 εβδομάδες έως και μερικούς μήνες (Megid et al., 2010). Σε ατελή λήψη ειδικής αγωγής η νόσος μπορεί να διαρκέσει για εβδομάδες ή ακόμη και μήνες με την οξεία φάση συχνά να εξελίσσεται σε χρόνια, υποτροπιάζουσα ή εντοπισμένη λοίμωξη (WHO, 2006). Η υποτροπή είναι συχνότερη στους άνδρες, όταν η διάρκεια των συμπτωμάτων πριν από την έναρξη της θεραπείας είναι >10 ημέρες και όταν υπάρχει θρομβοπενία ή βακτηριαιμία (Ariza et al., 1995). Στα παιδιά η νόσος έχει συνήθως ήπια εξέλιξη και ανταποκρίνεται ικανοποιητικά στη θεραπεία (Shalan et al., 2002). Ωστόσο, συχνά αναφέρονται περιστατικά παιδιών, τα οποία εξαιτίας της ήπιας συμπτωματολογίας της νόσου (μικρότερο ποσοστό

εμφάνισης εφίδρωσης, ρίγους, πονοκεφάλου και εύκολης κόπωσης), διαφεύγουν της διάγνωσης (Dean et al., 2012b).

Πιο αναλυτικά, τα συστήματα που προσβάλλονται συνηθέστερα είναι:

- Ερειστικό σύστημα (>40-66% των ασθενών) (περιφερική αρθρίτιδα, σπονδυλίτιδα, θυλακίτιδα, οστεομυελίτιδα οσφυϊκών και κατώτερων θωρακικών σπονδύλων, τενοντίτιδα) (Colmenero et al., 1996; Dean et al., 2012b)
- Γαστρεντερικό σύστημα [ναυτία, έμετο, κοιλιακό άλγος, ανορεξία, κολίτιδα, περιτονίτιδα, ηπατομεγαλία με ήπια τρανσαμινασαιμία (25% ασθενών), σπληνομεγαλία (25% ασθενών), λεμφαδενοπάθεια (10-20% ασθενών), οξεία παγκρεατίτιδα, αποστήματα στο ήπαρ και πανκυτταροπενία] (WHO, 2006; Megid et al., 2010)
- Αναπνευστικό σύστημα (5% των ασθενών) (πυλαία ή παραπυλαία λεμφαδενοπάθεια, διάμεση πνευμονία, βρογχοπνευμονία, εμπύημα, οξίδια στον πνεύμονα και θωρακικό υγρό) (Gür et al., 2003; Apostolou et al., 2010)
- Ουρογεννητικό σύστημα (8% των ασθενών) (ορχίτιδα και επιδιδυμίτιδα στους άνδρες, πυελικά αποστήματα, αποβολές και σαλπινγίτιδα στις γυναίκες, υδροκήλη, πυελονεφρίτιδα) (Gür et al., 2003; Apostolou et al., 2010)
- Καρδιαγγειακό σύστημα (<2% των ασθενών) (ενδοκαρδίτιδα με συχνή μόλυνση της αορτικής και λιγότερο συχνά της μιτροειδούς βαλβίδας της καρδιάς) (Reguera et al., 2003; Berberon et al., 1992; Aguado et al., 1987)
- Νευρολογικό σύστημα (5-7% των ασθενών) (μηνιγγίτιδα, εγκεφαλίτιδα, μηνιγγοεγκεφαλίτιδα, σύνδρομο Guillain-Barré, αγγειίτιδα, εγκεφαλικά ανευρύσματα και έμφρακτα, εγκεφαλικές αιμορραγίες, παρεγκεφαλιδική αταξία, πολυριζίτιδα/πολυνευροπάθεια) (Al Shaalan et al., 2014; Godfroid et al., 2005)
- Δέρμα (17% των ασθενών) (αποστήματα, οζώδες ερύθημα, κηλιδοβλατιδώδες εξάνθημα, πετέχειες, φουσαλίδες) (Gür et al., 2003; WHO, 2006)
- Οπτικό σύστημα (ραγοειδίτιδα, χρόνια ιριδοκυκλίτιδα, δισκοειδής κερατίτιδα, οπτική νευρίτιδα, πολυεστιακή χοριοειδίτιδα) (WHO, 2006).

2.7. ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ ΤΟΥ ΝΟΣΗΜΑΤΟΣ

Η διάγνωση της βρουκέλλωσης πραγματοποιείται είτε με την απομόνωση του μικροοργανισμού από το αίμα ή τους προσβεβλημένους ιστούς είτε με την ανίχνευση του γονιδιώματος και των ειδικών αντισωμάτων κατά της βρουκέλλας (Apostolou et al., 2010). Ωστόσο, είναι αρκετά δύσκολη γιατί ο μικροοργανισμός δε μπορεί να απομονωθεί εύκολα σε καλλιέργειες, οι χρόνιες λοιμώξεις συχνά διαφεύγουν της ανίχνευσης με τις ορολογικές δοκιμές, πολλές φορές παρατηρούνται διασταυρούμενες αντιδράσεις και η παρουσία αντισωμάτων στον ορό μπορεί να οφείλεται σε εμβολιασμό, σε ενεργή λοίμωξη ή λοίμωξη που έχει γίνει στο παρελθόν και συνεχίζεται ή όχι στο παρόν (Madad, 1979).

2.7.1. Εργαστηριακή διάγνωση της βρουκέλλωσης στα μικρά μηρυκαστικά- Συμβατικές μέθοδοι

Η διάγνωση της βρουκέλλωσης αποτελεί τη βάση των προγραμμάτων ελέγχου της νόσου (Hamdy & Amin, 2002). Τόσο στα ζώα όσο και στον άνθρωπο πραγματοποιείται είτε άμεσα, με αναζήτηση του λοιμογόνου παράγοντα σε παθολογικά υλικά, είτε έμμεσα, με ανίχνευση αντισωμάτων κατά των βακτηρίων. Η εκλογή της μεθόδου εξαρτάται από τον σκοπό της μελέτης, τη δυνατότητα ταυτοποίησης μεμονωμένων μολυσμένων ζώων, το μέγεθος του κοπαδιού, τις κλιματικές συνθήκες, τις συνθήκες της εκτροφής, το κόστος εξέτασης, τον απαιτούμενο εργαστηριακό εξοπλισμό και τον επιπολασμό της νόσου (Deneke et al., 2011).

2.7.1.1. Άμεση μικροσκοπική εξέταση

Τα επιχρίσματα γίνονται από στομαχικό περιεχόμενο εμβρύου, κοτυληδόνες, εμβρυϊκές μεμβράνες, βλέννα κόλπου, σπέρμα και γάλα. Το αποτέλεσμα αξιολογείται σε σχέση με εκείνο της καθαρής καλλιέργειας. Ως χρώσεις χρησιμοποιούνται συνηθέστερα η τροποποιημένη μέθοδος Ziehl-Nielsen, η μέθοδος Stamp και η τροποποιημένη μέθοδος Koster, αλλά μπορούν να χρησιμοποιηθούν και οι χρώσεις Gram και Machiavello (Alton et al., 1988). Για τη διαφοροποίηση των ειδών του γένους *Brucella* χρησιμοποιούνται οι δοκιμές που συνοψίζονται στον Πίνακα 5 που ακολουθεί.

Πίνακας 5: Δοκιμές διαφοροποίησης των ειδών του γένους *Brucella* από τους υπόλοιπους Gram (-) αρνητικούς κοκκοβάκιλλους (Al Dahouk et al., 2003a).

Δοκιμή	<i>Brucella</i> spp.	<i>Acinetobacter</i> spp.	<i>Oligella ureolytica</i>	<i>Haemophilus influenza</i>	<i>Francisella tularensis</i>	<i>Psychrobacter</i> ^a <i>phenylpyruvicus</i>	<i>Pasteurella</i> spp.	<i>Bordetella bronchiseptica</i>
Μορφολογία σε χρώση Gram	Μικροσκοπικοί κοκκοβάκιλλοι ^b	Στρογγυλοί κοκκοβάκιλλοι	Μικροσκοπικοί κοκκοβάκιλλοι	Μικροί κοκκοβάκιλλοι	Μικροσκοπικοί κοκκοβάκιλλοι	Στρογγυλοί κοκκοβάκιλλοι	Ραβδοειδής μεσαίου μεγέθους	Ραβδοειδής μικρού μεγέθους και κοκκοβάκιλλοι
Οξειδάση	+ ^c	-	+	(+)	-	+	+	+
Ουρεάση	+ ^d	+/-	+	+/-	-	+	+/-	+
Κινητικότητα	-	-	+/-	-	-	-	-	+
Ανάπτυξη σε MacConkey	- ^e	+	(+)	-	(+)	+	(+)	+

Όπου a: παλιότερη ονομασία *Moraxella phenylpyruvicus*

b: μορφολογία κόκκου άμμου

c: με εξαίρεση τη *Brucella ovnis* που άλλοτε δίνει θετική και άλλοτε αρνητική αντίδραση

d: η *Brucella ovnis* και η *Brucella abortus* bv 1 (στέλεχος 544) δίνουν αρνητική αντίδραση

e: κάποια είδη παρουσιάζουν ανάπτυξη

2.7.1.2. Καλλιέργεια

Η καλλιέργεια είναι η μέθοδος για την απόλυτη επιβεβαίωση της μόλυνσης από βρουκέλλα και μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε επιδημιολογικές μελέτες για τον προσδιορισμό του είδους και του βιότυπου του απομονωμένου στελέχους. Ωστόσο, η μέθοδος είναι χρονοβόρα, επίπονη, υψηλού κόστους και δεν προσφέρεται για χρήση σε επίπεδο ρουτίνας στις ανεπτυγμένες ή αναπτυσσόμενες χώρες (Deneke et al., 2011). Επιπλέον, η ευαισθησία της μεθόδου ποικίλλει από 15-70% (Apostolou et al., 2010) ανάλογα με το είδος των θρεπτικών υποστρωμάτων και την τεχνική απομόνωσης, το στάδιο της νόσου, το είδος, τη ζωτικότητα και τον αριθμό των βρουκελλών στο δείγμα καθώς και τη φύση του δείγματος, το οποίο συχνά είναι επιμολυσμένο με άλλους μικροοργανισμούς (Mantur, 2006).

Τα υλικά από τα οποία μπορεί να απομονωθεί ο μικροοργανισμός είναι τα κοιλικά εκκρίματα (αμέσως μετά την αποβολή), τα λεμφογάγγλια, ο σπλήνας, η μήτρα, ο πλακούντας, τα αναπαραγωγικά όργανα των αρσενικών, το σπέρμα και το γάλα. Επίσης, μπορεί να απομονωθεί από το στομαχικό περιεχόμενο, τους πνεύμονες, το συκώτι, τα νεφρά και τον εγκέφαλο των αποβληθέντων εμβρύων (Ribeiro et al., 1990; Seifert, 1996).

Για την καλλιέργεια των βρουκελλών χρησιμοποιούνται κοινά υποστρώματα, όπως τα θρεπτικά υποστρώματα δεξτρόζης, το σοκολατούχο άγαρ, το αιματούχο άγαρ και το άγαρ τρυπτικής σόγιας, στα οποία συνήθως προστίθεται 5-10% βόειος ορός ή ορός ίππου (Shapiro & Wong, 1999). Εάν τα δείγματα προέρχονται από μολυσμένα εκκρίματα ή ιστούς, για την απομόνωση του μικροοργανισμού προτιμώνται τα εκλεκτικά θρεπτικά υποστρώματα που περιλαμβάνουν αντιβιοτικά ή βακτηριοστατικές ουσίες (Κατσιαούνης, 1996), όπως η αμφοτερικίνη Β, η βακιτρακίνη, το κυκλοεξαμίδιο/ναταμυκίνη, η d-κυκλοσερίνη, το ναλιδιξικό οξύ, η πολυμυξίνη Β και η βανκομυκίνη (Farrell, 1974). Για την απομόνωση από δείγματα γάλακτος, πρωτογάλακτος, τυριών και άλλων γαλακτοκομικών προϊόντων, όπου ο αριθμός των βρουκελλών αναμένεται να είναι σχετικά μικρός, προτιμάται η διφασική μέθοδος Castañeda (Castañeda, 1947), η οποία μειώνει τον κίνδυνο των εργαστηριακών επιμολύνσεων και περιορίζει τις ανάγκες για ανακαλλιέργεια, τα υγρά υποστρώματα δεξτρόζης και τα πεπτονούχα θρεπτικά μέσα (WHO, 2006).

2.7.1.3. Αλλεργική αντίδραση (Allergic Skin Test-AST)

Στηρίζεται στην καθυστερημένου τύπου υπερευαισθησία και στη χρήση κεκαθαρωμένων αλλεργιογόνων που δεν προκαλούν την παραγωγή αντισωμάτων. Χρησιμοποιείται σπάνια σε επιδημιολογικές μελέτες ή ως προκαταρκτική μέθοδος στα πρόβατα όπου εμφανίζει υψηλή αξιοπιστία. Πλεονεκτήματα της μεθόδου είναι η ταχύτητα, η ευκολία στην εφαρμογή και η υπεροχή της έναντι των ορολογικών δοκιμών σε κοπάδια που έχουν εμβολιαστεί με το Rev-1. Επίσης, η δοκιμή είναι εξαιρετικά εξειδικευμένη και δεν παρατηρούνται διασταυρούμενες αντιδράσεις σε κοπάδια ελεύθερα της νόσου, συμβάλλοντας έτσι στην επιβεβαίωση της απουσίας έκθεσης των ζώων στη νόσο ή ακόμη και στην επιβεβαίωση της έκτασης της μόλυνσης σε άλλες εκτροφές (Deneke et al., 2011).

2.7.1.4. Ορολογικές μέθοδοι

Η διάγνωση της βρουκέλλωσης στα ζώα πραγματοποιείται κυρίως με τη χρήση ορολογικών τεχνικών, οι οποίες βασίζονται στην αναζήτηση των ανοσοσφαιρινών IgM και IgG στον ορό και τα άλλα σωματικά υγρά του μολυσμένου ή εμβολιασμένου ζώου (Madad, 1979). Η IgM ανιχνεύεται αμέσως μετά τη μόλυνση ή τον εμβολιασμό, σε αντίθεση με την IgG που παρουσιάζεται λίγες ημέρες αργότερα και συνεχίζει να υπάρχει όταν το ζώο είναι μολυσμένο, ενώ σε εμβολιασμένο ζώο εξαφανίζεται λίγους μήνες μετά (Κατσιαούνης, 1996).

Ωστόσο, οι ορολογικές δοκιμές έχουν μικρότερη αξιοπιστία στα μικρά μηρυκαστικά σε σχέση με τα βοοειδή καθώς αποτυγχάνουν να ανιχνεύσουν τα μολυσμένα ζώα και κυρίως τις αίγες. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιούνται στη διάγνωση της βρουκέλλωσης σε επίπεδο εκτροφής και όχι στη διάγνωση μεμονωμένων μολυσμένων ζώων. Οι κυριότερες ορολογικές μέθοδοι είναι οι εξής:

2.7.1.4.1. Δοκιμή οροσυγκόλλησης σε σωλήνες (Serum Agglutination Tube Test-SATT)

Η SATT είναι από τις πρώτες μεθόδους που χρησιμοποιήθηκαν στη διάγνωση της βρουκέλλωσης. Συνήθως είναι θετική στα πρώτα στάδια της νόσου αλλά αποτυγχάνει να διαγνώσει τα χρόνια περιστατικά και να διακρίνει τα αντισώματα που προέρχονται από μόλυνση ή από πρόσφατο εμβολιασμό. Στα μικρά μηρυκαστικά έχει μικρή

διαγνωστική αξία, ωστόσο η ευαισθησία στα πρόβατα αυξάνει όταν η μέθοδος εφαρμόζεται σε υπέρτονο διάλυμα NaCl 5% (Alivisatos & Edipides, 1953; Kolar & Kral, 1956).

2.7.1.4.2. Δοκιμή Ερυθρού της Βεγγάλης (Rose Bengal Plate Test-RBPT)

Αποτελεί προκαταρκτική δοκιμή διαλογής (screening test), η οποία χρησιμοποιείται στον προσδιορισμό του επιπέδου υγείας των ποιμνίων ως προς τη βρουκέλλωση (flock screening test) και όχι για τον προσδιορισμό μολυσμένων ζώων (OIE, 2012). Παρουσιάζει υψηλή ευαισθησία, ταχύτητα και ευκολία στην εφαρμογή και συχνά συνδυάζεται με τη σύνδεση συμπληρώματος για την επιβεβαίωση των θετικών στη Rose Bengal ορών. Επιπλέον, επηρεάζεται λιγότερο από την παρουσία των ατελών αντισωμάτων (IgG) και από το φαινόμενο της προζώνης, πλεονεκτήματα που την καθιστούν ανεκτίμητη στη διάγνωση της νόσου στα μικρά μηρυκαστικά (Madad, 1979; Κατσιαούνης, 1996). Ωστόσο, η μέθοδος χαρακτηρίζεται από χαμηλή ειδικότητα στις ενδημικές περιοχές και επηρεάζεται από διασταυρούμενες αντιδράσεις (Konstantinidis et al., 2007; Apostolou et al., 2010).

2.7.1.4.3. Δοκιμή σύνδεσης του συμπληρώματος (Complement Fixation Test-CFT)

Η δοκιμή CFT στηρίζεται στη δράση του συμπληρώματος (Complement-C), το οποίο αποτελείται από πρωτεϊνικούς παράγοντες με ιδιαίτερες χημικές ιδιότητες. Η κύρια δράση του συμπληρώματος είναι η ικανότητα σύνδεσής του με τα σύμπλοκα αντιγόνου-αντισώματος (Ag-Ab). Η διαπίστωση της σύνδεσης αυτής πραγματοποιείται με τη βοήθεια του αιμολυτικού συστήματος που αποτελείται από ερυθρά αιμοσφαίρια προβάτου και αιμολυσίνη (αντισώματα κόνικλου έναντι των ερυθρών αιμοσφαιρίων του προβάτου) (ΥΠΑΑΤ, 2015).

Η δοκιμή διακρίνεται σε δύο στάδια: στο πρώτο, όπου ο υπό εξέταση αδρανοποιημένος ορός αναμιγνύεται με το αντιγόνο και το συμπλήρωμα και το δεύτερο στάδιο, στο οποίο προστίθεται το αιμολυτικό σύστημα. Σε θετικό αποτέλεσμα (παρουσία αντισώματος στον ορό), το συμπλήρωμα καταναλώνεται κατά τη σύνδεση Ag-Ab και δεν είναι πλέον διαθέσιμο για τη λύση των ερυθρών αιμοσφαιρίων με αποτέλεσμα αυτά να καθιζάνουν στον πυθμένα. Σε αρνητικό

αποτέλεσμα (απουσία αντισώματος στον ορό), το συμπλήρωμα παραμένει αδέσμευτο και προκαλεί λύση των ερυθρών αιμοσφαιρίων του προβάτου χρωματίζοντας ερυθρό το διάλυμα (Nielsen, 2002).

Παρά τα μειονεκτήματα που παρουσιάζει η μέθοδος όπως το κόστος, το φαινόμενο της προζώνης, την ανάγκη για εξειδικευμένο προσωπικό, την αδυναμία ανίχνευσης ασυμπτωματικών φορέων, τη δυσκολία εφαρμογής της σε ορούς με αιμόλυση και την υποκειμενικότητα στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων της, η μέθοδος θεωρείται σήμερα η πιο ακριβής και αξιόπιστη ορολογική δοκιμή για την ανίχνευση της οξείας και χρόνιας βρουκέλλωσης (Στουρνάρα-Τσελεπίδου, 2008).

Η μέθοδος έχει καθιερωθεί ως μέθοδος αναφοράς για την επιβεβαίωση της μόλυνσης σε ζώα των οποίων οι οροί έχουν ανιχνευθεί θετικοί με την προκαταρκτική μέθοδο Rose Bengal Plate Test. Ωστόσο, ο συνδυασμός των δύο μεθόδων αυξάνει μεν την ευαισθησία αλλά μειώνει την ειδικότητα του διαγνωστικού σχήματος καθώς παρατηρούνται υψηλά ποσοστά ψευδώς θετικών ορολογικών αντιδράσεων εξαιτίας των παρατηρούμενων διασταυρούμενων αντιδράσεων (Κατσιαούνης, 1996).

2.7.1.4.4. Ανοσοενζυμική μέθοδος ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay-ELISA)

Μέθοδος που χρησιμοποιεί το αντιγόνο S-LPS (smooth lipopolysaccharide). Διακρίνεται σε ανταγωνιστική και έμμεση ELISA. Η ανταγωνιστική ELISA (competitive ELISA, c-ELISA) εμφανίζει ίδιου βαθμού ευαισθησία και ειδικότητα με τις κλασσικές ορολογικές δοκιμές, RBPT και CFT, ενώ η έμμεση ELISA (indirect ELISA, i-ELISA) παρουσιάζει υψηλότερη ευαισθησία στη διάγνωση της νόσου (OIE, 2009). Ωστόσο, καμία από τις προαναφερθείσες ορολογικές τεχνικές δε μπορεί να συμβάλει στη διάκριση των φυσικά μολυσμένων από τα προσφάτως εμβολιασμένα με Rev-1 ζώα ή από ζώα μολυσμένα με μικροοργανισμούς που εμφανίζουν κοινούς αντιγονικούς επιτόπους με τη βρουκέλλα (Marín et al., 1999; OIE, 2004). Η μέθοδος ELISA μπορεί να εφαρμοσθεί σε δείγματα γάλακτος και ορού αίματος. Η εφαρμογή της μεθόδου στο γάλα πλεονεκτεί έναντι αυτής σε ορό αίματος καθώς το γάλα λαμβάνεται με πιο εύκολο, απλό, ανέξοδο και φιλικό προς το ζώο τρόπο, ενώ παράλληλα η ψύξη, η κατάψυξη, η παρουσία πηγμάτων και πρωτογάλακτος δε φαίνεται να επηρεάζουν την ευαισθησία της μεθόδου. Επιπλέον, η ELISA στο γάλα

είναι εξίσου αποτελεσματική με την ELISA στον ορό του αίματος σχετικά με την ανίχνευση μολυσμένων ζώων (Chand et al, 2005). Σε γενικές γραμμές, σε περίπτωση έξαρσης της νόσου σε περιοχές με χαμηλό επιπολασμό ή σε περιοχές ελεύθερες βρουκέλλωσης προτείνεται ο συνδυασμός της ELISA με τη σύνδεση του συμπληρώματος, καθώς η ELISA εμφανίζει παρόμοια ειδικότητα με τη CFT αλλά μεγαλύτερη ευαισθησία (Biancifiori et al., 1996; Bercovich et al., 1998).

2.7.1.4.5. Δοκιμή πόλωσης του φθορίζοντος φωτός (Fluorescence Polarization Assay-FPA)

Μέθοδος βασισμένη στη θεωρία του Perrin η οποία υπέστη βελτιώσεις από τους Weber και Steiner που στοχεύει στην ανίχνευση αντισωμάτων κατά της *Brucella spp.* Η αρχή της μεθόδου στηρίζεται στον προσδιορισμό της μεταβολής της ταχύτητας αποπόλωσης του φθορίζοντος φωτός όταν το επισημασμένο με ειδική χρωστική μόριο διεγερθεί από δέσμη πολωμένου φωτός. Η ταχύτητα αποπόλωσης είναι αντιστρόφως ανάλογη του μεγέθους του φθορίζοντος μορίου. Στην περίπτωση που ο ορός περιέχει αντισώματα κατά της βρουκέλλωσης, τότε αυτά προσκολλώνται στο αντιγόνο (*Brucella*-O-πολυσακχαρίτης συνδεδεμένος με τη φθορίζουσα ουσία ισοθειοκυανική φλουορεσίνη-FTIS) μεταβάλλοντας το μέγεθός του, με αποτέλεσμα τη μεταβολή της ταχύτητας αποπόλωσης του φθορίζοντος φωτός, η οποία εκφράζεται σε ειδικές μονάδες. Ο υπό εξέταση ορός είναι θετικός όταν η τιμή των μονάδων μέτρησης είναι μεγαλύτερη από την οριακή τιμή που έχει καθοριστεί (Nielsen & Yu, 2010). Η μέθοδος FPA είναι απλή στη χρήση, παρέχει αποτελέσματα μέσα σε λίγα λεπτά, δεν επηρεάζεται από διασταυρούμενες αντιδράσεις και μπορεί να συμβάλει στη διάκριση εμβολιασμένων και φυσικά μολυσμένων ζώων όταν συνδυάζεται με τη c-ELISA (Al Dahouk et al, 2010; ΥΠΑΑΤ, 2015), όμως σε αντίθεση με τα βοοειδή η εφαρμογή της στα μικρά μηρυκαστικά είναι περιορισμένη (Στουρνάρα-Τσελεπίδου, 2008; Samadi et al., 2010a). Η ευαισθησία της μεθόδου στα εμβολιασμένα ζώα επηρεάζεται από το χρονικό διάστημα που έχει περάσει από τον εμβολιασμό (Al Dahouk et al, 2010). Σε περιοχές, όπου ο εμβολιασμός των ενήλικων προβάτων και αιγών έχει πραγματοποιηθεί με ενστάλλαξη στον οφθαλμό, η μέθοδος FPA (87mP) και η τεχνική c-ELISA μπορούν να χρησιμοποιηθούν με ασφάλεια στη διάγνωση των οροθετικών ζώων εφόσον έχει παρέλθει διάστημα ενός έτους και 5 μηνών αντίστοιχα

από τον εμβολιασμό. Σε περιοχές όπου εφαρμόζεται οφθαλμικός εμβολιασμός νεαρών ζώων, ο έλεγχος των οροθετικών ζώων πραγματοποιείται 4 μήνες από την ημέρα του εμβολιασμού, ενώ ως καταλληλότερες δοκιμές κρίνονται η FPA (87mP) για τους αμνούς και η c-ELISA για τα ερίφια (Στουρνάρα-Τσελεπίδου, 2008).

2.7.2. Εργαστηριακή διάγνωση της βρουκέλλωσης στον άνθρωπο-Συμβατικές μέθοδοι

Σε γενικές γραμμές, για την αποφυγή της καθυστερημένης έναρξης της θεραπευτικής αγωγής που οδηγεί στη χρονιότητα της νόσου στους ασθενείς, σε μη ενδημικές περιοχές η διαγνωστική προσέγγιση προτείνεται να βασίζεται σε τρία κριτήρια: στην κλινική εικόνα (κυματοειδής πυρετός με απώλεια βάρους, ρίγη, δύσσοσμη εφίδρωση, σπληνομεγαλία και ηπατομεγαλία), στο συμβατό ιστορικό (μετακίνηση σε περιοχή όπου η χώρα ενδημεί, κατανάλωση ατελώς επεξεργασμένων προϊόντων γάλακτος και κρέατος) και στα εργαστηριακά ευρήματα (θετική καλλιέργεια ή θετική PCR ή θετική IgM και IgG ELISA). Από την άλλη πλευρά, σε ενδημικές περιοχές η διάγνωση στον άνθρωπο στηρίζεται στα εξής δύο κριτήρια: την κλινική εικόνα και την εργαστηριακή διάγνωση (θετική καλλιέργεια ή θετικές ορολογικές δοκιμές με σταδιακά αυξανόμενους τίτλους) (Al Dahouk et al., 2013).

2.7.2.1. Καλλιέργεια

Είναι η μέθοδος που θέτει οριστικά τη διάγνωση σε περίπτωση θετικού αποτελέσματος, ωστόσο απαιτείται να παρέλθει χρονικό διάστημα 45 ημερών για να χαρακτηριστεί ένα δείγμα με ασφάλεια αρνητικό. Τα συνηθέστερα υλικά για την απομόνωση του μικροοργανισμού είναι ο μυελός των οστών, το εγκεφαλονωτιαίο υγρό, το αίμα και το πύον (Yagupsky, 1999; WHO, 2006). Η ευαισθησία της μεθόδου ανέρχεται στο 80-90% στα οξεία περιστατικά, ενώ στα χρόνια κυμαίνεται μεταξύ 15-70%, γεγονός που αποδίδεται στη χρήση διαφορετικών τεχνικών μεταξύ των εργαστηρίων (Apostolou et al., 2010; Al Dahouk et al., 2013). Οι πιο συνήθεις τεχνικές απομόνωσης του μικροοργανισμού από κλινικά δείγματα είναι η μέθοδος Castañeda, τα αυτοματοποιημένα συστήματα (automated systems) και άλλες νεότερες τεχνικές, όπως η ωσμωτική λύση και φυγοκέντρηση (LC technique-Lysis Centrifugation technique) (Espinosa et al., 2009). Η LC τεχνική στηρίζεται στη λύση των ερυθροκυττάρων του αίματος σε διάλυμα κιτρικών και στη συνέχεια στη

φυγοκέντρωση του διαλύματος, από την οποία το ίζημα που προκύπτει υποβάλλεται σε διαδοχικές ανακαλλιέργειες. Η LC τεχνική υπερτερεί έναντι της τεχνικής Ruiz-Castañeda καθώς δίνει αποτελέσματα σε πιο σύντομο χρονικό διάστημα (10 ημέρες νωρίτερα), χωρίς να επηρεάζεται από το στάδιο της νόσου (μεγαλύτερη ευαισθησία), ενώ παράλληλα είναι οικονομική και απλή στην εφαρμογή (Espinosa et al., 2009).

2.7.2.2. Ορολογικές μέθοδοι

Οι ορολογικές μέθοδοι έχουν ευρεία εφαρμογή στη διάγνωση της νόσου στον άνθρωπο. Στηρίζονται στην ανίχνευση των κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών και του ανοσοκυρίαρχου αντιγόνου S-LPS (smooth lipopolysaccharide) που εντοπίζεται στην εξωτερική κυτταρική μεμβράνη. Ωστόσο, συχνά παρατηρούνται ψευδώς θετικά αποτελέσματα που οφείλονται στις διασταυρούμενες αντιδράσεις εξαιτίας της στενής αντιγονικής συγγένειας του LPS με τους επιτόπους άλλων Gram (-) αρνητικών βακτηρίων, όπως των *Yersinia enterocolitica* O:9, *Escherichia coli* O:157, *Francisella tularensis*, *Salmonella urbana* O:30, *Vibrio cholerae* και *Stenotrophomonas maltophilia* (Al Dahouk et al., 2010). Από την άλλη πλευρά, δεν έχουν σημειωθεί παρόμοιες διασταυρούμενες αντιδράσεις με τη χρήση των κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών, γεγονός που τις καθιστά ιδανικές για τη διάκριση μολύνσεων από τη *Brucella* και από τους άλλους φυλογενετικά συγγενείς μικροοργανισμούς (WHO, 2006).

Στην οξεία φάση της νόσου η πρώτη και κυρίαρχη ανοσοσφαιρίνη είναι η IgM, η οποία μία εβδομάδα αργότερα ακολουθείται από αύξηση της ανοσοσφαιρίνης IgG. Ωστόσο, η αρχική αύξηση της ανοσοσφαιρίνης IgM δεν παρατηρείται σε ασθενείς με αργή εκδήλωση της νόσου, με υποτροπές ή όταν η νόσος χρονίσει (WHO, 2006). Αντίθετα, στα χρόνια περιστατικά ή σε υποτροπές παρατηρείται αύξηση των ανοσοσφαιρινών IgG και IgA αντίστοιχα (Κοκολάκη & Φανουράκη, 2010). Οι συνηθέστερες ορολογικές δοκιμές για τον άνθρωπο είναι:

2.7.2.2.1. Συγκολλητινοαντίδραση Wright (Standard Tube Agglutination Test-SAT)

Αποτελεί τη μέθοδο αναφοράς για την ορολογική διάγνωση της βρουκέλλωσης στον άνθρωπο (Al Dahouk et al., 2003b). Θεωρείται η πιο κοινή και απλή εξέταση για τη

διάγνωση της βρουκέλλωσης. Στηρίζεται στην ανίχνευση αντισωμάτων κατά του S-LPS. Τίτλοι αντισωμάτων $\geq 1/160$ ή $\geq 1/320$ σε περιοχές όπου η νόσος ενδημεί, αποτελούν ένδειξη παλαιότερης ή ενεργού νόσου. Με τη σταδιακή αύξηση του τίτλου και την παράλληλη εμφάνιση συμβατής κλινικής εικόνας υποδηλώνεται πρόσφατη λοίμωξη από βρουκέλλα (Apostolou et al., 2010).

Μειονεκτήματα της μεθόδου είναι η αδυναμία διάκρισης της οξείας και χρόνιας μορφής, τα ψευδώς θετικά αποτελέσματα λόγω των προαναφερθέντων διασταυρούμενων αντιδράσεων της *Brucella* με άλλους γενετικά συγγενείς μικροοργανισμούς και το φαινόμενο της προζώνης εξαιτίας των ατελώς δεσμευτικών αντισωμάτων (Apostolou et al., 2010).

2.7.2.2.2. Συγκολλητινοαντίδραση RBPT (Rose Bengal Plate Test)

Παρά το γεγονός ότι είναι η προτεινόμενη μέθοδος για τη διάγνωση της νόσου στον άνθρωπο σε δείγματα σωματικών υγρών (ENY και αρθρικό υγρό), καλό είναι να συνδυάζεται με άλλες τεχνικές, ειδικά σε περιοχές όπου η νόσος ενδημεί. Έχει υψηλή ευαισθησία (>99%) αλλά χαμηλή ειδικότητα καθώς σε ασθενείς μολυσμένους με άλλους μικροοργανισμούς εμφανίζει αρκετά ψευδώς θετικά αποτελέσματα (WHO, 2006).

2.7.2.2.3. Σύνδεση συμπληρώματος (Complement Fixation Test-CFT)

Η μέθοδος βασίζεται στην ανίχνευση των ανοσοσφαιρινών IgM και IgG₃, γεγονός που την καθιστά χρήσιμη για όλα τα στάδια της νόσου (ΚΕΕΛΠΝΟ, 2012e), ειδικά όταν συνδυάζεται με τη μέθοδο SAT (WHO, 2006). Ωστόσο, δεν προτείνεται για χρήση σε μικρά εργαστήρια λόγω της πολυπλοκότητας και της ελλιπούς τυποποίησής της (ΚΕΕΛΠΝΟ, 2012e; WHO, 2006).

2.7.2.2.4. Ένζυμική ανοσοπροσροφητική μέθοδος (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay-ELISA)

Αν και η μέθοδος SAT είναι η μέθοδος αναφοράς, η μέθοδος ELISA είναι η τεχνική που εμφανίζει ευρεία εφαρμογή στις περιοχές όπου η νόσος δεν ενδημεί (Prince et al., 2009). Είναι η πλέον αξιόπιστη μέθοδος καθώς βασίζεται στην ανίχνευση των αντισωμάτων IgG, IgM και IgA κατά των κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών των βρουκελλών. Για το λόγο αυτό, εμφανίζει μεγάλη ειδικότητα αφού αποφεύγονται οι

διασταυρούμενες αντιδράσεις με άλλους αντιγονικά συγγενείς μικροοργανισμούς (Apostolou et al., 2010). Μολονότι στις οξείες φάσεις της νόσου, τόσο η ELISA όσο και η SAT εμφανίζουν παραπλήσια ευαισθησία, στα χρόνια περιστατικά καθώς και στις φάσεις ανάρρωσης, η μέθοδος ELISA προτιμάται έναντι της τεχνικής SAT, καθώς η πρώτη είναι πιο ευαίσθητη στην ανίχνευση των αντισωμάτων IgG (Fadeel et al., 2011). Επιπλέον, η έμμεση ELISA (με S-LPS και IgG conjugates) φαίνεται να είναι μία πολλά υποσχόμενη δοκιμή στη διαγνωστική προσέγγιση της νόσου εφόσον ξεπεραστούν προβλήματα που προκύπτουν από την τυποποίηση της μεθόδου, την ανάγνωση των αποτελεσμάτων και τη μεγάλη ποικιλία των αντιδραστηρίων (WHO, 2006).

2.7.2.2.5. Δοκιμή αντιανθρώπινης σφαιρίνης (Δοκιμή Coombs)

Μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό με τη SAT για την ανεύρεση του σταδίου εξέλιξης της νόσου. Ειδικά στα χρόνια και υποτροπιάζοντα περιστατικά, η μέθοδος Coombs θεωρείται η μέθοδος εκλογής. Ωστόσο, τόσο η μέθοδος Coombs όσο και η μέθοδος SAT έχουν αποδειχθεί κατά τη χρήση τους αρκετά επίπονες και χρονοβόρες (Casanova et al., 2009). Μία εναλλακτική μέθοδος είναι η δοκιμή Brucellacapt (Vircell, Santa Fé, Granada, Spain), η οποία επιτρέπει την ανίχνευση του συνόλου των αντιβρουκελλικών αντισωμάτων ανεξάρτητα από το στάδιο της νόσου, ενώ παράλληλα διακρίνει την πτώση του τίτλου των αντισωμάτων μετά από χορήγηση αντιβιοτικής αγωγής από την πτώση που παρατηρείται στις υποτροπές της νόσου (Casanova et al., 2009; Mantur et al., 2011).

2.7.2.2.6. Μέθοδος πόλωσης του φθορίζοντος φωτός (FPA)

Είναι μέθοδος γρήγορη, οικονομική, με υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα (μεγαλύτερη των μεθόδων SAT και RBPT) και μπορεί να εφαρμοστεί σε διαφορετικά είδη δειγμάτων. Ωστόσο, λόγω της ελάχιστης εμπειρίας, δε μπορεί να χρησιμοποιηθεί σα μοναδική μέθοδος στην εργαστηριακή διάγνωση της βρουκέλλωσης και συνίσταται να συνδυάζεται με την αναλυτική τεχνική ELISA για μεγαλύτερη ακρίβεια στα παρεχόμενα αποτελέσματα (Konstantinidis et al., 2007).

2.7.2.2.7. Ενδοδερμικές μέθοδοι

Βασίζεται στην ανάπτυξη υπερευαισθησίας καθυστερημένου τύπου σε αντιγόνα *Brucella* τα οποία ενίονται ενδοδερμικά. Δεν προτείνεται για χρήση στη διαγνωστική προσέγγιση της νόσου καθώς ανιχνεύει μόνο παλιά έκθεση του ανθρώπου στον μικροοργανισμό και επιπλέον η ενδοδερμική έγχυση αντιγόνων μπορεί να παρέμβει στην αξιοπιστία των ορολογικών δοκιμών (WHO, 2006). Ωστόσο, σύμφωνα με τα αποτελέσματα προηγούμενης μελέτης (Hadjichristodoulou et al., 1994), η ενδοδερμική δοκιμή βρέθηκε ασφαλής και σημείωσε υψηλή ευαισθησία (93,33%) και ειδικότητα (89%) κατά τη χρήση της στη διάγνωση της χρόνιας βρουκέλλωσης σε ασθενείς.

2.7.3. Εργαστηριακή διάγνωση της βρουκέλλωσης στα ζώα και τον άνθρωπο- Μέθοδοι μοριακής βιολογίας

Η βρουκέλλωση είναι νόσημα με τεράστια σημασία για την οικονομία που απαιτεί τη χρήση γρήγορων και ευαίσθητων διαγνωστικών εργαλείων. Η καλλιέργεια και οι ορολογικές μέθοδοι, αν και σήμερα χρησιμοποιούνται ευρέως στη διάγνωση της νόσου, εμφανίζουν σοβαρά μειονεκτήματα (Romero & Lopez-Goñi, 1999). Η καλλιέργεια είναι χρονοβόρα, εκθέτει το προσωπικό στον παθογόνο παράγοντα και εμφανίζει χαμηλή ευαισθησία στις χρόνιες και υποτροπιάζουσες μορφές της νόσου, ενώ οι ορολογικές τεχνικές, αν και είναι γρήγορες και οικονομικές, αδυνατούν να διακρίνουν το εμβολιακό στέλεχος από τα φυσικά μολυσματικά και πολύ συχνά επηρεάζονται από διασταυρούμενες αντιδράσεις. Οι περιορισμοί αυτοί οδήγησαν σταδιακά σε ένα αυξανόμενο ενδιαφέρον για την ανεύρεση μεθόδων ικανών να ανιχνεύουν τη βρουκέλλα άμεσα στα δείγματα, με μεγάλη ακρίβεια και σε σύντομο χρονικό διάστημα (Marianelli et al., 2008). Παρά τη μεγάλη ομολογία που παρατηρείται στο γενωμικό DNA πολλών ειδών του γένους *Brucella*, πολλές μοριακές μέθοδοι όπως η PCR, η RFLP, η PFGE, η MLVA και η Southern blot έχουν κατά καιρούς χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίηση των βρουκελλών σε επίπεδο είδους και βιότυπου (Samadi et al., 2010a). Ως γονίδια-στόχοι έχουν κατά καιρούς χρησιμοποιηθεί τα 16S rRNA, 16S-23S ITS (Internal Transcribed Spacer region), *omp2*, *IS711* και *bcsp31* (Al Dahouk et al., 2010).

Παρακάτω δίνεται έμφαση στις μοριακές τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν στα πλαίσια της παρούσας μελέτης.

2.7.3.1. Μέθοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction-PCR)

Η μέθοδος περιλαμβάνει επαναλαμβανόμενους κύκλους ενίσχυσης επιλεγμένων αλληλουχιών, καθένας από τους οποίους αποτελείται από τρία στάδια: (α) αποδιάταξη DNA, (β) υβριδοποίηση των εκκινητών με τις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες και (γ) επιμήκυνση των αλληλουχιών των υβριδισμένων εκκινητών με το ένζυμο DNA πολυμεράση (Kyriazis et al., 2014). Η μέθοδος PCR είναι αρκετά αξιόπιστη, εμφανίζει υψηλή αναπαραγωγιμότητα και έχει χρησιμοποιηθεί ευρύτατα για τον έλεγχο της εξάπλωσης της βρουκέλλωσης τόσο στον ζωικό πληθυσμό όσο και στον άνθρωπο (Samadi et al., 2010a). Επιπρόσθετα, μπορεί να δώσει αποτελέσματα σε διάστημα 2-3 ωρών, δεν εγκυμονεί κινδύνους για το προσωπικό που χειρίζεται τα δείγματα, βοηθάει στην ανίχνευση μικρού αριθμού μικροβίων, έχει υψηλή ακρίβεια (Marianelli et al., 2008), δεν επηρεάζεται από τη ζωτικότητα των μικροοργανισμών όπως συμβαίνει στις καλλιέργειες (Hamdy & Amin, 2002) ενώ παράλληλα απαιτεί μικρότερη ποσότητα δείγματος (Ihan et al., 2008).

Η μέθοδος θεωρείται πιο ευαίσθητη από τις καλλιέργειες και πιο ειδική από τις ορολογικές δοκιμές (Hamdy & Amin, 2002). Μελέτη σε αίμα ασθενών με πρωτογενείς λοιμώξεις, υποτροπές και εστιακές μολύνσεις έδειξε ότι η PCR εμφανίζει μεγαλύτερη ευαισθησία και ειδικότητα στην ανίχνευση των βρουκελλών σε σχέση με τις συμβατικές μικροβιολογικές μεθόδους (Najum, 2014).

Ωστόσο, ακόμη και στην περίπτωση της PCR υπάρχουν σαφείς περιορισμοί, όπως το υψηλό κόστος και η ανάγκη για κατάλληλα καταρτισμένο προσωπικό (Carbonnelle et al., 2011). Άλλο μειονέκτημα της μεθόδου αποτελούν οι διαφορές στην ευαισθησία της που οφείλονται τόσο στη φύση, τη σύσταση και την ποσότητα του δείγματος όσο και στο πρωτόκολλο εξαγωγής του γενωμικού DNA από το δείγμα (Romero & Lopez-Goñi, 1999; Hamdy & Amin, 2002; Mantur, 2006; Marianelli et al., 2008). Για παράδειγμα, σε έρευνες που έγιναν στο γάλα, το όριο ανίχνευσης της PCR βρέθηκε να κυμαίνεται σε 10 βακτήρια/ml (Leal-Klevezas et al., 1995), 1000 cfu/ml (Hamdy & Amin, 2002), $2,8 \times 10^4$ cfu/ml (Rijpens et al., 1996), $4,2 \times 10^4$ cfu/ml (Romero &

Lopez-Goñi, 1999) και $1,7 \times 10^3 - 1,7 \times 10^4$ cfu/ml (Ihan et al., 2008). Επίσης, η ύπαρξη αναστολέων της πολυμεράσης, όπως είναι η αιμοσφαιρίνη, η ουρία, η ηπαρίνη, η φαινόλη, το SDS καθώς και η περιεκτικότητα σε λιπίδια, πρωτεΐνες, πολυσακχαρίτες, ένζυμα και Ca^{2+} , παρεμποδίζει την ενίσχυση των γονιδίων-στόχων μειώνοντας την ευαισθησία της μεθόδου και συμβάλλοντας στην αύξηση των ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων (Romero & Lopez-Goñi, 1999; Hamdy & Amin, 2002; Marianelli et al., 2008).

2.7.3.2. Μέθοδος της πολυπλεκτικής αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (Multiplex PCR)

Είναι μία αντίδραση ταυτόχρονης ενίσχυσης περισσότερων της μίας αλληλουχίας-στόχου σε ένα δείγμα με τη χρήση δύο ή περισσότερων ζευγών εκκινητών, ειδικών για διαφορετικούς στόχους (Kyriazis et al., 2014).

Στη βιβλιογραφία αναφέρονται διάφορα πρωτόκολλα multiplex PCR τα οποία έχουν αναπτυχθεί για την ταυτοποίηση των βρουκελλών σε επίπεδο γένους, είδους και βιότυπου. Το 1994 ο Bricker με τους συνεργάτες του ανέπτυξαν μία Multiplex AMOS-PCR (“Abortus-Melitensis-Ovis-Suis-PCR”), η οποία χρησιμοποιήθηκε στη διάκριση των τεσσάρων ειδών του γένους *Brucella* και πιο συγκεκριμένα της *B. abortus*, της *B. melitensis*, της *B. ovis* και της *B. suis*. Στηρίχτηκε στη χρήση πέντε ζευγών εκκινητών, από τα οποία το ένα (IS711) είναι ειδικό για την ανίχνευση του γένους *Brucella*, ενώ τα υπόλοιπα τέσσερα συντελούν στην ταυτοποίηση σε επίπεδο είδους (Bricker and Halling, 1994). Στη συνέχεια, η προσθήκη τριών επιπλέον ζευγών εκκινητών στο πρωτόκολλο της Multiplex AMOS-PCR συνέβαλε στον επιτυχή διαχωρισμό των εμβολιακών στελεχών S19 και RB51, από τα φυσικά στελέχη της *B. abortus* (Ewalt and Bricker, 2000). Το 2000 ο Clockaert και οι συνεργάτες του χρησιμοποιώντας ειδικούς εκκινητές που στοχεύουν την αλληλουχία IS711, ανίχνευσαν ένα καινούριο είδος βρουκέλλας, τη *Brucella maris*. Το 2006 περιγράφηκε ένα πρωτόκολλο multiplex PCR για την ταυτοποίηση όλων των ειδών του γένους *Brucella* καθώς και των εμβολιακών στελεχών *B. abortus* RB51 και S19 και *B. melitensis* Rev-1. Ωστόσο, το πρωτόκολλο αυτό υστερούσε στον επιτυχή διαχωρισμό της *B. microti* από τη *B. suis* και της *B. ceti* από τη *B. pinnipedialis* (Garcia-Yoldi et al., 2006). Το 2010 το πρωτόκολλο αυτό βελτιστοποιήθηκε από τον

Mayer-Scholl και τους συνεργάτες του και συνέβαλε στην ταυτοποίηση όλων των ειδών του γένους, συμπεριλαμβανομένων και των πρόσφατα απομονωμένων ειδών από τα θαλάσσια θηλαστικά. Τέλος, το 2008 η ανάπτυξη μιας διαφοροποιημένης MP-ST-PCR (sensitive multi-primer single-target PCR) συνέβαλε στην ταυτοποίηση και το διαχωρισμό των βρουκελλών από μικροοργανισμούς φαινοτυπικά και γενετικά συγγενείς με το γένος *Brucella*, όπως οι *Ochrobactrum anthropi* και *Ochrobactrum intermedium* (Scholz et al., 2008b).

2.7.3.3. Μέθοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-Time PCR- RT PCR)

Η τεχνική αυτή στηρίζεται στη χρήση ειδικών χρωστικών, οι οποίες όταν βρίσκονται ελεύθερες στο διάλυμα δεν παράγουν φθορισμό, ενώ σε σύνδεσή τους με το δίκλωνο μόριο του DNA παράγουν ποσοτική αύξηση του φθορισμού. Με τον τρόπο αυτόν, επιτυγχάνεται και η ποσοτικοποίηση του DNA (Kyriazis et al., 2014). Η ποσοτική μέθοδος Real-Time PCR μπορεί να βοηθήσει στη διάκριση της οξείας και χρόνιας μορφής της νόσου της βρουκέλλωσης (Al Dahouk et al., 2013), ενώ παράλληλα είναι πιο ευαίσθητη από την PCR και περιορίζει σημαντικά τον κίνδυνο των επιμολύνσεων και των ψευδώς θετικά αποτελεσμάτων (Santis et al., 2011). Μέχρι σήμερα έχουν αναπτυχθεί διάφορα πρωτόκολλα Real-Time PCR τα οποία χρησιμοποιούνται ευρέως στη διαγνωστική προσέγγιση του νοσήματος στα ζώα και στον άνθρωπο καθώς και στην ταυτοποίηση των βρουκελλών σε επίπεδο είδους και βιότυπου (Redkar et al., 2001; Queipo-Ortuno et al., 2005; Kattar et al., 2007; Hinić et al., 2008).

2.7.3.4. Πολυμορφισμός μεγέθους περιοριστικών θραυσμάτων (Restriction Fragment Length Polymorphism-RFLP)

Αποτελεί μοριακή τεχνική, η οποία βασίζεται στον πολλαπλασιασμό του DNA στόχου με τη μέθοδο PCR και στη συνέχεια στην πέψη της ενισχυμένης αλληλουχίας-στόχου με συγκεκριμένες περιοριστικές ενδονουκλεάσες. Το χαρακτηριστικό αυτό δίνει τη δυνατότητα ταυτοποίησης των διαφορετικών αλληλομόρφων ενός γονιδίου. Όταν εξετάζεται ένας γονιδιακός πολυμορφισμός που περιέχει την αλληλουχία που αναγνωρίζει το ένζυμο περιορισμού, τότε το τμήμα DNA που περιέχει αυτήν την αλληλουχία θα κοπεί σε μικρότερα κομμάτια, ενώ το άλλο αλληλόμορφο του πολυμορφισμού θα διατηρήσει το αρχικό του μέγεθος. Τα δείγματα του DNA που

υφίστανται πέψη αναλύονται βάσει του μοριακού τους μεγέθους σε πηκτή αγαρόζης με την μέθοδο της ηλεκτροφόρησης. Η εικόνα που προκύπτει αντιπαραβάλλεται με γνωστά πρότυπα PCR-RFLP ώστε να ταυτοποιηθεί το είδος του παθογόνου μικροοργανισμού, ακόμη και να τυποποιηθεί το στέλεχος σε υποειδικό επίπεδο (Kyriazis et al., 2014).

Η μέθοδος PCR-RFLP συμβάλλει στην ταξινόμηση, την επιδημιολογική διερεύνηση και την διαγνωστική προσέγγιση της βρουκέλλωσης (Pishva et al., 2015). Επιπλέον, έχει χρησιμοποιηθεί επιτυχώς στο διαχωρισμό του εμβολιακού στελέχους Rev-1 από τα φυσικά μολυσματικά στελέχη των βρουκελλών (Bardenstein et al., 2002; Noutsios et al., 2012). Ο διαχωρισμός αυτός βασίζεται στη χρήση του *omp2* γονιδίου των βρουκελλών, το οποίο κωδικοποιεί το σύνολο των πρωτεϊνών της εξωτερικής μεμβράνης των στελεχών της *B. melitensis* με MB 25-36KDa και έχει δύο αλληλόμορφα, το *omp2a* και το *omp2b*, που διαφέρουν ελάχιστα μεταξύ των ειδών και των βιοτύπων των βρουκελλών (Noutsios et al., 2012). Για την πέψη της αλληλουχίας-στόχου χρησιμοποιείται η περιοριστική ενδονουκλεάση τύπου II, *PstI*. Με την τεχνική αυτή, τα εμβολιακά στελέχη παρουσιάζουν 3 ζώνες (282, 238 και 44bp) ενώ τα φυσικά μολυσματικά 2 ζώνες (238 και 44bp) (Bardenstein et al., 2002).

2.7.4. Εργαστηριακή διάγνωση της βρουκέλλωσης στα ζώα και τον άνθρωπο- Μέθοδοι πρωτεομικής

2.7.4.1. Φασματοσκοπία Μάζας MALDI-TOF MS (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry)

Η ανάγκη για την άμεση διάγνωση των λοιμωδών νοσημάτων και την άμεση χορήγηση της κατάλληλης θεραπευτικής αγωγής με στόχο την καλύτερη κατά το δυνατό κλινική πορεία των ασθενών, συνέβαλε στην ανεύρεση νέων μεθόδων με στόχο τη γρήγορη και αξιόπιστη ανίχνευση και ταυτοποίηση των παθογόνων μικροοργανισμών (Cherkaoui et al., 2010).

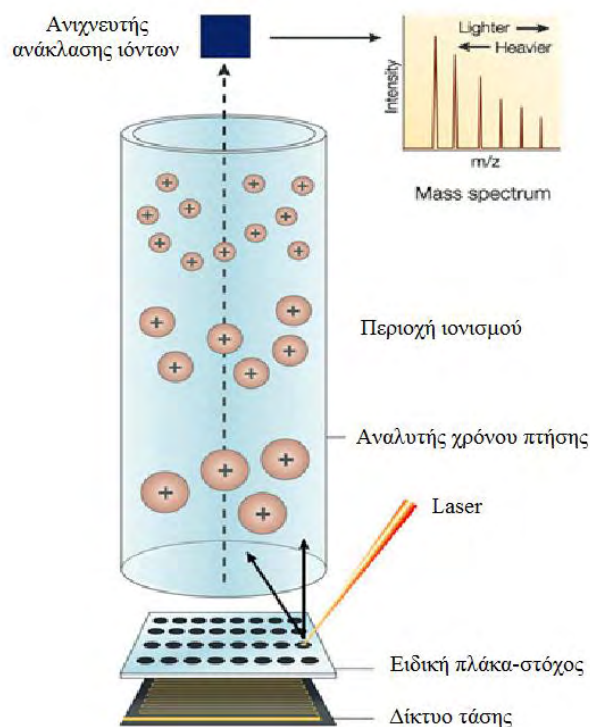
Μία τέτοια δυναμική προοπτική στον τομέα της εφαρμοζόμενης μικροβιολογικής διάγνωσης αποτελεί η μέθοδος MALDI-TOF MS, η οποία ήδη από τη δεκαετία του 1980 επιτρέπει την ανίχνευση βακτηριακών πρωτεϊνών (επιφανειακές και ριβοσωμικές πρωτεΐνες), DNA, RNA και βακτηριακών μεταβολιτών με μεγάλη

ταχύτητα και ακρίβεια (Lay, 2001). Οι επιφανειακές πρωτεΐνες είναι ιδιαίτερα σημαντικές καθώς συσχετίζονται με την παθογόνο δράση και λοιμογόνο δύναμη του μικροοργανισμού (Majcherczyk et al., 2006), ενώ οι ριβοσωμικές συνδέονται με το μηχανισμό μετάφρασης του κυτταρικού DNA και παραμένουν ανέπαφες από ενδεχόμενες περιβαλλοντικές αλλαγές (Sauer et al., 2008).

Το 1996 προτάθηκε από τον Holland και τους συνεργάτες του η εφαρμογή της μεθόδου σε άθικτα κύτταρα μικροοργανισμών, παρακάμπτοντας με αυτόν τον τρόπο την επίπονη και χρονοβόρα διαδικασία της προηγούμενης απομόνωσης πρωτεϊνικών και άλλων εκχυλισμάτων. Έτσι, σε μελέτες που ακολούθησαν (Holland et al., 1996; Claydon et al., 1996; Krishnamurthy & Ross, 1996), αποδείχθηκε η ικανότητα της μεθόδου να ταυτοποιεί βακτήρια σε επίπεδο είδους και στελέχους απευθείας από άθικτα κύτταρα καλλιεργειών.

Σύμφωνα με την αρχή λειτουργίας της MALDI-TOF MS (Εικόνα 4), το προς εξέταση δείγμα μετά από ανάμιξή του με την κατάλληλη μήτρα τοποθετείται στην ειδική πλάκα-στόχο και εισάγεται στην περιοχή ιονισμού σε συνθήκες υψηλού κενού αερίων. Στη συνέχεια, βομβαρδίζεται με την εφαρμογή παλμικού Laser μέχρι μερικής ατμοποίησης του υποστρώματος κατά κύματα, ενώ τα παραγόμενα ιόντα αφού επιταχυνθούν με τη βοήθεια ηλεκτρικού πεδίου οδηγούνται στο φίλτρο μαζών (TOF analyzer-Time of Flight-αναλυτής χρόνου πτήσης) όπου διαχωρίζονται βάσει του λόγου μάζας προς φορτίο μέχρι να προσπέσουν στον ανιχνευτή (Counterman et al., 2003).

Κατά την πρόπτωση των ιόντων και, ανάλογα με τον αριθμό τους και την κινητική τους κατάσταση, προκαλείται εκπομπή ηλεκτρονίων από τον ανιχνευτή, επομένως παράγεται ηλεκτρικό ρεύμα, το οποίο στη συνέχεια, ενισχύεται και παρουσιάζεται τελικά ως φάσμα μάζας (mass spectrum). Το τελικό στάδιο της τεχνικής αποτελεί η καταγραφή και η παρουσίαση φασμάτων μαζών, τα οποία συνιστούν κορυφές μικρού εύρους, διαφορετικής σχετικής θέσης και ύψους. Συνεπώς, η διαδικασία ανίχνευσης μιας ουσίας μέσω της MALDI-TOF MS χαρακτηρίζεται από την παραγωγή και την αξιόπιστη καταγραφή ενός συγκεκριμένου φάσματος ιόντων, το οποίο συγκρινόμενο με διαθέσιμες ευρείες βάσεις δεδομένων οδηγεί τελικά στην ταυτοποίηση της ουσίας αυτής (Kalogeropoulou et al., 2008).



Εικόνα 4: Σχηματική περιγραφή αρχής λειτουργίας MALDI-TOF MS (Kim et al., 2003).

Αναφορικά με τις βάσεις δεδομένων, υπάρχουν δύο τύπων: α) η βιβλιοθήκη αναφοράς (Biotyper Reference Library) και β) η βιβλιοθήκη για την ταυτοποίηση ειδικών λοιμογόνων παραγόντων, όπως τα είδη του γένους *Brucella* (Bruker's Security Relevant Library) (Cunningham & Patel, 2013). Στην περίπτωση των βρουκελλών κρίνεται αναγκαία η συνδυαστική χρήση και των δύο βιβλιοθηκών, ώστε να επιτευχθεί με ακρίβεια και ασφάλεια η ταυτοποίηση των μικροοργανισμών σε επίπεδο γένους και είδους (Cunningham & Patel, 2013), αποφεύγοντας διαγνωστικά λάθη που έχουν παρουσιαστεί έως τώρα με τη χρήση άλλων μεθόδων, όπως το AP2ONE και το MicroScan WalkAway system (Elsaghir & James, 2003; Dash et al., 2012).

Σχετικά με τη σύσταση της μήτρας, αυτή ποικίλλει ανάλογα με το βιομόριο που υπόκειται σε ανάλυση και τον τύπο του laser που χρησιμοποιείται (Fenselau & Demirev, 2001). Τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα χημικά υποστρώματα είναι τα DHB

(2,5-dihydroxybenzoic acid), CHCA (α -cyano-4-hydroxycinnamic acid), SA (sinapinic acid), FA (ferulic acid) και το 2,4-hydroxy-phenyl benzoic acid. Οι μήτρες FA, SA και CHCA είναι αποτελεσματικές για την ανίχνευση πρωτεϊνικών δεικτών (Fenselau & Demirev, 2001), ενώ η μήτρα DHB παρουσιάζεται ως η καλύτερη επιλογή για την ανίχνευση γλυκοπεπτιδίων και γλυκοπρωτεϊνών (Giebel et al., 2010). Το μέγεθος και η ένταση των κορυφών των προς ανίχνευση μορίων εξαρτάται άμεσα από την επιλογή της μήτρας. Οι μήτρες DHB και CHCA συνήθως είναι ιδανικές για την ανίχνευση χαμηλής μάζας ιόντων (έως 10 kDa με την επιλογή του κατάλληλου διαλύτη), ενώ για τα ιόντα υψηλής μάζας (πάνω από 15 kDa) ιδανικότερες θεωρούνται οι μήτρες SA και FA αλλά παρουσιάζουν χαμηλότερη ευαισθησία από το CHCA (Croxatto et al., 2012).

Η ταυτοποίηση με τη χρήση της MALDI-TOF MS βασίζεται στα εξής ευρήματα:

- Τα φασματικά αποτυπώματα (spectral fingerprints) ποικίλουν μεταξύ των διαφόρων μικροοργανισμών
- Ανάμεσα στα συστατικά που ανιχνεύονται στο φάσμα, υπάρχουν κάποιες κορυφές (μοριακές μάζες) ειδικές για το διαχωρισμό των μικροοργανισμών σε επίπεδο γένους, είδους και υποείδους
- Τα φάσματα που λαμβάνονται έχουν υψηλή αναπαραγωγιμότητα με την προϋπόθεση η ανάπτυξη των μικροοργανισμών να διενεργείται στις ίδιες συνθήκες (Carbonnelle et al., 2011).

Τα πλεονεκτήματα της MALDI-TOF MS έναντι των άλλων μεθόδων αποτελούν η ικανότητά του να ταυτοποιεί με μεγάλη ευαισθησία άθικτα κύτταρα μικροοργανισμών, η μείωση του χρόνου προπαρασκευής του δείγματος, η ταχύτητα λήψης αποτελεσμάτων, η δυνατότητα εφαρμογής της μεθόδου στην Ιατρική, τον ποιοτικό έλεγχο των τροφίμων και την αντιμετώπιση της βιοτρομοκρατίας, η δυνατότητα ανίχνευσης και ταυτοποίησης των μικροοργανισμών χωρίς τη χρήση προκαθορισμένων στόχων όπως συμβαίνει στις μοριακές τεχνικές, η ανάλυση πρωτεϊνών πολύπλοκων βιολογικών μειγμάτων, η διάκριση ορισμένων λοιμογόνων μικροοργανισμών από άλλους με κοινούς αντιγονικούς επιτόπους, το χαμηλό κόστος ανάλυσης και η υψηλή ακρίβεια της μεθόδου (0,01) (Kalogeropoulou et al., 2008; Gandhi et al., 2013).

Ωστόσο, η μέθοδος παρουσιάζει αρκετούς περιορισμούς. Ένας από αυτούς είναι η αναπαραγωγιμότητα της μεθόδου, καθώς η ποιότητα του φάσματος επηρεάζεται από τις συνθήκες καλλιέργειας των μικροοργανισμών, τα πρωτόκολλα εκχύλισης των πρωτεϊνών, την προπαρασκευή του δείγματος, τη μέθοδο τοποθέτησης στην πλάκα και την επιλογή του χημικού υποστρώματος και του διαλύτη. Η επιλογή του διαλύτη είναι ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες καθώς χρησιμοποιείται στην απορρόφηση της ενέργειας της ακτίνας του laser και την αποφυγή της αποικοδόμησης του πολυμερούς (Lewis et al., 2000; Carbonnelle et al., 2011). Σε ό,τι αφορά τις συνθήκες ανάπτυξης των μικροοργανισμών, μελέτη έδειξε ότι ενώ το θρεπτικό υπόστρωμα δεν επηρεάζει την ποιότητα του φάσματος (Ferreira et al., 2010; Karger et al., 2013), η ηλικία της καλλιέργειας παίζει ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο. Κατά την καλλιέργεια των στελεχών *B. abortus* bv.1 (στέλεχος 544), *B. melitensis* bv.1 (στέλεχος 16M) και *B. suis* bv.1 (στέλεχος 1330) στις 24, 48, 72, 96, 120 και 144 ώρες καλλιέργειας, παρατηρήθηκαν σημαντικές μεταβολές στις εντάσεις των λαμβανόμενων κορυφών (Karger et al., 2013). Επιπλέον, η παρουσία ξένων προσμίξεων ή υψηλών συγκεντρώσεων πρωτεϊνών στο προς ανάλυση δείγμα (όπως αιμοσφαιρίνη στο αίμα), μειώνει την ευαισθησία της μεθόδου, καθώς τα ξένα συστατικά καταστέλλουν τον ιονισμό ή επηρεάζουν την απόκριση του φασματογράφου μαζών συμβάλλοντας σε απώλεια του αναλύτη-στόχου. Για το σκοπό αυτό, προτείνεται η απομόνωση και η καθαροποίηση του αναλύτη με ειδικά ρυθμιστικά διαλύματα, κατάλληλα για τη MALDI-TOF MS (Lewis et al., 2000; Dave et al., 2011).

Εξαιτίας της μεγάλης γενωμικής ομολογίας (>95%) που παρουσιάζουν τα είδη του γένους *Brucella* μεταξύ τους, η ταυτοποίηση των βρουκελλών σε επίπεδο γένους, είδους και βιότυπου αποτελεί μεγάλη πρόκληση (Karger et al., 2013). Μελέτη της Ferreira και των συνεργατών της (2010) έδειξε ότι με τη χρήση μίας βάσης δεδομένων που στηριζόταν σε πρωτεϊνικά φάσματα 12 στελεχών του γένους *Brucella*, η ταυτοποίηση των βρουκελλών σε ύποπτα κλινικά δείγματα με τη μέθοδο MALDI-TOF MS ήταν δυνατή μόνο σε επίπεδο γένους. Αντίθετα, το 2011 η Lista και οι συνεργάτες της ανέπτυξαν μία βάση δεδομένων με τα αποτελέσματα της ταυτοποίησης 152 στελεχών, αντιπροσωπευτικών για όλα τα είδη του γένους

Brucella. Τα στελέχη είχαν ταυτοποιηθεί με τη μέθοδο 16-MLVA. Στη συνέχεια, χρησιμοποιώντας τη βάση αυτή κατάφεραν να ταυτοποιήσουν όλα τα στελέχη με την τεχνική MALDI-TOF MS σε επίπεδο γένους και είδους και τα στελέχη της *Brucella suis* bv.1 και bv.2 σε επίπεδο βιότυπου. Η διαφορά των αποτελεσμάτων συγκριτικά με τη μελέτη της Ferreira και των συνεργατών της θεωρείται ότι βασίστηκε στην χρήση μεγαλύτερης και πιο ολοκληρωμένης βιβλιοθήκης φασμάτων (Lista et al., 2011). Το 2013 ο Karger και οι συνεργάτες του απέδειξαν ότι η χρήση της μεθόδου MALDI-TOF MS στην ταυτοποίηση των βρουκελλών σε επίπεδο γένους και είδους εμφανίζει υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα, με την προϋπόθεση να διατηρούνται σταθερές οι συνθήκες καλλιέργειας των βακτηρίων, να εφαρμόζονται τα ίδια πρωτόκολλα προκατεργασίας των δειγμάτων και να χρησιμοποιούνται βάσεις δεδομένων με φάσματα αναφοράς υψηλής ποιότητας (Karger et al., 2013). Το 2015 οι ερευνητές Sayour και Sayour κατάφεραν μέσω της ενίσχυσης της βιβλιοθήκης αναφοράς της Bruker Daltonics να ταυτοποιήσουν τις βρουκέλλες σε επίπεδο είδους με υψηλή ειδικότητα και ευαισθησία (score value > 2.300) καθώς και τα στελέχη *B. melitensis* bv. 3 σε ποσοστό 95,19%. Ωστόσο, τα υψηλά ποσοστά επιτυχίας που παρουσίασε η ταυτοποίηση αυτή αποδόθηκαν στο γεγονός ότι στη συγκεκριμένη βιβλιοθήκη δε συμπεριλαμβάνονταν στελέχη *B. melitensis* bv. 2. Ένα άλλο σημαντικό συμπέρασμα που προέκυψε από την κατασκευή του δενδρογράμματος, είναι ότι οι ομοιότητες στα πρωτεϊνικά προφίλ των στελεχών του γένους *Brucella* δεν ακολουθούν την ταξινόμηση με τις μεθόδους της κλασσικής μικροβιολογίας και ότι τα πρωτεϊνικά φάσματα κάποιων ειδών ή βιοτύπων μπορεί να είναι πιο κοντά σε άλλα είδη ή σε άλλους βιότυπους του ίδιου είδους, επιβεβαιώνοντας την υψηλή γενωμική ομολογία που επικρατεί μεταξύ των ειδών του γένους (Sayour & Sayour, 2015).

2.8. ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΒΡΟΥΚΕΛΛΩΣΗΣ

2.8.1. Αντιμετώπιση της νόσου στα μικρά μηρυκαστικά

Η αντιμετώπιση της νόσου στις αίγες και τα πρόβατα περιλαμβάνει την άμεση απομάκρυνση και σφαγή, ενώ σε περίπτωση που η μόλυνση υπερβαίνει το 50% των ζώων της εκτροφής μπορεί να εφαρμοσθεί η καθολική σφαγή. Τα βρουκελλικά ζώα σφάζονται χωριστά από τα υγιή λαμβάνοντας όλα τα μέτρα για την αποφυγή της διασποράς της μόλυνσης (ΥΠΑΑΤ, 2014).

2.8.2. Θεραπεία της νόσου στον άνθρωπο

Σε περίπτωση νόσησης του ανθρώπου συστήνεται η άμεση χορήγηση θεραπευτικής αγωγής, η οποία συνήθως περιλαμβάνει συνδυασμούς αντιβιοτικών και έχει παρατεταμένη διάρκεια ώστε να αποφευχθεί οποιαδήποτε υποτροπή της νόσου. Η εκλογή του κατάλληλου θεραπευτικού σχήματος και η διάρκεια της φαρμακευτικής αγωγής εξαρτώνται από την εντόπιση, τη μορφή και τη βαρύτητα της νόσου, τον ασθενή (ηλικία, εγκυμοσύνη, ηπατικά νοσήματα) και την ικανότητα του αντιβιοτικού να δρα ενδοκυττάρια (ΚΕΕΛΠΝΟ, 2012e). Τα θεραπευτικά σχήματα που προτείνονται σήμερα από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας στην αντιμετώπιση της βρουκέλλωσης στον άνθρωπο περιγράφονται αναλυτικά ανά περίπτωση στον Πίνακα 6 (WHO, 2006).

Πίνακας 6: Σχήματα για τη θεραπεία της βρουκέλλωσης στον άνθρωπο (WHO, 2006; ΚΕΕΛΠΝΟ 2012e).

Αντιβιοτικό Α	+ Αντιβιοτικό Β	Συνθήκες
Δοξυκυκλίνη 200 mg/ημέρα PO x 6 εβδομάδες	Στρεπτομυκίνη 1 g/ημέρα IM x 2-3 εβδομάδες ή Ριφαμπικίνη 600-900 mg/ημέρα PO x 6 εβδομάδες ή Γενταμυκίνη 5 mg/kg/ημέρα x 7-10 ημέρες	Θεραπεία οξείας βρουκέλλωσης σε ενήλικες και παιδιά > 8 ετών
---	Ριφαμπικίνη (x 45 ημέρες) ή Κοτριμοξαζόλη	Σε περιπτώσεις εγκυμοσύνης η προτεινόμενη θεραπεία έχει αβέβαια αποτελέσματα
Κοτριμοξαζόλη (2 x 8/40 mg/kg/ημέρα x 6 εβδομάδες)	Στρεπτομυκίνη 30mg/kg/ημέρα x 3 εβδομάδες ή Γενταμυκίνη 5mg/kg/ημέρα x 7-10 ημέρες ή Ριφαμπικίνη 15mg/kg/ημέρα	Σε παιδιά < 8 ετών η προτεινόμενη θεραπεία δεν έχει καθοριστεί οριστικά

2.9. ΠΡΟΛΗΨΗ ΒΡΟΥΚΕΛΛΩΣΗΣ

Η πρόληψη της νόσου βασίζεται πρωτίστως στην αποφυγή της έκθεσης του ανθρώπου στον μολυσματικό παράγοντα και δευτερευόντως στον έλεγχο της νόσου στα ζώα.

Η αποφυγή της έκθεσης του ανθρώπου στη βρουκέλλωση περιλαμβάνει μέτρα όπως:

- Αγωγή υγείας μέσω συναντήσεων με τις τοπικές αρχές και τους κατοίκους περιοχών ώστε να ενημερωθούν για την αποφυγή των παραγόντων κινδύνου της νόσου και να εκπαιδευτούν σε θέματα δημόσιας υγείας
- ορθή εφαρμογή των προγραμμάτων επιδημιολογικής επιτήρησης και καταγραφής των κρουσμάτων βρουκέλλωσης
- ανίχνευση και προστασία των ζωνών ελεύθερων βρουκέλλωσης με ειδικά προγράμματα μηχανογραφημένης χαρτογράφησης που επιτρέπουν τη μελέτη του νοσήματος στο χώρο και το χρόνο (Χατζηχριστοδούλου, 1997)
- συντονισμό των υπηρεσιών υγείας και των κτηνιατρικών υπηρεσιών με στόχο τον έλεγχο των εστιών στο ζωικό πληθυσμό και την υλοποίηση προγραμμάτων αγωγής υγείας για την αποφυγή της μετάδοσης της νόσου στον άνθρωπο (ΚΕΕΛΠΝΟ, 2012a)
- προσωπική υγιεινή των επαγγελματιών κατά την επαφή με μολυσμένα ζώα ή μολυσματικά υλικά μέσω της χρήσης προστατευτικών μέσων (γάντια, μάσκες, γυαλιά, ολόσωμες φόρμες και μπότες) (ΥΠΑΑΤ, 2014)
- διενέργεια τακτικών ορολογικών ελέγχων σε άτομα που εκτίθενται στον αιτιολογικό παράγοντα (οι έγκυες και τα άτομα < 18 ετών πρέπει να εξαιρούνται από οποιαδήποτε έκθεση στον μικροοργανισμό) και άμεση χορήγηση αντιβιοτικής θεραπείας σε περίπτωση μόλυνσης (WHO, 2006)
- εφαρμογή υγειονομικών μέτρων στις εκτροφές (άμεση απομάκρυνση μολυσματικών εκκρίσεων και ιστών, συχνή αποκομιδή κόπρου και αλλαγή στρωμνής, απολυμάνσεις εγκαταστάσεων, εργαλείων, οχημάτων και εξοπλισμού, εφαρμογή προγραμμάτων μυοκτονίας/απεντόμωσης)
- εφαρμογή υγειονομικών μέτρων στα σφαγεία (σφαγή των θετικών/ύποπτων ζώων μετά το πέρας της καθημερινής προγραμματισμένης εργασίας,

καταστροφή των μολυσματικών υλικών και διενέργεια τακτικών απολυμάνσεων) (Pérez-Sancho et al., 2015)

- σε επίπεδο εργαστηρίου, ο χειρισμός των ύποπτων δειγμάτων επιβάλλεται να πραγματοποιείται σε θαλάμους νηματικής ροής τάξης III (Roy et al., 2011)
- παστερίωση του γάλακτος και παραγωγή γαλακτοκομικών προϊόντων από παστεριωμένο γάλα. Το μαλακό τυρί (φέτα), που δεν παρασκευάζεται από παστεριωμένο γάλα, θα πρέπει να υφίσταται ωρίμανση για διάστημα τουλάχιστον 3 μηνών - ιδανικότερα 6 μηνών-, ώστε το pH του να μειωθεί στο 4,5. Ο κίνδυνος είναι μικρότερος στα σκληρά τυριά, το μανούρι, το ανθότυρο και τη μυζήθρα επειδή η διαδικασία παρασκευής τους είναι διαφορετική
- επαρκής θερμική επεξεργασία του κρέατος. Αντίθετα, οι μέθοδοι της κάπνισης, ξήρασης, αλάτισης και κατάψυξης δεν εξυγιαίνουν το κρέας αφού δεν καταστρέφουν τις βρουκέλλες (WHO, 2006)
- πραγματοποίηση εμβολιασμών. Σε ενδημικές περιοχές, όπως η Ελλάδα, ο μαζικός εμβολιασμός του πληθυσμού θα μπορούσε να αποτελέσει ένα προληπτικό μέτρο πρώτης γραμμής έως ότου αποδώσουν τα προγράμματα πρόληψης και εκρίζωσης της νόσου στα ζώα. Εδώ και αρκετές δεκαετίες έχουν γίνει προσπάθειες παραγωγής ενός ασφαλούς εμβολίου το οποίο θα προσφέρει ικανοποιητική και μακροχρόνια ανοσία στον άνθρωπο. Στο παρελθόν έχουν χρησιμοποιηθεί εμβόλια με ζωντανούς μικροοργανισμούς ελαττωμένης λοιμογόνου δύναμης, όπως τα *B. abortus* 19-BA, *B. abortus* 104 M, *B. melitensis* M15 και BCV, τα οποία είτε εμφάνισαν περιορισμένη δραστηριότητα είτε οδήγησαν σε σοβαρές αλλεργικές αντιδράσεις ή και την ίδια τη νόσο (Perkins et al., 2010). Άλλα εμβόλια που δοκιμάστηκαν, βασίστηκαν στη χρήση αδιάλυτων στη φαινόλη συστατικών των στελεχών *B. abortus* και *B. melitensis* (fraction PI), τα οποία έδωσαν ικανοποιητικά αποτελέσματα ανοσίας με μικρό ποσοστό παρενεργειών (Hadjichristodoulou et al., 1994). Τα τελευταία χρόνια η παρασκευή εμβολίων κατά της βρουκέλλωσης έχει προσανατολιστεί στη μοριακή βιολογία και την πρωτεωμική. Ωστόσο, παρά τις όποιες ενέργειες, σήμερα εξακολουθεί να μην υπάρχει αποδεκτό εμβόλιο για τον άνθρωπο. (Hashemi Tabar & Jafari, 2014).

Η βρουκέλλωση στην Ελλάδα είναι κατά βάση επαγγελματικό και τροφιμογενές νόσημα. Για την εξάλειψη της νόσου στον άνθρωπο κρίνεται απαραίτητη η εξάλειψη ή ο έλεγχος της νόσου στα ζώα. Ο πιο αποτελεσματικός τρόπος εκρίζωσης της νόσου στα ζώα είναι μέσω του προσδιορισμού των μολυσμένων εκτροφών και της σφαγής όλων των ζώων που τις συγκροτούν. Το γεγονός αυτό προϋποθέτει την ύπαρξη καλά οργανωμένων κτηνιατρικών υπηρεσιών με επαρκές ανθρώπινο δυναμικό, αξιόπιστο σύστημα ταυτοποίησης του ζωικού πληθυσμού, απόλυτο έλεγχο στις μετακινήσεις των ζώων και ένα δίκτυο διαπιστευμένων εργαστηρίων για τη διενέργεια των απαραίτητων εξετάσεων. Ωστόσο, λόγω του αυξημένου οικονομικού κόστους, ο τρόπος αυτός δε μπορεί να εφαρμοστεί σε ευρεία κλίμακα, αλλά μόνο σε περιοχές με χαμηλό επιπολασμό. Για το λόγο αυτό, όταν ο επιπολασμός υπερβαίνει το 2%, η αντιμετώπιση της νόσου στα ζώα στηρίζεται αρχικά στον εμβολιασμό ώστε να επιτευχθεί η μείωση του επιπολασμού σε επιτρεπτά όρια για να καταστεί οικονομικά εφαρμόσιμο ένα πιο εκτεταμένο πρόγραμμα εκρίζωσης της νόσου, το οποίο θα περιλαμβάνει και τη λήψη των απαραίτητων υγειονομικών μέτρων (ΥΠΑΑΤ, 2014).

Σήμερα, το πρόγραμμα ελέγχου και εκρίζωσης της βρουκέλλωσης των αιγών και των προβάτων στην Ελλάδα, όπως περιγράφεται αναλυτικά στην Υπουργική Απόφαση με αριθμό 3339/117339, ΦΕΚ 3589Β'04-11-2016, στη ζώνη εμβολιασμού (ZEM) (ηπειρωτική Ελλάδα, Εύβοια, Λέσβος και Θάσος) περιλαμβάνει την εφαρμογή υποχρεωτικών εμβολιασμών των αμνών και εριφίων ηλικίας άνω των τριών μηνών που διατηρούνται για αναπαραγωγή, των θηλυκών ενήλικων αιγοπροβάτων που δεν κυοφορούν και των αρσενικών ηλικίας 3-6 μηνών. Ταυτόχρονα πραγματοποιείται αιμοληψία στα ανεμβολίαστα αρσενικά άνω των 6 μηνών καθώς και στα αρσενικά που είχαν εμβολιαστεί σε ηλικία 3-6 μηνών και έχουν παρέλθει τουλάχιστον 12 μήνες από τον εμβολιασμό τους. Σε περίπτωση κρούσματος σε άνθρωπο που συνδέεται με συγκεκριμένη εκμετάλλευση αιγοπροβάτων και επιβεβαιώνεται από το ΚΕΕΛΠΝΟ ή θετικού αποτελέσματος κατά τη διερεύνηση μαζικών αποβολών σε ζώα που δεν είχαν εμβολιαστεί ή θετικού αποτελέσματος από αιμοδείγματα αρσενικών ζώων για δεύτερη συνεχόμενη χρονιά ή σε ποσοστό μεγαλύτερο του 80% του συνόλου των αιμοδειγμάτων, πραγματοποιείται εμβολιασμός όλων των ανεμβολίαστων και αρνητικών στη νόσο θηλυκών με παράλληλη αιμοληψία σε όλα τα θηλυκά

ανεμβολίαστα ζώα καθώς και σε εκείνα που είχαν εμβολιαστεί αλλά έχουν παρέλθει πάνω από 12 μήνες από τον εμβολιασμό τους. Το γάλα από τα θετικά ζώα απαγορεύεται να δοθεί για ανθρώπινη κατανάλωση, ενώ απαγορεύεται και η μετακίνηση της εκμετάλλευσης έως ότου σφαγούν όλα τα θετικά ζώα. Στη ζώνη εκρίζωσης (ZEK), η οποία περιλαμβάνει τη νησιωτική Ελλάδα εκτός από τα νησιά που προαναφέρθηκαν, απαγορεύεται ο εμβολιασμός κατά της βρουκέλλωσης των αιγοπροβάτων, ενώ πραγματοποιείται μόνο ορολογικός έλεγχος των ζώων ηλικίας άνω των έξι μηνών σε όλες τις εκτροφές, με τις δοκιμές Rose Bengal, σύνδεσης του συμπληρώματος ή κάθε άλλη εγκεκριμένη δοκιμή από την Ε.Ε. (ΥΠΑΑΤ, 2017).

Το πρόγραμμα αντιμετώπισης της νόσου, όπως εφαρμόζεται σήμερα, παρουσιάζεται σχηματικά στην Εικόνα 5 (ΚΕΕΛΠΝΟ, 2012b).



Εικόνα 5: Σχηματική απεικόνιση του προγράμματος αντιμετώπισης της βρουκέλλωσης στην Ελλάδα. (ΚΕΕΛΠΝΟ, 2012b).

Το εμβόλιο που χρησιμοποιείται ευρέως στα μικρά μηρυκαστικά είναι το Rev-1, ένα ελαττωμένης λοιμογόνου δύναμης εμβολιακό στέλεχος της *B. melitensis*. Το εμβόλιο χορηγείται στα ζώα με ενστάλαξη στον επιπεφυκτικό σάκο και προσφέρει ικανοποιητικού βαθμού ανοσία. Ωστόσο, σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες (Banai et al., 1996; Bardenstein et al., 2002; Noutsios et al., 2012) φαίνεται να παρουσιάζει αρκετά μειονεκτήματα με πιο σημαντικά την πρόκληση νόσου στον άνθρωπο, την οριζόντια μετάδοση μεταξύ των ζώων, την αποβολή μέσω του γάλακτος και των εκκρίσεων του ζώου και την αδυναμία διάκρισής του από τα φυσικά στελέχη με τις συνήθεις ορολογικές εξετάσεις.

2.10. ΣΚΟΠΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Η μέθοδος MALDI-TOF MS, αν και χρησιμοποιείται εδώ και αρκετές δεκαετίες στον τομέα της κλινικής μικροβιολογίας, μόλις πρόσφατα άρχισε να εφαρμόζεται στη μελέτη της βρουκέλλωσης. Παρόλα αυτά, στις λίγες έρευνες που έχουν μέχρι σήμερα δημοσιευτεί, έχει παρατηρηθεί ότι η ταυτοποίηση των βρουκελλών είναι εξαιρετικά δύσκολη λόγω της υψηλής γενωμικής ομοιότητας που παρουσιάζουν, ενώ παράλληλα υπάρχει ανάγκη προτυποποίησης της μεθόδου λόγω της χαμηλής αναπαραγωγιμότητας που εμφανίζει. Επιπλέον, παρά το γεγονός ότι η διενέργεια εμβολιασμών με το στέλεχος Rev-1 δυσχεραίνει τη διάγνωση και κατ'επέκταση την αντιμετώπιση της νόσου τόσο στα ζώα όσο και στον άνθρωπο, καμία μελέτη γνωστή σε εμάς δεν έχει αξιολογήσει τη μέθοδο MALDI-TOF MS ως προς τη δυνατότητά της να διακρίνει την εμβολιακή από τη φυσική μόλυνση.

Λαμβάνοντας υπόψη, λοιπόν, την ικανότητα της αναλυτικής τεχνικής MALDI-TOF MS να ταυτοποιεί μικροοργανισμούς με υψηλή ακρίβεια, χαμηλό κόστος και σε ελάχιστο χρόνο περιορίζοντας παράλληλα την έκθεση του προσωπικού στον παθογόνο παράγοντα, αποφασίστηκε η εκπόνηση της παρούσας διδακτορικής διατριβής με τίτλο «Αναζήτηση της δυνατότητας αξιοποίησης της αναλυτικής μεθόδου MALDI-TOF MS στην τυποποίηση στελεχών *B. melitensis* σε δείγματα ανθρώπων, αιγών, προβάτων και γάλακτος».

Αναλυτικά, οι επιμέρους στόχοι της μελέτης ήταν:

- α) η κατασκευή και η επικύρωση μιας βιβλιοθήκης αναφοράς για την ταυτοποίηση των βρουκελλών σε επίπεδο είδους,
- β) ο προσδιορισμός αξιόπιστων κορυφών – βιοδεικτών για την αναζήτηση της δυνατότητας διαχωρισμού των τριών βιότυπων της *B. melitensis* και
- γ) ο προσδιορισμός αξιόπιστων κορυφών - βιοδεικτών για την αναζήτηση της δυνατότητας διάκρισης των εμβολιακών στελεχών Rev-1 από τα φυσικά μολυσματικά στελέχη *B. melitensis*.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1. ΣΤΕΛΕΧΗ ΜΕΛΕΤΗΣ

Για τις ανάγκες της παρούσας διατριβής μελετήθηκαν συνολικά 75 στελέχη βρουκελλών, τα οποία προέρχονταν από αίγες, πρόβατα, βοοειδή και κλινικά ασθενείς ανθρώπους. Τα 72 από τα 75 στελέχη συγκεντρώθηκαν μετά από παραχώρησή τους από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου της Κρήτης, την Κτηνιατρική Σχολή του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης και το Κέντρο Κτηνιατρικών Ιδρυμάτων Θεσσαλονίκης, ενώ τα υπόλοιπα τρία απομονώθηκαν στο Ινστιτούτο Κτηνιατρικών Ερευνών (ΙΚΕ)– ΕΛΓΟ «ΔΗΜΗΤΡΑ» κατά τη διερεύνηση αποβολών σε εκτροφές μικρών και μεγάλων μηρυκαστικών.

Σύμφωνα με τα επιδημιολογικά στοιχεία που συγκεντρώθηκαν, τα βακτήρια απομονώθηκαν κατά το χρονικό διάστημα 1999-2018 σε τέσσερα γεωγραφικά διαμερίσματα της χώρας μας. Πιο συγκεκριμένα, 43 στελέχη απομονώθηκαν στην Περιφέρεια Κρήτης, 16 στελέχη στην Περιφέρεια Κεντρικής Μακεδονίας, 15 στελέχη στην Περιφέρεια Θεσσαλίας και ένα στέλεχος στην Περιφέρεια Ηπείρου. Η απομόνωση των βακτηρίων, η οποία έγινε στα πλαίσια των επίσημων ελέγχων και επιδημιολογικής επιτήρησης της βρουκέλλωσης, πραγματοποιήθηκε στον άνθρωπο από το αίμα των ασθενών και στα μηρυκαστικά από το στομαχικό περιεχόμενο των αποβληθέντων εμβρύων, το γάλα, τον σπλήνα, το ήπαρ και τα λεμφογάγγλια. Από το σύνολο των στελεχών, τα 32 απομονώθηκαν από τα ζώα ενώ τα 43 από τους ανθρώπους. Τα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν στο πλαίσιο της παρούσας μελέτης παρουσιάζονται συνοπτικά στον Πίνακα 7 που ακολουθεί.

Πίνακας 7: Επιδημιολογικά δεδομένα των στελεχών που χρησιμοποιήθηκαν στο πλαίσιο της μελέτης.

Στελέχη	Είδος	Υλικό Απομόνωσης	Περιοχή Απομόνωσης
43	Άνθρωπος	Αίμα	Περιφέρεια Κρήτης
16	Αίγα/Πρόβατο	Ήπαρ/ Σπλήνας/ Έμβρυο/ Λεμφογάγγλια/Γάλα	Περιφέρεια Κεντρικής Μακεδονίας
15	Αίγα/Πρόβατο	Ήπαρ/ Σπλήνας/ Έμβρυο/ Λεμφογάγγλια/Γάλα	Περιφέρεια Θεσσαλίας
1	Μόσχος	Έμβρυο	Περιφέρεια Ηπείρου

3.2. ΠΡΟΤΥΠΑ ΣΤΕΛΕΧΗ

Τα πρότυπα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη είναι τα ακόλουθα:

- Δύο στελέχη *B. melitensis* (GenBank accession numbers: MK 142733.1 και MK 142739.1), τρία στελέχη *B. abortus* και ένα στέλεχος *B. suis* (GenBank accession number: MK 141059.1), τα οποία χορηγήθηκαν από το Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise Giuseppe Caporale (Τέραμο, Ιταλία). Τα στελέχη χρησιμοποιήθηκαν στην ανάπτυξη της μοριακής τεχνικής multiplex PCR και την κατασκευή της βιβλιοθήκης αναφοράς της μεθόδου MALDI-TOF MS, αφού προηγουμένως υποβλήθηκαν σε PCR για την εκλεκτική ενίσχυση του γονιδίου 16S rRNA για φυλογενετική ανάλυση.
- τα εμβολιακά στελέχη *B. abortus* S19 και RB51, τα οποία παραχωρήθηκαν από το Εργαστήριο Μικροβιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών και χρησιμοποιήθηκαν στην κατασκευή της βιβλιοθήκης αναφοράς της MALDI-TOF MS.
- τα πρότυπα στελέχη *B. onis* (63/290, ATCC 25840) και *B. abortus* βιότυπος 1 (544, ATCC 23448), των οποίων η προμήθεια έγινε από Τράπεζα Καλλιεργειών του Εξωτερικού (National Collection of Type Cultures, Public Health of England, Salisbury, UK).
- τρία εμβολιακά στελέχη *B. melitensis* Rev-1 (Αριθμοί παρτίδων: 163881 (Animal Health Care PROVET, Athens, Greece), 181118 και 181119 (CZ Veterinaria; Porriño, Spain), τα οποία χορηγήθηκαν από τη Γενική Διεύθυνση Κτηνιατρικής του Υπουργείου Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων, για να χρησιμοποιηθούν στη διάκριση των φυσικά μολυσματικών στελεχών *B. melitensis* από το εμβολιακό στέλεχος Rev-1 με τις μεθόδους PCR-RFLP και MALDI-TOF MS.

3.3. ΑΝΑΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ & ΕΛΕΓΧΟΣ ΚΑΘΑΡΟΤΗΤΑΣ ΣΤΕΛΕΧΩΝ

Μετά τη συγκέντρωση των στελεχών ακολούθησε η ανακαλλιέργειά τους σε εκλεκτικό υπόστρωμα Farrell για τη διερεύνηση τυχόν επιμολύνσεων. Για το υπόστρωμα Farrell αρχικά προετοιμάστηκε το Modified *Brucella* Selective Supplement κάτω από άσηπτες συνθήκες. Για το σκοπό αυτό, αναμίχθηκε το περιεχόμενο του φιαλιδίου του OXOID™ Modified *Brucella* Selective Supplement (OXOID Ltd., Basingstoke, UK, <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/SR0209E>) με 10 ml μεθανόλης (Methanol analytical grade, ACS, Reag. Ph Eur, Scharlau, Spain) και αποστειρωμένου απεσταγμένου νερού σε αναλογία 1:1.

Κάθε φιαλίδιο Modified *Brucella* Selective Supplement περιελάμβανε:

- 2.500 IU πολυμυξίνη Β
- 12.500 IU βακιτρακίνη
- 25,0 mg ναταμυκίνη
- 2,5 mg ναλιδιζικό οξύ
- 50.000 IU νυστατίνη
- 10,0 mg βανκομυκίνη

Στη συνέχεια, το περιεχόμενο του φιαλιδίου προστέθηκε σε 500 ml στερεού θρεπτικού υποστρώματος θερμοκρασίας 50°C, στο οποίο είχαν ήδη προστεθεί 5-10% ορός ίππου (Donor Horse Serum, Sigma Aldrich, Switzerland) και 1-5% διάλυμα δεξτρώζης 25% (Dextrosa, Laboratorios CONDA, Madrid, Spain).

Το στερεό θρεπτικό υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή του Farrell ήταν το *Brucella* Medium Base (Oxoid Ltd., Basingstoke, UK), το οποίο παρασκευάστηκε σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Η επώαση των στελεχών στα υποστρώματα Farrell πραγματοποιήθηκε στους 37°C για διάστημα 96 ωρών. Στη συνέχεια, ακολούθησε η ανακαλλιέργειά τους σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα. Πιο συγκεκριμένα, από κάθε στέλεχος μεταφέρθηκαν με τη χρήση μικροβιολογικού κρίκου τα κύτταρα μιας αποικίας σε Tryptone Soya Broth (Oxoid Ltd., Basingstoke, UK) όπου παρέμεναν για επώαση στους 37°C για διάστημα

96 ωρών. Μετά την ανάπτυξη των στελεχών, η οποία εκτιμήθηκε με τη θόλωση του υποστρώματος, 500 μl από κάθε ζωμό μεταφέρθηκαν σε αποστειρωμένα φιαλίδια πολυπροπυλενίου 1,5 ml (Axygen Microcentrifuge tubes, Corning Life Sciences, Tewksbury, MA, USA) και αναμίχθηκαν με ίση ποσότητα γλυκερόλης 30% (Merck KGaA, Darmstadt, Germany). Μετά την ανακαλλιέργεια, ακολούθησε η συντήρηση των στελεχών σε συνθήκες βαθιάς κατάψυξης (-80°C).

Όλη η διαδικασία ανακαλλιέργειας των στελεχών και ελέγχου καθαρότητας για επιμολύνσεις πραγματοποιήθηκε σε θάλαμο υψίστης ασφαλείας (P3) του Ινστιτούτου Κτηνιατρικών Ερευνών (IKE)– ΕΛΓΟ «ΔΗΜΗΤΡΑ».

3.4. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΓΕΝΩΜΙΚΟΥ DNA (gDNA)

Για την απομόνωση του gDNA των στελεχών, από την κάθε καλλιέργεια συντήρησης μεταφέρθηκαν κύτταρα υπό άσηπτες συνθήκες σε 3-4 ml υγρού θρεπτικού υποστρώματος Tryptone Soya Broth (Oxoid Ltd., Basingstoke, UK), στο οποίο είχαν προστεθεί 5-10% ορός ίππου, 1-5% διάλυμα δεξτρόζης 25% και OXOID™ Modified *Brucella* Selective Supplement. Ακολούθησε επώαση για 4-5 ημέρες στους 37°C σε αερόβιες και μικροαερόφιλες συνθήκες και στη συνέχεια απομονώθηκε το gDNA του κάθε στελέχους σύμφωνα με το πρωτόκολλο απομόνωσης του PureLink Genomic DNA mini kit (Thermo Fisher Scientific, Invitrogen, Carlsbad, USA) για τα Gram αρνητικά βακτήρια.

Ενδεικτικά, 3-4 ml κάθε καλλιέργειας μεταφέρθηκαν σε φιαλίδιο πολυπροπυλενίου 15 ml για φυγοκέντρηση στα 1.400g για δέκα λεπτά στους 4°C. Μετά την απομάκρυνση του υπερκείμενου στρώματος, προστέθηκαν στο ίζημα 200-300 μl νερό δις αποσταγμένο και αποστειρωμένο (water for injection-w.f.i.) και ακολούθησε επώαση σε υδατόλουτρο στους 70°C για δύο ώρες. Στη συνέχεια, το διάλυμα φυγοκεντρήθηκε στα 10.000g για ένα λεπτό για να απομακρυνθεί το υπερκείμενο, και στο ίζημα προστέθηκαν 180 μl PureLink™ Genomic Digestion Buffer και 20 μl Proteinase K. Ακολούθησε επώαση των φιαλιδίων στους 55°C για περίπου δύο ώρες με ανάδευση ανά τακτά χρονικά διαστήματα μέχρι να επέλθει πλήρης λύση των κυττάρων. Μετά την επώαση, στο διάλυμα προστέθηκαν 20 μl RNase A, 200 μl PureLink™ Genomic Lysis/Binding Buffer και 200 μl 96-100% αιθανόλης και ακολούθησε μεταφορά του διαλύματος σε ειδική στήλη (PureLink™ Spin Column)

και φυγοκέντρησή του στα 10.000g για ένα λεπτό σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Οι πλύσεις των στηλών πραγματοποιήθηκαν με Wash Buffer 1 και Wash Buffer 2 του PureLink Genomic DNA mini kit και φυγοκέντρωση στα 10.000g για ένα και τρία λεπτά αντίστοιχα. Μετά τις πλύσεις, κάθε στήλη μεταφέρθηκε σε αποστειρωμένο φιαλίδιο πολυπροπυλενίου 1,7 ή 1,5 ml για τη διενέργεια έκλουσης με 80 μl PureLink™ Genomic Elution Buffer και φυγοκέντρωσης στα 10.000g για ένα λεπτό σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Μέσω της διαδικασίας της έκλουσης το γενωμικό DNA συγκεντρώνονταν στο φιαλίδιο πολυπροπυλενίου, το οποίο μεταφέρονταν για συντήρηση στους -20°C.

Ακολούθησε ο έλεγχος εξαγωγής του gDNA κάθε στελέχους σε πηκτή αγαρόζης 0,7% σε διάλυμα TBE 0,5X.

3.5. ΜΟΡΙΑΚΗ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΣΤΕΛΕΧΩΝ

3.5.1. Ανάπτυξη Multiplex PCR για ταυτοποίηση στελεχών σε επίπεδο γένους και είδους

Για την ανάπτυξη της multiplex PCR δοκιμάστηκαν διάφορα ειδικά ζεύγη εκκινητών (Scholz et al., 2008c; Koichi et al., 2007), σε πρωτόκολλα standard, duplex και triplex PCR προκειμένου να οριστικοποιηθεί το τελικό πρωτόκολλο ταυτοποίησης των βρουκελλών. Οι εκκινητές που μελετήθηκαν αναφέρονται αναλυτικά στον Πίνακα 8 που ακολουθεί.

Πίνακας 8: Χαρακτηριστικά εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην ανάπτυξη της μεθόδου multiplex PCR.

Εκκινητής	Αλληλουχία νουκλεοτιδίων γονιδίου (5'-3' κατεύθυνση)	Γονίδιο Στόχος	Προϊόν Ενίσχυσης (bp)
Bruc-F	5'-AACCACGCTTGCCTTGCACACC-3'	<i>recA</i>	167
Bruc-R	5'-TTTCAAGCGCCTGTTACCCCG -3'		
B4	5'-TGGCTCGGTTGCCAATATCAA-3'	<i>bcs31</i>	223
B5	5'-CGCGCTTGCCTTTCAGGTCTG-3'		
JPF-F	5'-GCGCTCAGGCTGCCGACGCAA-3'	<i>omp2</i>	186
JPF-abR	5'-CATTGCGGTTCGGTACCGGAG-3'		
1S-F	5'-GTTCGCTCGACGTAACAGCTG-3'	<i>omp31</i>	249
1AS-R	5'-GACCGCCGGTACCATAAACCA-3'		

Το πρωτόκολλο ταυτοποίησης περιλάμβανε δύο duplex PCRs από τις οποίες η πρώτη με τη βοήθεια των εκκινητών B4/B5-BrucR/F συνέβαλε στην ταυτοποίηση των βρουκελλών σε επίπεδο γένους, ενώ η δεύτερη με τη βοήθεια των εκκινητών JPF-F/JPF-abRand 1S(F)/1AS(R), συνέβαλε στην ταυτοποίηση των βρουκελλών σε επίπεδο είδους (*Brucella melitensis*, *Brucella abortus*, *Brucella suis*, *Brucella ovnis* και *Brucella canis*). Το μίγμα της αντίδρασης έγινε με KAPA 2G multiplex PCR kit, είχε τελικό όγκο 10 μl και περιείχε 1x mix, 300 nM από κάθε εκκινητή και 50-70 ng γενωμικό DNA. Πραγματοποιήθηκαν 30 κύκλοι ενίσχυσης σε 2720 Thermal Cycler (AB Applied Biosystems, Singapore) ως εξής: αρχική αποδιάταξη σε θερμοκρασία 95°C για 3 λεπτά και 30 κύκλοι σε θερμοκρασία 95°C για 15 δευτερόλεπτα (αποδιάταξη), θερμοκρασία 60°C για 30 δευτερόλεπτα (υβριδισμός) και 72°C για 20 δευτερόλεπτα (επέκταση) και τελική επέκταση σε θερμοκρασία 72°C για 3 λεπτά. Τα προϊόντα ενίσχυσης της PCR αναλύθηκαν με οριζόντια ηλεκτροφόρηση (Συσκευή ηλεκτροφόρησης BIORAD, California, USA) σε 1,5% πηκτική αгарόζης (UltraPure™ Agarose, Invitrogen, Life Technologies, USA), που περιείχε 1,3 μg/ml βρωμιούχο αιθίδιο, για μισή ώρα στα 100 V και στα 60 mA. Ως ρυθμιστικό διάλυμα χρησιμοποιήθηκε το TBE 0,5X [(Tris ultrapure (AppliChem, Darmstadt, Germany), Boric acid Molecular biology (AppliChem, Darmstadt, Germany) και UltraPure™ EDTA (Invitrogen, Carlsbad, USA)]. Η φωτογράφιση των ηλεκτροφορημάτων έγινε σε λάμπα υπεριώδους φωτός με φωτογραφική μηχανή Kodak EDAS 290 (Eastman Kodak Company, Molecular Imaging Systems, Rochester, NY).

Η επικύρωση του πρωτοκόλλου της αναλυτικής μεθόδου multiplex PCR βασίστηκε στον έλεγχο της ειδικότητας και της ευαισθησίας. Για τον έλεγχο της αναλυτικής ειδικότητας χρησιμοποιήθηκαν τα gDNA των στελεχών *B. melitensis* MK 142733.1, *B. ovnis* 63/290 και *B. abortus* 544, ενός στελέχους *B. canis*, το οποίο χορηγήθηκε από το Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise Giuseppe Caporale (Τέραμο, Ιταλία), καθώς και πέντε παθογόνων μικροοργανισμών (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus megaterium*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri* και *Escherichia coli* 8879), τα οποία διατέθηκαν από το Τμήμα Βιολογίας του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης. Ο έλεγχος της αναλυτικής ευαισθησίας διενεργήθηκε με διαδοχικές αραιώσεις (1:2, 1:5, 1:10, 1:20, 1:50, 1:100

και 1:500) του gDNA του στελεχούς *B. melitensis* MK 142733.1 μέχρι τη λήψη συγκέντρωσης 0,1 ng, ενώ ο έλεγχος της επαναληψιμότητας έγινε με την επανάληψη του πειράματος για δεύτερη φορά.

3.5.2. Ταυτοποίηση στελεχών με Real-Time PCR

Μετά την ταυτοποίηση των στελεχών με τη multiplex PCR, ακολούθησε η ταυτοποίησή τους σε επίπεδο γένους και είδους με διπλή Real-Time PCR, όπως περιγράφεται στο πρωτόκολλο των Hinić και των συνεργατών του (2008), για την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων. Η διπλή Real-Time PCR συνίσταται σε δύο αναλύσεις από τις οποίες η πρώτη γίνεται για την ανίχνευση *Brucella spp.* και *B. melitensis* και η δεύτερη για την ανίχνευση *Brucella spp.* και *B. abortus*.

Η ταυτοποίηση βασίστηκε σε διπλή Real-Time PCR, η οποία πραγματοποιήθηκε σε Chromo4™ Real Time Detector (BIO-RAD, California, USA) σε 45 κύκλους με 95°C για 3 λεπτά (αρχική αποδιάταξη), 95°C για 15 δευτερόλεπτα (αποδιάταξη) και 60°C για 30 δευτερόλεπτα (υβριδισμός/επέκταση). Το μίγμα της αντίδρασης είχε τελικό όγκο 25 µl και περιείχε 12.5 µl (1X) Platinum Quantitative qPCR Supermix-UDG (Thermo Fisher Scientific, Invitrogen, Carlsbad, USA), 300 nM από κάθε εκκινητή, 250 nM από κάθε ανιχνευτή και 60-80 ng γενωμικό DNA. Οι εκκινητές και ανιχνευτές που χρησιμοποιήθηκαν για την ταυτοποίηση των στελεχών σε επίπεδο γένους και είδους παρουσιάζονται στον Πίνακα 9.

Πίνακας 9: Χαρακτηριστικά εκκινητών της μεθόδου Real-Time PCR.

PCR	Γονίδιο στόχος	Forward primer/reverse primer (5'→3')	Probe (5'Fluorophore→3'Quencher)
1	IS711	GCTTGAAGCTTGCGGACAGT / GGCCTACCGCTGCGAAT	Cy5-AAGCCAACACCCGGCCATTATGG-BHQ2
2	BMEΠ0466	TCGCATCGGCAGTTTCAA / CCAGCTTTTGGCCTTTTCC	VIC-CCTCGGCATGGCCCGCAA-BHQ1
3	BruAb2_0168	GCACACTCACCTTCCACAACAA / CCCCGTCTGCACCAGACT	FAM-TGGAACGACCTTTGCAGGCGAGATC-BHQ1

3.6. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΜΕ ΤΙΣ ΜΕΘΟΔΟΥΣ ΤΗΣ ΚΛΑΣΣΙΚΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

Η ταυτοποίηση των 75 στελεχών με τις μεθόδους της κλασσικής μικροβιολογίας για τη διάκριση σε επίπεδο βιότυπου βασίστηκε σε τέσσερα χαρακτηριστικά: α) στην ανάπτυξη παρουσία CO₂, β) στην ανάπτυξη παρουσία των χρωστικών βασικής φουξίνης και θειονίνης, γ) στην παραγωγή υδρόθειου και δ) την συγκόλληση με τους μονοειδικούς αντιορούς A και M (Alton et al., 1975).

Όλες οι δοκιμές πραγματοποιήθηκαν σε θάλαμο υψίστης ασφαλείας (P3) του ΙΚΕ – ΕΛΓΟ «ΔΗΜΗΤΡΑ».

3.6.1. Ανάπτυξη παρουσία CO₂

Η πρώτη δοκιμή που αξιολογήθηκε ήταν η ανάπτυξη των καλλιεργείων παρουσία CO₂, ώστε να διαπιστωθεί εάν στις επόμενες δοκιμές θα ήταν απαραίτητη η παρουσία του. Για κάθε στέλεχος, κύτταρα μεταφέρθηκαν από την καλλιέργεια συντήρησης σε δύο τρυβλία Tryptic Soy Agar (TSA), από τα οποία το ένα παρέμεινε για επώαση στους 37°C σε αερόβιες συνθήκες, ενώ το άλλο επώαστηκε στους 37°C σε περιβάλλον 5-10% CO₂. Η παραγωγή του CO₂ επιτεύχθηκε με τη χρήση συσκευής ανάπτυξης αναερόβιων καλλιεργείων (AnaeroJarTM AG0025A, OXOID, UK) στην οποία είχε τοποθετηθεί ειδικός καταλύτης για τη δημιουργία συνθηκών αναεροβίωσης AnaeroGenTM2.5L (ThermoScientific, Oxoid Ltd., Basingstoke, Hants). Σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, στις 2,5 ώρες επώασης η συγκέντρωση του οξυγόνου ήταν κάτω από 0,1% ενώ τα επίπεδα του CO₂ ήταν 7-15%. Τα τρυβλία παρέμειναν σε αυτές τις συνθήκες για διάστημα τεσσάρων ημερών και τα αποτελέσματα αξιολογήθηκαν στο τέλος.

3.6.2. Ανάπτυξη παρουσία χρωστικών βασικής φουξίνης-θειονίνης

Αρχικά, ετοιμάστηκαν τα διαλύματα της θειονίνης και της βασικής φουξίνης. Για το σκοπό αυτό, οι χρωστικές αναμίχθηκαν με απεσταγμένο νερό στις κατάλληλες συγκεντρώσεις έως την επίτευξη 0,1% διαλύματος θειονίνης (Sigma-Aldrich AG, Switzerland) και 0,1% διαλύματος βασικής φουξίνης (Merck KGaA, Darmstadt, Germany). Πριν την ενσωμάτωση των χρωστικών στα τρυβλία με το θρεπτικό υπόστρωμα, τα διαλύματα παρέμειναν σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 100°C για μία ώρα μέχρι την πλήρη διάλυσή τους. Ως θρεπτικό μέσο για την παρασκευή των τρυβλίων χρησιμοποιήθηκε το TSA. Μετά την ενσωμάτωση των χρωστικών στο

θρεπτικό μέσο, οι τελικές συγκεντρώσεις ήταν οι εξής: 1:25.000, 1:50.000 και 1:100.000 για τη θειονίνη και 1:50.000 και 1:100.000 για τη βασική φουζίνη. Παράλληλα, παρασκευάστηκαν και τρυβλία TSA, χωρίς την παρουσία χρωστικών, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες.

Για τα εναιωρήματα των υπό εξέταση στελεχών και των στελεχών αναφοράς, για κάθε στέλεχος από την καλλιέργεια συντήρησης μεταφέρθηκαν κύτταρα σε 1,0 ml αποστειρωμένου φυσιολογικού ορού. Ως στελέχη αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν τα στελέχη *B. melitensis* MK 142733.1 και *B. abortus* 544.

Στη συνέχεια, από κάθε εναιώρημα με τη βοήθεια βαμβακοφόρου σπειροειδούς έγινε επίστρωση σε κάθε τρυβλίο με τις προαναφερθείσες συγκεντρώσεις των χρωστικών και σε τρυβλίο με TSA. Τα τρυβλία παρέμειναν για επώαση στους 37°C για 4 ημέρες ενώ εξετάζονταν σε καθημερινή βάση για τυχόν ανάπτυξη αποικιών.

3.6.3. Παραγωγή υδρόθειου

Για κάθε στέλεχος, από τις καλλιέργειες συντήρησης ενοφθαλμίστηκαν κύτταρα σε δοκιμαστικό σωλήνα με θρεπτικό ζωμό Tryptone Soya Broth (TSB), στον οποίο είχε τοποθετηθεί λευκή ταινία εμβαπτισμένη σε 10% διάλυμα οξικού μολύβδου χωρίς να έρχεται σε επαφή με την καλλιέργεια. Για τη σφράγιση των σωλήνων χρησιμοποιήθηκε βαμβάκι και πώμα, ώστε να αποκλεισθεί ενδεχόμενη απώλεια του παραγόμενου υδρόθειου. Οι καλλιέργειες παρέμειναν για επώαση στους 37°C για 4 ημέρες, ενώ εξετάζονταν καθημερινά. Σε περίπτωση παραγωγής υδρόθειου, το χρώμα της ταινίας μεταβάλλονταν σε μαύρο.

Για την προετοιμασία των ταινιών, λωρίδες διηθητικού χαρτιού 1,0 x 7,0 cm εμβαπτίστηκαν σε 10% διάλυμα οξικού μολύβδου, το οποίο είχε παρασκευαστεί υπό άσηπτες συνθήκες μετά από ανάμιξη μολύβδου Lead (II) acetate trihydrate (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) με απεσταγμένο νερό στις κατάλληλες συγκεντρώσεις. Στη συνέχεια, οι ταινίες τοποθετήθηκαν σε κλίβανο στους 37°C μέχρι να στεγνώσουν πλήρως.

3.6.4. Συγκόλληση με μονοειδικούς αντιορούς A & M

Για τη συγκόλληση με τους μονοειδικούς αντιορούς A (*Brucella abortus* Agglutinating Serum, Remel Europe Ltd., Dartford, Kent, UK) και M (*Brucella melitensis* Agglutinating Serum, Remel Europe Ltd., Dartford, Kent, UK), για κάθε στέλεχος από την καλλιέργεια συντήρησης μεταφέρθηκαν με κρίκο κύτταρα σε

τρυβλίο με TSA. Στη συνέχεια, τα τρυβλία παρέμειναν για επώαση στους 37°C για 2-3 ημέρες.

Μετά την ανάπτυξη των αποικιών, για κάθε στέλεχος μεταφέρθηκαν κύτταρα σε δοκιμαστικό σωλήνα με 1-2 ml αποστειρωμένου φυσιολογικού ορού μέχρι τη λήψη πυκνού ομοιογενούς εναιωρήματος. Ο έλεγχος της οροσυγκόλλησης του κάθε στελέχους διενεργήθηκε σε βοθρία αποστειρωμένης πλάκας με κοίλο πυθμένα (Costar, Corning Life Sciences, Tewksbury, MA, USA). Συνολικά, για κάθε στέλεχος χρησιμοποιήθηκαν 16 βοθρία (8 για τον έλεγχο συγκόλλησης με τον αντιορό Α και 8 για τον έλεγχο συγκόλλησης με τον αντιορό Μ). Ο τρόπος των διαδοχικών αραιώσεων στον οποίον βασίστηκε η δοκιμή, παρουσιάζεται στο ακόλουθο σχήμα.

Βοθρίο No.	1	2	3	4	5	6	7	8
Εναιώρημα (μl)	90	50	50	50	50	50	50	50
Αντιορός (μl)	10 ————— διαδοχικές αραιώσεις με 50 μl —————> 0							
Τελική συγκέντρωση	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	μάρτυρας

Μετά την ολοκλήρωση των διαδοχικών αραιώσεων, η πλάκα σφραγίστηκε και επώαστηκε στους 37°C για 24 ώρες. Η ανάγνωση των αποτελεσμάτων έγινε μετά από την αποσφράγιση της πλάκας σε μαύρο φόντο και με την πρόσπτωση φωτός υπό γωνία. Επί αρνητικού αποτελέσματος, το οποίο υποδήλωνε απουσία οροσυγκόλλησης, παρατηρούνταν ίζημα στον πυθμένα του βοθρίου, ενώ σε περίπτωση θετικού αποτελέσματος αξιολογούνταν η απουσία του ιζήματος.

3.7. ΑΝΑΛΥΣΗ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ PCR-RFLP ΓΙΑ ΤΗ ΔΙΑΚΡΙΣΗ ΑΠΟ ΤΟ ΕΜΒΟΛΙΑΚΟ ΣΤΕΛΕΧΟΣ Rev-1

Όλα τα στελέχη υποβλήθηκαν σε PCR-RFLP, καθώς σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες (Bardenstein et al., 2002; Noutsios et al., 2012), τα ενδημικά στελέχη *B. melitensis* διαφοροποιούνται από το εμβολιακό στέλεχος Rev-1 μελετώντας τον πολυμορφισμό του γονιδίου *omp2* (γονίδια *omp2a* και *omp2b*) με τη μέθοδο PCR-RFLP.

Από το γενωμικό DNA των στελεχών έγιναν αντιδράσεις της αλυσιδωτής πολυμεράσης προκειμένου να ενισχυθεί το γονίδιο *omp2*. Οι εκκινητές (Bardenstein et al., 2002; Noutsios et al., 2012) που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι ακόλουθοι: F 5'-GGCTATTCAAAATTCTGGCG-3' και R 5'-ATCGATTCTCACGCTTTCGT-3. Το μίγμα της αντίδρασης ενίσχυσης είχε όγκο 25 μl και περιείχε 1x PCR ThermoPol II Buffer (Thermo Fisher Scientific, Invitrogen, Carlsbad, USA) 5 mM MgCl₂ (Thermo Fisher Scientific, Invitrogen, Carlsbad, USA), 0.8 mM dNTPs, 1 μM από κάθε εκκινητή, 80-100 ng γενωμικού DNA και 1.25 IU Taq πολυμεράση Recombinant (Thermo Fisher Scientific, Invitrogen, Carlsbad, USA). Πραγματοποιήθηκαν 35 κύκλοι ενίσχυσης σε 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems Inc., USA) ως εξής: αρχική αποδιάταξη σε θερμοκρασία 94°C για 2 λεπτά και 35 κύκλοι σε θερμοκρασία 94°C για 20 δευτερόλεπτα (αποδιάταξη), θερμοκρασία 60°C για 1 λεπτό (υβριδισμός) και 72°C για 1 λεπτό (επέκταση) και τελική επέκταση σε θερμοκρασία 72°C για 7 λεπτά.

Στην συνέχεια έγινε πέψη των προϊόντων της PCR με ενδονουκλεάση περιορισμού *PstI* (New England BioLabs® Ltd, UK) στους 37°C για 2 ώρες. Το μίγμα της πέψης είχε όγκο 20 μl και περιείχε ειδικό για το ένζυμο Buffer 1x, 500 ng γενωμικό DNA και 3 IU ενδονουκλεάση περιορισμού *PstI*. Τα προϊόντα της πέψης αναλύθηκαν με οριζόντια ηλεκτροφόρηση σε 3% πηκτή αραρόζης σε ρυθμιστικό διάλυμα TBE 0.5X για 1 ώρα στα 80 V και στα 60 mA. Η φωτογράφιση των ηλεκτροφορημάτων έγινε σε λάμπα υπεριώδους φως με φωτογραφική μηχανή Kodak EDAS 290.

3.8. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ MALDI TOF MS

3.8.1. Κατασκευή της βιβλιοθήκης αναφοράς

3.8.1.1. Επιλογή στελεχών για τη λήψη πρότυπων φασμάτων

Καθώς στην πιο πρόσφατη βιβλιοθήκη αναφοράς (6.093 MSPs) δεν υπάρχουν καταχωρημένα στελέχη *Brucella* spp., κυρίως λόγω της ενδεχόμενης χρήσης τους σε περιπτώσεις βιοτρομοκρατίας, αρχικό βήμα στην ανάλυση των στελεχών με τη μέθοδο MALDI-TOF MS αποτέλεσε η κατασκευή της βιβλιοθήκης αναφοράς για την αναζήτηση της δυνατότητας ταυτοποίησης των στελεχών σε επίπεδο είδους.

Τα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν για τη δημιουργία των φασμάτων αναφοράς και την επικύρωση της μεθόδου είναι τα παρακάτω:

- Το πρότυπο στέλεχος *B. ovis* (63/290, ATCC 25840)
- Το πρότυπο στέλεχος *B. abortus* βιότυπος 1 (544, ATCC 23448)
- Τα εμβολιακά στελέχη Rev-1, S19 και RB51
- Ένα στέλεχος *B. suis*, δύο στελέχη *B. melitensis* και τρία στελέχη *B. abortus* ταυτοποιημένα σε επίπεδο γένους και είδους από το Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise Giuseppe Caporale (Τέραμο, Ιταλία) και επιβεβαιωμένα στο ΙΚΕ με Real-Time PCR και multiplex PCR. Τα στελέχη *B. suis* και *B. melitensis* αναλύθηκαν επιπλέον και με 16S rRNA gene sequencing

3.8.1.2. Ανάλυση στελεχών με 16S rRNA gene sequencing

Για την ενίσχυση της βιβλιοθήκης αναφοράς της MALDI-TOF MS, πολλαπλά στελέχη *Brucella* spp. από το Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise Giuseppe Caporale (Τέραμο, Ιταλία), υποβλήθηκαν σε PCR για την εκλεκτική ενίσχυση του γονιδίου 16S rRNA για φυλογενετική ανάλυση. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι ακόλουθοι: F 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' και R 5'-AAGGAGGTGATCCANCCRCA-3'. Το μίγμα της αντίδρασης ενίσχυσης είχε τελικό όγκο 25 μl και περιείχε 1x KAPA GC Buffer (που περιέχει 2 mM MgCl₂), 0,3 mM από κάθε dNTP, 0,3 μM από κάθε εκκινητή, 50 ng γενωμικού DNA και 0,5 IU KAPA πολυμεράση. Πραγματοποιήθηκαν 35 κύκλοι ενίσχυσης σε 2720 Thermal Cycler ως εξής: αρχική αποδιάταξη σε θερμοκρασία 95°C για 3 λεπτά και 35 κύκλοι

σε θερμοκρασία 98°C για 20 δευτερόλεπτα (αποδιάταξη), θερμοκρασία 65°C για 15 δευτερόλεπτα (υβριδισμός) και 72°C για 40 δευτερόλεπτα (επέκταση) και τελική επέκταση σε θερμοκρασία 72°C για 5 λεπτά. Τα προϊόντα της PCR μετά τον πολλαπλασιασμό του γονιδίου 16S rRNA υποβλήθηκαν σε καθαρισμό με το PureLink™ PCR Purification Kit (Invitrogen, Carlsbad, USA) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Στη συνέχεια, τα προϊόντα αναλύθηκαν με οριζόντια ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1,5% σε ρυθμιστικό διάλυμα TBE 0,5X. Ακολούθησε ανάλυση κατά Sanger (sequencing-αλληλούχηση) στον αναλυτή CEMIA SA, Λάρισα (αλληλουχητής ABI 3730x1) και οι αλληλουχίες που προέκυψαν από την ανάγνωση των χρωματογραφημάτων συγκρίθηκαν με εκείνες της τράπεζας Ribosomal Database Project.

Τα αποτελέσματα της αλληλούχησης τμήματος του 16S rRNA γονιδίου συγκρίθηκαν με τα αποτελέσματα των προηγούμενων μοριακών μεθόδων (Real-Time PCR και multiplex PCR), και στη συνέχεια δύο στελέχη *B. melitensis* (GENBANK accession numbers: MK 142733.1 και MK 142739.1) και ένα στέλεχος *B. suis* (GENBANK accession number: MK 141059.1) χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση της βιβλιοθήκης αναφοράς.

3.8.1.3. Πρωτόκολλο εκχύλισης πρωτεϊνών

Για κάθε στέλεχος από την καλλιέργεια συντήρησης μεταφέρθηκαν κύτταρα σε τρυβλία με TSA (Merck KGaA, Darmstadt, Germany). Τα τρυβλία παρέμειναν για επώαση στους 37°C σε αερόβιες ή μικροαερόφιλες συνθήκες για χρονικό διάστημα 96 ωρών. Οι συνθήκες καλλιέργειας παρέμειναν σταθερές για το σύνολο των στελεχών, ώστε να αποφευχθεί το ενδεχόμενο η μέθοδος εκχύλισης του κλάσματος των ριβοσωμικών πρωτεϊνών να επηρεάσει την αναπαραγωγικότητα του οργάνου.

Σύμφωνα με το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε για την εκχύλιση των ριβοσωμικών πρωτεϊνών (Lista et al., 2011), τα κύτταρα μιας αποικίας μεταφέρθηκαν σε δοκιμαστικό σωλήνα και αναμίχθηκαν με 300 μl νερό HPLC grade (VWR CHEMICALS, France) μέχρι το σχηματισμό εναιωρήματος. Στο εναιώρημα προστέθηκαν 900 μl αιθανόλης (Ethanol absolute analytical grade, ACS, Reag Ph Eur, Scharlau, Spain), ακολούθησε ανάδευση και το μίγμα παρέμεινε σε θερμοκρασία

δωματίου για 90 λεπτά ώστε να επιτευχθεί η αδρανοποίηση του μικροοργανισμού. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στα 10.000g για δέκα λεπτά και απόρριψη του υπερκείμενου στρώματος. Για την απομάκρυνση τυχόν καταλοίπων αιθανόλης το μίγμα φυγοκεντρήθηκε για δεύτερη φορά στα 10.000g για δέκα λεπτά και απορρίφθηκε το υπερκείμενο στρώμα. Στο ίζημα προστέθηκαν 50 μl μυρμηκικού οξέος 70% (Formic Acid 85% AG, Penta, Praha) και ακολούθησε καλή ανάμιξη. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 50 μl ακετονιτριλίου (Sigma-Aldrich, Germany), έγινε ανάμιξη και το μίγμα φυγοκεντρήθηκε στα 10.000g για δύο λεπτά. Η λήψη του κλάσματος των ριβοσωμικών πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε με τη μεταφορά του υπερκείμενου στρώματος σε αποστειρωμένο φιαλίδιο πολυπροπυλενίου 1,5 ml.

3.8.1.4. Προετοιμασία πλάκας

Για τη δημιουργία των πρότυπων φασμάτων δημιουργήθηκαν 24 επαναλήψεις για κάθε στέλεχος με 1 μl υπερκείμενου/επανάληψη. Στο τέλος προστέθηκε 1 μl matrix solution (κορεσμένο διάλυμα CHCA (alpha-cyano-4-hydroxy cinnamic acid) σε οργανικό διαλύτη (10 mg/ml ακετονιτρίλιο/νερό και 2,5% TFA) και η πλάκα (MTP 96 target, Bruker Daltonics, Bremen, Germany) παρέμεινε σε θερμοκρασία δωματίου για να στεγνώσει.

3.8.1.5. Ανάλυση με MALDI-TOF MS

Οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο Υγιεινής και Επιδημιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας με το μηχάνημα MALDI Microflex LT (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). Τα πρωτεϊνικά προφίλ αποκτήθηκαν με τη χρήση γραμμικής θετικής ανάλυσης, με συχνότητα laser στα 20 Hz. Τα πρωτογενή φάσματα αποκτήθηκαν αυτομάτως με το λογισμικό AutoXecute control (FlexControl 3.4, Bruker Daltonics, Bremen, Germany) και οι μάζες καταγράφηκαν εντός των 2 με 20 kDa. Για κάθε φάσμα πραγματοποιήθηκαν 240 βομβαρδισμοί με laser (laser shots). Η βαθμονόμηση των φασμάτων έγινε εξωτερικά με τη χρήση τυποποιημένου μίγματος για το σκοπό αυτό (εκχύλισμα *Escherichia coli* με την προσθήκη των πρωτεϊνών RNase A και μυογλοβίνης, Bruker Daltonics, Bremen, Germany).

3.8.1.6. Δημιουργία φασμάτων αναφοράς (Main Spectral Profiles-MSPs)

Μετά τη λήψη των πρωτογενών φασμάτων, τα 24 φάσματα του κάθε στελέχους επεξεργάστηκαν με το λογισμικό MALDI FlexAnalysis 3.4. (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). Αρχικά, έγινε εξομάλυνση (smoothing/baseline subtraction) και αλληλοεπικάλυψη (overlap) των 24 φασμάτων του κάθε στελέχους ώστε να εξαιρεθούν εκείνα που σημείωσαν επίπεδες (flat spectra), έκτοπες (outlier peaks) και χαμηλής έντασης κορυφές. Στη συνέχεια, τα φάσματα που παρέμειναν υποβλήθηκαν σε ποιοτικό έλεγχο κορυφών. Για το σκοπό αυτό, επιλέχθηκαν οι μάζες εύρους εντός 2.000 – 10.000 Da και ο έλεγχος των κορυφών πραγματοποιήθηκε ανά 1.000 Da ώστε να υπολογιστεί η μέγιστη απόκλιση της κάθε κορυφής (peak shift). Η μέγιστη επιτρεπόμενη απόκλιση μεταξύ της μικρότερης και μεγαλύτερης μάζας για κάθε κορυφή είναι 500 ppm. Όσα φάσματα δεν πληρούσαν αυτό το κριτήριο απορρίπτονταν. Μετά το τέλος της επεξεργασίας των πρωτογενών φασμάτων και του ποιοτικού ελέγχου των κορυφών, για κάθε στέλεχος παρέμειναν τουλάχιστον 20 φάσματα, τα οποία με τη χρήση του λογισμικού MALDI Biotyper Offline Classification 4 (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) συνέβαλαν στην κατασκευή των πρότυπων φασμάτων (MSPs), που εν συνεχεία εισήχθησαν στο Taxonomy Tree Project (Bruker Daltonics, Bremen, Germany).

3.8.1.7. Επικύρωση της βιβλιοθήκης αναφοράς MALDI-TOF MS

Μετά τη λήψη των πρότυπων φασμάτων και τη δημιουργία της βιβλιοθήκης αναφοράς, ακολούθησε σε όλα τα στελέχη της μελέτης η εκχύλιση των ριβοσωμικών πρωτεϊνών (όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.7.1.3.) και η ανάλυσή τους εις διπλούν προκειμένου να αξιολογηθεί η νέα βιβλιοθήκη ως προς την ευαισθησία και ειδικότητα που παρουσιάζει στην ταυτοποίηση των βρουκελλών σε επίπεδο είδους. Στη συνέχεια, έγινε σύγκριση των αποτελεσμάτων της MALDI-TOF MS ταυτοποίησης με τα αποτελέσματα των μοριακών και βιοχημικών αναλύσεων των στελεχών.

Το αποτέλεσμα του MALDI Biotyper για την ταυτοποίηση αναφέρεται ως «score value». Με βάση τον κατασκευαστή του οργάνου υπάρχουν τέσσερις κατηγορίες score value:

- 2.300 - 3.000: Εξαιρετικά πιθανή η ταυτοποίηση σε επίπεδο είδους
- 2.000 - 2.299: Ασφαλής ταυτοποίηση γένους, πιθανή ταυτοποίηση είδους
- 1.700 - 1.999: Πιθανή ταυτοποίηση γένους
- 0.000 - 1.699: Μη αξιόπιστη ταυτοποίηση

3.8.1.8. Κατασκευή MSP δενδρογράμματος

Επειδή υπάρχει μεγάλη γενωμική ομολογία (>95%) μεταξύ των διαφόρων ειδών του γένους *Brucella*, ένα MSP δενδρόγραμμα κατασκευάστηκε με τη βοήθεια του λογισμικού MALDI Biotyper Offline Classification 4 (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) με τις προκαθορισμένες παραμέτρους, για την ταξινόμηση των πρότυπων στελεχών του γένους *Brucella* και την αναζήτηση της φυλογενετικής τους σύνδεσης με βάση το πρωτεϊνικό τους προφίλ.

3.8.2. Διερεύνηση της δυνατότητας χρήσης της μεθόδου MALDI-TOF MS στη διάκριση των βιότυπων του είδους *B. melitensis*

3.8.2.1. Επιλογή στελεχών για φάσματα αναφοράς

Προκειμένου να αναζητηθεί η δυνατότητα αξιοποίησης της μεθόδου MALDI-TOF MS στην τυποποίηση των στελεχών της *B. melitensis*, επιλέχθηκαν τα ακόλουθα στελέχη:

- οκτώ στελέχη της μελέτης, τα οποία είχαν ταυτοποιηθεί στο IKE με τις μεθόδους της κλασσικής μικροβιολογίας ως *B. melitensis* βιότυπος 1
- ένα στέλεχος της μελέτης ταυτοποιημένο στο IKE με τις μεθόδους της κλασσικής μικροβιολογίας ως *B. melitensis* βιότυπος 2
- έξι στελέχη της διατριβής, τα οποία είχαν ταυτοποιηθεί στο IKE με τις μεθόδους της κλασσικής μικροβιολογίας ως *B. melitensis* βιότυπος 3
- δύο στελέχη *B. melitensis* με GENBANK accession numbers MK 142733.1 και MK 142739.1, τα οποία χορηγήθηκαν από το το Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise Giuseppe Caporale (Τέραμο, Ιταλία).

3.8.2.2. Λήψη και επεξεργασία φασμάτων προς αναζήτηση ειδικών βιοδεικτών

Αρχικά, καθένα από τα προαναφερθέντα στελέχη αναλύθηκε εις πενταπλούν για τη λήψη των πρωτογενών φασμάτων. Στη συνέχεια, τα φάσματα επεξεργάστηκαν με το λογισμικό Mass-Up (López-Fernández et al., 2015) για την ανεύρεση ειδικών βιοδεικτών που μπορούν να συμβάλουν στη διάκριση των τριών βιοτύπων του είδους *B. melitensis*. Το λογισμικό Mass-Up είναι ένα λογισμικό ελεύθερης πρόσβασης, το οποίο χρησιμοποιείται ευρέως στην προ-επεξεργασία και ανάλυση των δεδομένων της μεθόδου MALDI-TOF MS μέσω της χρήσης στατιστικών πακέτων. Κατά την ανίχνευση των βιοδεικτών, το λογισμικό Mass-Up παρέχει δύο τύπους αναλύσεων. Με τον πρώτο τύπο (*intra-label analysis*) επιτυγχάνεται η σύγκριση μεταξύ των φασμάτων των στελεχών του ίδιου βιότυπου, ενώ με το δεύτερο (*inter-label analysis*) επιτρέπεται η σύγκριση των φασμάτων στελεχών διαφορετικών βιοτύπων.

Στην παρούσα μελέτη, τα φάσματα επεξεργάστηκαν με το στατιστικό πακέτο *MALDIquant* (όριο ανοχής : 0,002 ppm), ενώ η ανίχνευση των βιοδεικτών βασίστηκε στην ανάλυσή τους με τον αλγόριθμο *Forward*. Μετά το τέλος της επεξεργασίας, ως πιθανοί βιοδείκτες για τη διάκριση των βιοτύπων της *B. melitensis* επιλέχθηκαν οι κορυφές με τιμές p και $q < 0,05$ χρησιμοποιώντας τις μεθόδους Fisher και Benjamini Hochberg FDR αντίστοιχα.

3.8.3. Διερεύνηση της δυνατότητας χρήσης της μεθόδου MALDI-TOF MS στη διάκριση των φυσικά μολυσματικών στελεχών *B. melitensis* από το εμβολιακό στέλεχος Rev-1.

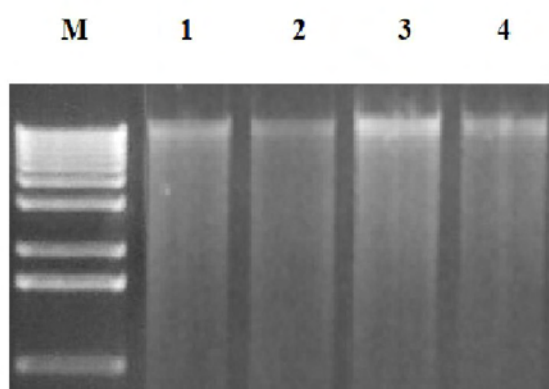
Προκειμένου να αξιολογηθεί η αναλυτική τεχνική MALDI-TOF MS ως προς την ανεύρεση ειδικών βιοδεικτών για τη διάκριση των εμβολιακών από τα μολυσματικά στελέχη της *B. melitensis*, τρία εμβολιακά στελέχη Rev-1 με αριθμούς παρτίδων 163881 (Animal Health Care PROVET, Athens, Greece), 181118 και 181119 (CZ Veterinaria; Porriño, Spain) αναλύθηκαν εις πενταπλούν και στη συνέχεια τα φάσματα επεξεργάστηκαν με τον τρόπο που περιγράφεται παραπάνω (παράγραφος 3.7.2.2.).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕ ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

4.1.1. Έλεγχος απομόνωσης gDNA

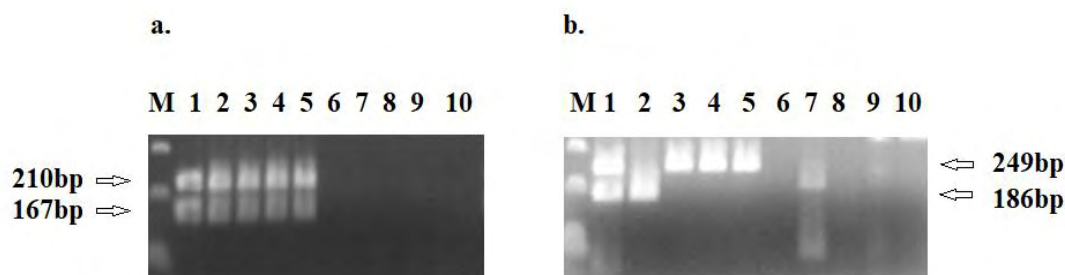
Μετά την απομόνωση του gDNA ακολούθησε η ηλεκτροφόρησή του σε 0,7% πηκτή αγαρόζης ώστε να ελεγχθεί η ποιότητα και η ποσότητά του. Στην εικόνα 6 που ακολουθεί φαίνεται ο έλεγχος της απομόνωσης του gDNA όπως πραγματοποιήθηκε σε ορισμένα στελέχη της μελέτης.



Εικόνα 6: Προσδιορισμός του gDNA που απομονώθηκε. Διαδρομή M: Μάρτυρας μοριακού μεγέθους 1 Kb, Διαδρομές 1-4: γενωμικό DNA από μολυσματικά στελέχη της *B. melitensis*.

4.1.2. Ταυτοποίηση με multiplex PCR

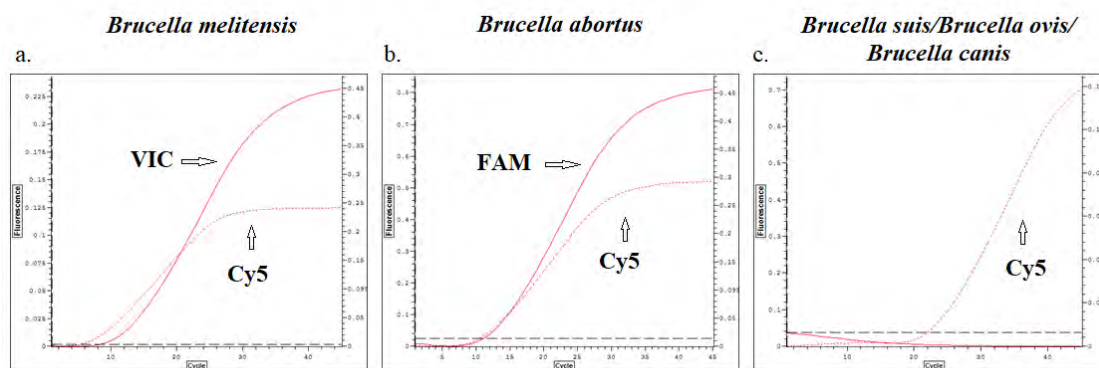
Με τη multiplex PCR, που αναπτύχθηκε και επικυρώθηκε στο πλαίσιο της παρούσας διδακτορικής διατριβής, όλα τα στελέχη της μελέτης ταυτοποιήθηκαν επιτυχώς σε επίπεδο γένους και είδους. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 7a που ακολουθεί, στην 1^η duplex PCR η οποία βασίζεται στα ζεύγη των εκκινητών B4/B5 και BrucR/F, όλα τα στελέχη της μελέτης ταυτοποιήθηκαν στο γένος *Brucella* καθώς έδωσαν προϊόντα ενίσχυσης PCR μήκους 210 και 167 bp (Διαδρομή 1). Αντίθετα, οι υπόλοιποι παθογόνοι μικροοργανισμοί (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus megaterium*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri* και *Escherichia coli* 8879) δεν παρουσίασαν προϊόντα ενίσχυσης σε αυτές τις δύο ζώνες (Διαδρομές 6-10). Κατά την ανάλυση με τη 2^η duplex PCR (Εικόνα 7b), η οποία βασίστηκε στα ζεύγη των εκκινητών JPF/JPF-abR και 1S-F/1AS-R, 73/75 στελέχη της μελέτης (97,33%) ταυτοποιήθηκαν ως *Brucella melitensis*, καθώς προέκυψαν προϊόντα ενίσχυσης PCR μήκους 249 και 186 bp (Διαδρομή 1), ενώ 2/75 στελέχη (2,67%) ταυτοποιήθηκαν ως *B. abortus* καθώς έδωσαν προϊόντα μόνο στα 186 bp (Διαδρομή 2). Αντίθετα, τα είδη *B. suis*, *B. ovis* και *B. canis* έδωσαν προϊόντα ενίσχυσης στην ίδια ζώνη-249 bp (Διαδρομές 3-5 αντίστοιχα). Στους υπόλοιπους παθογόνους μικροοργανισμούς, που χρησιμοποιήθηκαν ως αρνητικοί μάρτυρες, δεν παρατηρήθηκαν προϊόντα σε αυτές τις δύο ζώνες (Διαδρομές 6-10). Τα αποτελέσματα της μεθόδου επιβεβαιώθηκαν σε όλα τα δείγματα DNA (μαρτύρων και βακτηριακών στελεχών), τα οποία εξετάστηκαν εις διπλούν την ίδια ημέρα υπό τις ίδιες συνθήκες, ενώ η αναλυτική ευαισθησία της μεθόδου ήταν 0,1 ng.



Εικόνα 7: Αποτελέσματα ταυτοποίησης των 75 στελεχών με τη μέθοδο multiplex PCR σε επίπεδο γένους (a) και είδους (b). M: Μάρτυρας μοριακού μεγέθους 100 bp, 1: *B. melitensis*, 2: *B. abortus*, 3: *B. suis*, 4: *B. ovis*, 5: *B. canis*, 6: *Staphylococcus aureus*, 7: *Salmonella typhimurium*, 8: *Bacillus megaterium*, 9: *Shigella flexneri*, 10: *Escherichia coli* 8879.

4.1.3. Ταυτοποίηση με Real-Time PCR

Με τη μέθοδο της διπλής Real-Time PCR, 73/75 στελέχη της μελέτης (97,33%) ταυτοποιήθηκαν ως *Brucella melitensis*, καθώς σε όλα παρατηρήθηκε ενίσχυση του γονιδίου IS711, υπεύθυνου για την ανίχνευση του γένους *Brucella* που επισημαίνεται με τον ανιχνευτή Cy5 (Ct: 5.24), και του γονιδίου BMEII0466, υπεύθυνου για την ανίχνευση του είδους *Brucella melitensis* που επισημαίνεται με τον ανιχνευτή VIC (Ct: 8.39) (Εικόνα 8a). Αντίθετα, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 8b, σε 2/75 στελέχη (2, 67%) παρατηρήθηκε ενίσχυση του γονιδίου IS711 (Ct: 10.57), υπεύθυνου για την ανίχνευση *Brucella* spp. και του γονιδίου BruAb2_0168, υπεύθυνου για την ανίχνευση της *B. abortus* (ανιχνευτής FAM, Ct: 11.13). Τέλος, στα στελέχη *B. suis*, *B. onis* και *B. canis* (Εικόνα 8c), που χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες, παρατηρήθηκε ενίσχυση μόνο του γονιδίου IS711, υπεύθυνου για την ανίχνευση του γένους *Brucella* που επισημαίνεται με τον ανιχνευτή Cy5 (Ct: 22.62), ενώ οι ανιχνευτές FAM και VIC δεν εμφανίζονται. Σε γενικές γραμμές, η μέθοδος της διπλής Real-Time PCR αποδείχτηκε ικανοποιητική στην ταυτοποίηση των στελεχών σε επίπεδο γένους και είδους με αποτελεσματικότητα (efficiency) μεγαλύτερη από 98%, ειδικά όταν η εξαγωγή του gDNA βασίζεται σε προηγούμενη καλλιέργεια των στελεχών. Ωστόσο, όταν εφαρμόζεται σε γενωμικό DNA που έχει εξαχθεί απευθείας από ιστό, η απόδοση της μεθόδου δεν είναι ικανοποιητική.



Εικόνα 8: Αποτελέσματα της ταυτοποίησης των στελεχών με τη μέθοδο Real-Time PCR. Ο ανιχνευτής Cy5 ταυτοποιεί το γένος *Brucella*, ενώ οι ανιχνευτές VIC και FAM ταυτοποιούν τα είδη *B. melitensis* και *B. abortus* αντίστοιχα.

4.2. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕ ΤΙΣ ΜΕΘΟΔΟΥΣ ΤΗΣ ΚΛΑΣΣΙΚΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

Βάσει των βιοχημικών και μορφολογικών χαρακτηριστικών των αποικιών, 73/75 στελέχη (97,33%) ταυτοποιήθηκαν ως *Brucella melitensis*, ενώ 2/75 (2,67%) ταυτοποιήθηκαν ως *B. abortus*. Πιο αναλυτικά, κατά την καλλιέργεια σε TSA τα 73 στελέχη παρουσίασαν ανάπτυξη αποικιών σε διάστημα 48 ωρών, τόσο σε αερόβιες όσο και σε μικροαερόφιλες συνθήκες. Παράλληλα, όλα ήταν αρνητικά στην παραγωγή υδρόθειου και παρουσίασαν αντοχή στις χρωστικές, εκτός από τη συγκέντρωση 1:25.000 της θειονίνης. Αντίθετα, τα δύο στελέχη που ταυτοποιήθηκαν ως *B. abortus*, παρουσίασαν ανάπτυξη αποικιών μόνο παρουσία CO₂, ήταν θετικά στην παραγωγή υδρόθειου και εμφάνισαν αντοχή σε όλες τις συγκεντρώσεις των δύο χρωστικών. Όσον αφορά στη μορφολογία τους, σε όλα τα στελέχη της μελέτης οι αποικίες είχαν μέγεθος κόκκου άμμου, ήταν σφαιρικές, περιγεγραμμένες και χρώματος υπόλευκου-υποκίτρινου, ενώ παρουσίαζαν έντονη διάθλαση του φωτός.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της συγκόλλησης με τους ειδικούς μονοδύναμους αντι-ορούς A και M, 62 από τα 73 στελέχη *Brucella melitensis* ταυτοποιήθηκαν ως βιότυπος 3 (84,93%), δέκα στελέχη ως βιότυπος 1 (13,70%), ενώ ένα μόνο στέλεχος ταυτοποιήθηκε στο βιότυπο 2 (1,37%). Τα στελέχη *B. abortus* με βάση τη συγκόλληση στους μονοδύναμους αντι-ορούς, ταυτοποιήθηκαν ως βιότυπος 3. Τα αποτελέσματα της τυποποίησης όλων των συμπεριλαμβανομένων στη μελέτη στελεχών συνοψίζονται στον Πίνακα 10 που ακολουθεί.

Πίνακας 10: Αποτελέσματα βιοχημικής ταυτοποίησης στελεχών μελέτης.

Κωδικός στελέχους	Ανάγκη CO ₂	Παραγωγή H ₂ S	Βασική φουξίνη (1:50.000)	Βασική φουξίνη (1:100.000)	Θειονίνη (1:25.000)	Θειονίνη (1:50.000)	Θειονίνη (1:100.000)	Συγκόλληση με αντιορό Α	Συγκόλληση με αντιορό Μ	Αποτέλεσμα τυποποίησης
K1	-	-	+	+	-	+	+	2/8 βοθρία	2/8 βοθρία	<i>B. melitensis</i> bv. 3
K2	-	-	+	+	-	+	+	2/8 βοθρία	2/8 βοθρία	<i>B. melitensis</i> bv. 3
K3	-	-	+	+	-	+	+	2/8 βοθρία	2/8 βοθρία	<i>B. melitensis</i> bv. 3
K4	+	+	+	+	+	+	+	3/8 βοθρία	0/8 βοθρία	<i>B. abortus</i> bv.3
K5	-	-	+	+	-	+	+	2/8 βοθρία	2/8 βοθρία	<i>B. melitensis</i> bv. 3
K6	-	-	+	+	-	+	+	2/8 βοθρία	2/8 βοθρία	<i>B. melitensis</i> bv. 3
K7	-	-	+	+	-	+	+	2/8 βοθρία	2/8 βοθρία	<i>B. melitensis</i> bv. 3
K8	-	-	+	+	-	+	+	2/8 βοθρία	2/8 βοθρία	<i>B. melitensis</i> bv. 3
K9	-	-	+	+	-	+	+	2/8 βοθρία	2/8 βοθρία	<i>B. melitensis</i> bv. 3
K10	-	-	+	+	-	+	+	2/8 βοθρία	2/8 βοθρία	<i>B. melitensis</i> bv. 3

K11	-	-	+	+	-	+	+	2/8 βοθρία	2/8 βοθρία	<i>B. melitensis</i> bv. 3
K12	-	-	+	+	-	+	+	2/8 βοθρία	2/8 βοθρία	<i>B. melitensis</i> bv. 3
K13	-	-	+	+	-	+	+	2/8 βοθρία	2/8 βοθρία	<i>B. melitensis</i> bv. 3
K14	-	-	+	+	-	+	+	2/8 βοθρία	2/8 βοθρία	<i>B. melitensis</i> bv. 3
K15	-	-	+	+	-	+	+	2/8 βοθρία	2/8 βοθρία	<i>B. melitensis</i> bv. 3
K16	-	-	+	+	-	+	+	2/8 βοθρία	2/8 βοθρία	<i>B. melitensis</i> bv. 3
K17	-	-	+	+	-	+	+	2/8 βοθρία	2/8 βοθρία	<i>B. melitensis</i> bv. 3
K18	-	-	+	+	-	+	+	2/8 βοθρία	2/8 βοθρία	<i>B. melitensis</i> bv. 3
K19	-	-	+	+	-	+	+	1/8 βοθρία	2/8 βοθρία	<i>B. melitensis</i> bv. 3
K20	-	-	+	+	-	+	+	1/8 βοθρία	2/8 βοθρία	<i>B. melitensis</i> bv. 3
K21	-	-	+	+	-	+	+	1/8 βοθρία	1/8 βοθρία	<i>B. melitensis</i> bv. 3
K22	-	-	+	+	-	+	+	1/8 βοθρία	2/8 βοθρία	<i>B. melitensis</i> bv. 3
K23	-	-	+	+	-	+	+	1/8 βοθρία	2/8 βοθρία	<i>B. melitensis</i> bv. 3

K24	-	-	+	+	-	+	+	1/8 βοθρία	2/8 βοθρία	<i>B. melitensis</i> bv. 3
K25	-	-	+	+	-	+	+	1/8 βοθρία	2/8 βοθρία	<i>B. melitensis</i> bv. 3
K26	-	-	+	+	-	+	+	1/8 βοθρία	2/8 βοθρία	<i>B. melitensis</i> bv. 3
K27	-	-	+	+	-	+	+	1/8 βοθρία	2/8 βοθρία	<i>B. melitensis</i> bv. 3
K28	-	-	+	+	-	+	+	1/8 βοθρία	2/8 βοθρία	<i>B. melitensis</i> bv. 3
K29	-	-	+	+	-	+	+	2/8 βοθρία	2/8 βοθρία	<i>B. melitensis</i> bv. 3
K30	-	-	+	+	-	+	+	1/8 βοθρία	2/8 βοθρία	<i>B. melitensis</i> bv. 3
K31	-	-	+	+	-	+	+	1/8 βοθρία	2/8 βοθρία	<i>B. melitensis</i> bv. 3
K32	-	-	+	+	-	+	+	1/8 βοθρία	2/8 βοθρία	<i>B. melitensis</i> bv. 3
K33	-	-	+	+	-	+	+	1/8 βοθρία	2/8 βοθρία	<i>B. melitensis</i> bv. 3
K34	-	-	+	+	-	+	+	2/8 βοθρία	1/8 βοθρία	<i>B. melitensis</i> bv. 3
K35	-	-	+	+	-	+	+	1/8 βοθρία	2/8 βοθρία	<i>B. melitensis</i> bv. 3
K36	-	-	+	+	-	+	+	1/8 βοθρία	2/8 βοθρία	<i>B. melitensis</i> bv. 3

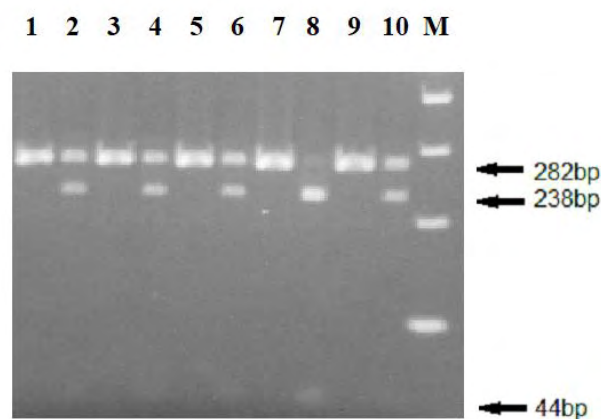
K37	-	-	+	+	-	+	+	2/8 βοθρία	2/8 βοθρία	<i>B. melitensis</i> bv. 3
K38	-	-	+	+	-	+	+	2/8 βοθρία	2/8 βοθρία	<i>B. melitensis</i> bv. 3
K39	-	-	+	+	-	+	+	2/8 βοθρία	2/8 βοθρία	<i>B. melitensis</i> bv. 3
K40	-	-	+	+	-	+	+	2/8 βοθρία	2/8 βοθρία	<i>B. melitensis</i> bv. 3
K41	-	-	+	+	-	+	+	2/8 βοθρία	2/8 βοθρία	<i>B. melitensis</i> bv. 3
K42	-	-	+	+	-	+	+	2/8 βοθρία	2/8 βοθρία	<i>B. melitensis</i> bv. 3
K43	-	-	+	+	-	+	+	2/8 βοθρία	2/8 βοθρία	<i>B. melitensis</i> bv. 3
T2	-	-	+	+	-	+	+	2/8 βοθρία	0/8 βοθρία	<i>B. melitensis</i> bv. 2
T3	-	-	+	+	-	+	+	0/8 βοθρία	3/8 βοθρία	<i>B. melitensis</i> bv. 1
T4	-	-	+	+	-	+	+	0/8 βοθρία	3/8 βοθρία	<i>B. melitensis</i> bv. 1
T5	-	-	+	+	-	+	+	2/8 βοθρία	2/8 βοθρία	<i>B. melitensis</i> bv. 3
T6	-	-	+	+	-	+	+	2/8 βοθρία	2/8 βοθρία	<i>B. melitensis</i> bv. 3
T8	-	-	+	+	-	+	+	2/8 βοθρία	2/8 βοθρία	<i>B. melitensis</i> bv. 3

T9	-	-	+	+	-	+	+	2/8 βοθρία	2/8 βοθρία	<i>B. melitensis</i> bv. 3
T10	-	-	+	+	-	+	+	2/8 βοθρία	2/8 βοθρία	<i>B. melitensis</i> bv. 3
T13	-	-	+	+	-	+	+	2/8 βοθρία	2/8 βοθρία	<i>B. melitensis</i> bv. 3
T14	-	-	+	+	-	+	+	2/8 βοθρία	2/8 βοθρία	<i>B. melitensis</i> bv. 3
B2	-	-	+	+	-	+	+	0/8 βοθρία	3/8 βοθρία	<i>B. melitensis</i> bv. 1
B7	-	-	+	+	-	+	+	4/8 βοθρία	7/8 βοθρία	<i>B. melitensis</i> bv. 1
B16	-	-	+	+	-	+	+	0/8 βοθρία	2/8 βοθρία	<i>B. melitensis</i> bv. 1
B20	-	-	+	+	-	+	+	2/8 βοθρία	2/8 βοθρία	<i>B. melitensis</i> bv. 3
B21	-	-	+	+	-	+	+	0/8 βοθρία	3/8 βοθρία	<i>B. melitensis</i> bv. 1
B22	-	-	+	+	-	+	+	2/8 βοθρία	2/8 βοθρία	<i>B. melitensis</i> bv. 3
B24	-	-	+	+	-	+	+	2/8 βοθρία	2/8 βοθρία	<i>B. melitensis</i> bv. 3
B26	-	-	+	+	-	+	+	2/8 βοθρία	2/8 βοθρία	<i>B. melitensis</i> bv. 3
B28	-	-	+	+	-	+	+	0/8 βοθρία	3/8 βοθρία	<i>B. melitensis</i> bv. 1

B29	-	-	+	+	-	+	+	0/8 βοθρία	3/8 βοθρία	<i>B. melitensis</i> bv. 1
B30	-	-	+	+	-	+	+	2/8 βοθρία	3/8 βοθρία	<i>B. melitensis</i> bv. 3
B31	-	-	+	+	-	+	+	2/8 βοθρία	2/8 βοθρία	<i>B. melitensis</i> bv. 3
B32	-	-	+	+	-	+	+	2/8 βοθρία	2/8 βοθρία	<i>B. melitensis</i> bv. 3
B33	-	-	+	+	-	+	+	2/8 βοθρία	2/8 βοθρία	<i>B. melitensis</i> bv. 3
B34	-	-	+	+	-	+	+	2/8 βοθρία	2/8 βοθρία	<i>B. melitensis</i> bv. 3
B35	-	-	+	+	-	+	+	2/8 βοθρία	2/8 βοθρία	<i>B. melitensis</i> bv. 3
B36	-	-	+	+	-	+	+	2/8 βοθρία	2/8 βοθρία	<i>B. melitensis</i> bv. 3
B37	-	-	+	+	-	+	+	2/8 βοθρία	2/8 βοθρία	<i>B. melitensis</i> bv. 3
B38	-	-	+	+	-	+	+	2/8 βοθρία	2/8 βοθρία	<i>B. melitensis</i> bv. 3
B39	-	-	+	+	-	+	+	0/8 βοθρία	3/8 βοθρία	<i>B. melitensis</i> bv. 1
B40	+	+	+	+	+	+	+	3/8 βοθρία	0/8 βοθρία	<i>B. abortus</i> bv.3
B42	-	-	+	+	-	+	+	0/8 βοθρία	3/8 βοθρία	<i>B. melitensis</i> bv. 1

4.3. ΔΙΑΚΡΙΣΗ ΑΠΟ ΤΟ ΕΜΒΟΛΙΑΚΟ ΣΤΕΛΕΧΟΣ Rev-1 ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ PCR-RFLP

Τα 73 στελέχη *B. melitensis* που προέκυψαν από τα αποτελέσματα των ταυτοποιήσεων, υποβλήθηκαν στη συνέχεια σε διάκριση από το εμβολιακό στέλεχος Rev-1 χρησιμοποιώντας τη μεθοδολογία PCR-RFLP. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που προέκυψαν, 72/73 στελέχη *B. melitensis* (98,63%) ήταν φυσικά μολυσματικά, καθώς η πέψη του προϊόντος της PCR με το ένζυμο περιορισμού *Pst*I έδωσε δύο θραύσματα μήκους 238 και 44 bp (Εικόνα 9, Διαδρομή 8). Αντίθετα, στο στέλεχος *B. melitensis* B42 (1,37%) και στα τρία εμβολιακά στελέχη Rev-1, που χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες, παρατηρήθηκαν τρία θραύσματα μήκους 282, 238 και 44 bp (Εικόνα 9, Διαδρομές 2, 4, 6 και 10), γεγονός που υποδηλώνει ότι το στέλεχος *B. melitensis* B42 που απομονώθηκε κατά τη διερεύνηση των αποβολών ήταν εμβολιακό και όχι φυσικά μολυσματικό στέλεχος.



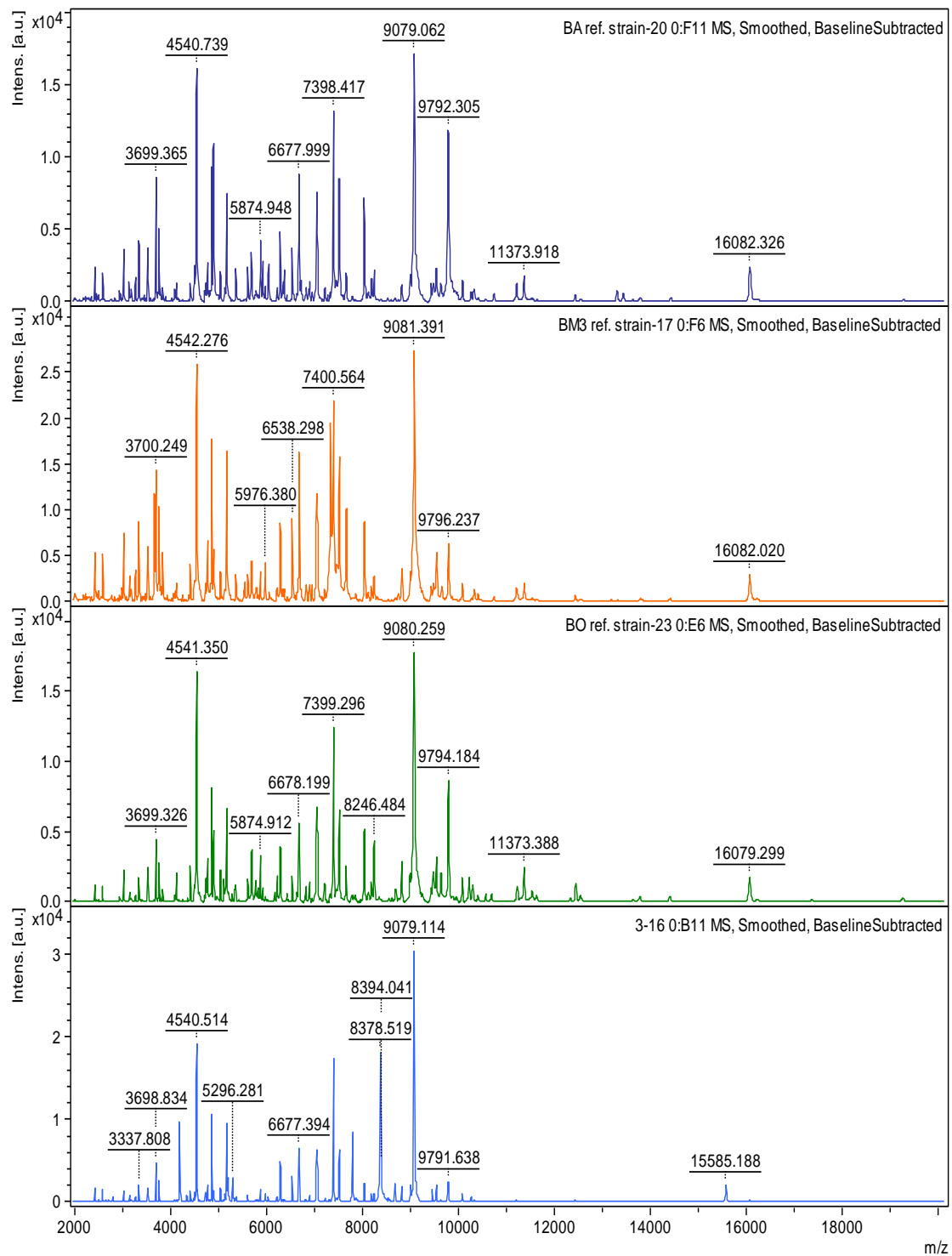
Εικόνα 9: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 3% (w/v) των προϊόντων ενίσχυσης του γονιδίου *omp2* από στελέχη της *B. melitensis*. Διαδρομές 1, 3, 5: Προϊόντα ενίσχυσης PCR από τα εμβολιακά στελέχη Rev-1 (Lot numbers: 163881, 181118 και 181119 αντίστοιχα) πριν από την πέψη με το ένζυμο περιορισμού *Pst*I; Διαδρομές 2, 4, 6: Θραύσματα PCR από τα εμβολιακά στελέχη Rev-1 (Lot numbers: 163881, 181118 και 181119 αντίστοιχα) μετά την πέψη με το ένζυμο περιορισμού *Pst*I; Διαδρομές 7 και 9: Προϊόντα ενίσχυσης PCR από στελέχη *B. melitensis* πριν από την πέψη; Διαδρομή 8: θραύσματα PCR σε φυσικά μολυσματικό στέλεχος *B. melitensis* μετά την πέψη; Διαδρομή 10: θραύσματα PCR στο στέλεχος *B. melitensis* B42 μετά την πέψη (εμβολιακό στέλεχος); M: Μάρτυρας μοριακού μεγέθους 100 bp. Όπως παρατηρούμε και στην εικόνα, το άκοπο τμήμα 282 bp του gDNA καθώς και το μεγαλύτερο θραύσμα πέψης με το ένζυμο περιορισμού *Pst*I (238 bp) διακρίνονται ευκρινώς, ενώ το μικρότερο θραύσμα πέψης (44 bp) είναι μόλις ορατό.

4.4. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΜΕ MALDI-TOF MS

4.4.1. Ταυτοποίηση για τη διάκριση σε επίπεδο είδους

Αρχικά, τα φάσματα των 75 στελεχών της μελέτης συγκρίθηκαν με τα φάσματα της κοινής βάσης δεδομένων της Bruker [Standard Bruker Reference Library (6.093 MSPs)]. Κατά τη σύγκριση αυτή, κανένα αποτέλεσμα ταυτοποίησης δεν προέκυψε στο σύνολο των στελεχών της μελέτης καθώς όλα είχαν score values < 1.600. Στη συνέχεια, τα στελέχη εξετάστηκαν ως προς τη νέα βιβλιοθήκη αναφοράς και διαπιστώθηκε ότι 73/75 στελέχη (97,33%) ταυτοποιήθηκαν ως *Brucella melitensis* και 2/75 στελέχη (2,67%) ταυτοποιήθηκαν ως *B. abortus*. Επιπλέον, 70/75 στελέχη (93,3%) σημείωσαν score values > 2.300, επιτρέποντας την ασφαλή ταυτοποίηση σε επίπεδο είδους, ενώ μόνο 5/75 στελέχη (6,67%) είχαν score values > 2.000-2.300, γεγονός που επιτρέπει την ασφαλή ταυτοποίηση σε επίπεδο γένους και την πιθανή ταυτοποίηση σε επίπεδο είδους ($p < 0,05$). Στην Εικόνα 10 εμφανίζονται τα αντιπροσωπευτικά φάσματα των στελεχών *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. ovis* και *B. suis* που χρησιμοποιήθηκαν στην κατασκευή της βιβλιοθήκης αναφοράς, ενώ στον Πίνακα 11 παρουσιάζονται αναλυτικά τα αποτελέσματα της ταυτοποίησης των 75 στελεχών μαζί με τα score values που σημείωσαν.

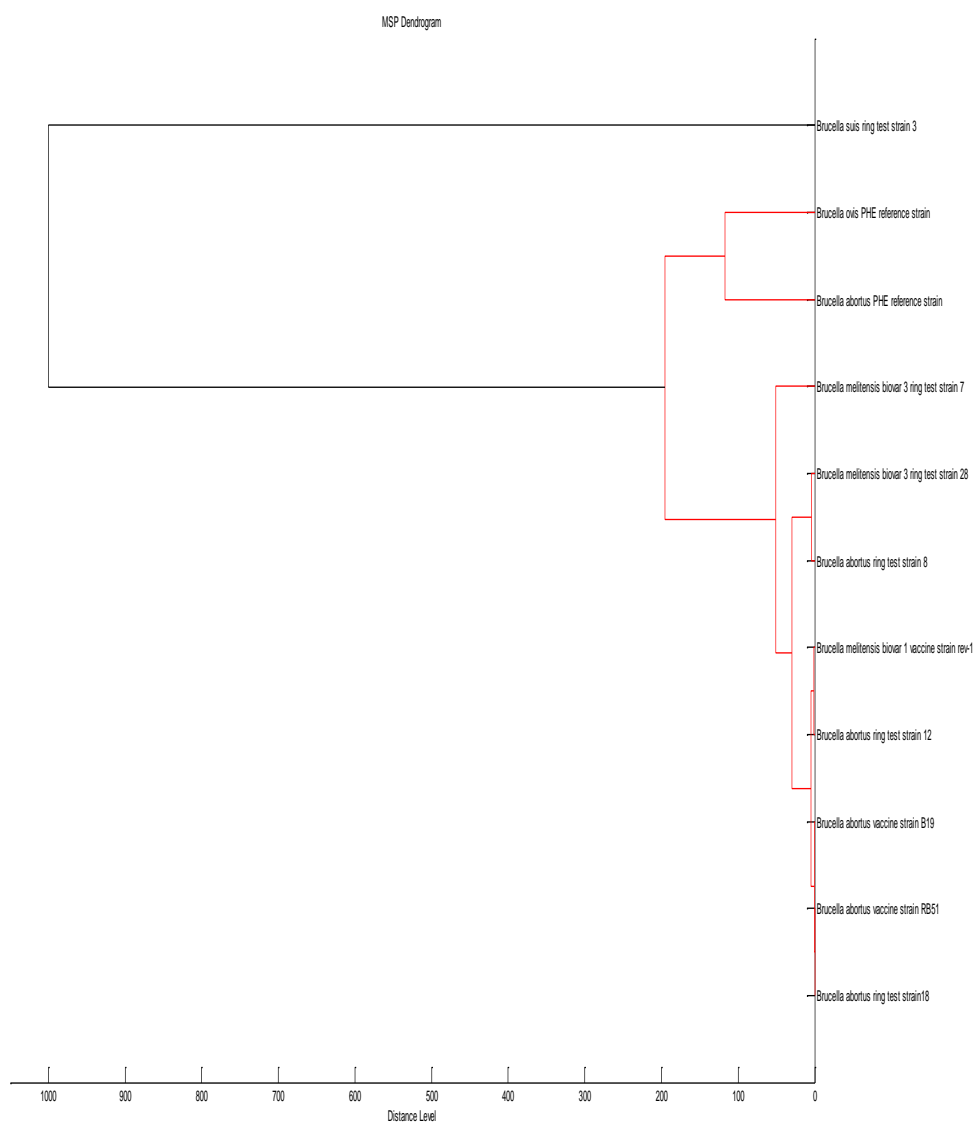
Σύμφωνα με το δενδρόγραμμα ανάλυσης ομάδων (Εικόνα 11), τα 11 πρότυπα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν στην κατασκευή της βάσης δεδομένων, ταξινομήθηκαν σε τρεις κύριες συστάδες με απόσταση 200 au. Η μελέτη των συστάδων αυτών κατέδειξε ότι το είδος *B. suis* ομαδοποιείται σε ξεχωριστή συστάδα και διαφοροποιείται ξεκάθαρα από τα είδη *B. abortus*, *B. melitensis* και *B. ovis*. Αντίθετα, τα στελέχη *B. abortus* και *B. melitensis* (εμβολιακά και μη), εμφανίζουν μεγάλη ομοιότητα και μικρή απόσταση μεταξύ τους διότι ομαδοποιούνται σε κλάδους της ίδιας συστάδας. Εξαίρεση αποτελεί το πρότυπο στέλεχος *B. abortus* 544, το οποίο ταξινομείται μαζί με το είδος *B. ovis* 63/290 στην ίδια ομάδα, καταδεικνύοντας ότι τα δύο αυτά είδη εμφανίζουν μεγάλη ομοιότητα μεταξύ τους.



Εικόνα 10: Πρωτεϊνικά προφίλ για την ταυτοποίηση των ειδών του γένους *Brucella* spp. σε επίπεδο είδους με την αναλυτική μέθοδο MALDI-TOF MS. A: *Brucella abortus*, B: *Brucella melitensis*, C: *Brucella ovis* and D: *Brucella suis*.

Πίνακας 11: Αποτελέσματα ταυτοποίησης στελεχών με τη νέα βιβλιοθήκη αναφοράς της MALDI-TOF MS.

Κωδικός Στελέχους	Αποτέλεσμα ταυτοποίησης	Score value	Κωδικός Στελέχους	Αποτέλεσμα ταυτοποίησης	Score value
K1	<i>B. melitensis</i>	2.396	K39	<i>B. melitensis</i>	2.547
K2	<i>B. melitensis</i>	2.516	K40	<i>B. melitensis</i>	2.037
K3	<i>B. melitensis</i>	2.562	K41	<i>B. melitensis</i>	2.362
K4	<i>B. abortus</i>	2.564	K42	<i>B. melitensis</i>	2.461
K5	<i>B. melitensis</i>	2.526	K43	<i>B. melitensis</i>	2.479
K6	<i>B. melitensis</i>	2.453	T2	<i>B. melitensis</i>	2.555
K7	<i>B. melitensis</i>	2.491	T3	<i>B. melitensis</i>	2.582
K8	<i>B. melitensis</i>	2.535	T4	<i>B. melitensis</i>	2.497
K9	<i>B. melitensis</i>	2.481	T5	<i>B. melitensis</i>	2.516
K10	<i>B. melitensis</i>	2.258	T6	<i>B. melitensis</i>	2.554
K11	<i>B. melitensis</i>	2.530	T8	<i>B. melitensis</i>	2.505
K12	<i>B. melitensis</i>	2.499	T9	<i>B. melitensis</i>	2.581
K13	<i>B. melitensis</i>	2.487	T10	<i>B. melitensis</i>	2.619
K14	<i>B. melitensis</i>	2.439	T13	<i>B. melitensis</i>	2.589
K15	<i>B. melitensis</i>	2.545	T14	<i>B. melitensis</i>	2.556
K16	<i>B. melitensis</i>	2.461	B2	<i>B. melitensis</i>	2.623
K17	<i>B. melitensis</i>	2.501	B7	<i>B. melitensis</i>	2.595
K18	<i>B. melitensis</i>	2.458	B16	<i>B. melitensis</i>	2.579
K19	<i>B. melitensis</i>	2.460	B20	<i>B. melitensis</i>	2.563
K20	<i>B. melitensis</i>	2.581	B21	<i>B. melitensis</i>	2.536
K21	<i>B. melitensis</i>	2.470	B22	<i>B. melitensis</i>	2.509
K22	<i>B. melitensis</i>	2.461	B24	<i>B. melitensis</i>	2.594
K23	<i>B. melitensis</i>	2.506	B26	<i>B. melitensis</i>	2.197
K24	<i>B. melitensis</i>	2.408	B28	<i>B. melitensis</i>	2.094
K25	<i>B. melitensis</i>	2.523	B29	<i>B. melitensis</i>	2.605
K26	<i>B. melitensis</i>	2.532	B30	<i>B. melitensis</i>	2.530
K27	<i>B. melitensis</i>	2.461	B31	<i>B. melitensis</i>	2.579
K28	<i>B. melitensis</i>	2.499	B32	<i>B. melitensis</i>	2.503
K29	<i>B. melitensis</i>	2.500	B33	<i>B. melitensis</i>	2.541
K30	<i>B. melitensis</i>	2.516	B34	<i>B. melitensis</i>	2.578
K31	<i>B. melitensis</i>	2.569	B35	<i>B. melitensis</i>	2.452
K32	<i>B. melitensis</i>	2.606	B36	<i>B. melitensis</i>	2.322
K33	<i>B. melitensis</i>	2.507	B37	<i>B. melitensis</i>	2.513
K34	<i>B. melitensis</i>	2.572	B38	<i>B. melitensis</i>	2.054
K35	<i>B. melitensis</i>	2.509	B39	<i>B. melitensis</i>	2.533
K36	<i>B. melitensis</i>	2.557	B40	<i>B. abortus</i>	2.554
K37	<i>B. melitensis</i>	2.567	B42	<i>B. melitensis</i>	2.426
K38	<i>B. melitensis</i>	2.568			



Εικόνα 11: MSP δενδρόγραμμα πρότυπων στελεχών *Brucella* spp. Η απόσταση δίνεται σε αυ (arbitrary units).

4.4.2. Ταυτοποίηση για τη διάκριση σε επίπεδο βιότυπου

Από τη στατιστική επεξεργασία και συγκριτική ανάλυση των πρωτεϊνικών προφίλ των στελεχών *B. melitensis* με τη βοήθεια του λογισμικού Mass-Up, προέκυψαν συνολικά τέσσερις κορυφές που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως πιθανοί βιοδείκτες για τη διάκριση των τριών βιότυπων της *B. melitensis*. Όπως προκύπτει από τα δεδομένα του Πίνακα 12, οι κορυφές 5207 Da και 9664 Da φαίνεται ότι θα μπορούσαν να αποτελέσουν δυνητικούς βιοδείκτες της *B. melitensis* bn. 2, καθώς εμφανίζονται μόνο στο πρωτεϊνικό προφίλ αυτού του βιότυπου. Για τη διάκριση του βιότυπου 1 από τους άλλους δύο βιότυπους της *B. melitensis*, ως πιθανός βιοδείκτης θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί η κορυφή 8038 Da, η οποία παρατηρείται μόνο στα φάσματα των στελεχών *B. melitensis* bn. 1. Τέλος, η παρουσία της κορυφής 8026 Da στα φάσματα της *B. melitensis* bn. 3 θα μπορούσε να συμβάλει ως πιθανός βιοδείκτης στη διάκρισή του από το βιότυπο 1, ενώ με την ταυτόχρονη απουσία των κορυφών 5207 Da και 9664 Da θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί στο διαχωρισμό του από το βιότυπο 2.

Μετά τον προσδιορισμό των βιοδεικτών για τη διάκριση μεταξύ των τριών βιότυπων της *B. melitensis*, ακολούθησε η αναζήτησή τους στα πρωτεϊνικά προφίλ των στελεχών της μελέτης με απώτερο στόχο την επικύρωση της βιβλιοθήκης. Από την αναζήτηση των ειδικών βιοδεικτών στα φάσματα των στελεχών *B. melitensis* βιότυπου 3 παρατηρήθηκε ότι η μέθοδος MALDI-TOF MS μπορεί να τυποποιήσει συνολικά 47/62 στελέχη (75,81%) ως *B. melitensis* bn. 3. Ωστόσο, η ίδια διαδικασία δε μπόρεσε να πραγματοποιηθεί στα στελέχη των άλλων δύο βιότυπων, καθώς ο αριθμός των στελεχών τους δεν επαρκούσε για την πλήρη αξιολόγηση της διαχωριστικής ικανότητας της μεθόδου.

4.4.3. Διάκριση από το εμβολιακό στέλεχος Rev-1

Η ίδια διαδικασία σύγκρισης των πρωτεϊνικών προφίλ πραγματοποιήθηκε και για την ανεύρεση ειδικών βιοδεικτών που θα μπορούσαν να συμβάλουν στη διάκριση των φυσικά μολυσματικών στελεχών *B. melitensis* από το εμβολιακό στέλεχος Rev-1. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που συνοψίζονται στον Πίνακα 12, καταλήξαμε ότι οι κορυφές 3528 Da και 7328 Da θα μπορούσαν να αξιοποιηθούν δυνητικά ως βιοδείκτες των μολυσματικών και εμβολιακών στελεχών αντίστοιχα. Στη συνέχεια, οι βιοδείκτες αυτοί αναζητήθηκαν στα πρωτεϊνικά προφίλ των στελεχών *B. melitensis* για την επικύρωση της βιβλιοθήκης. Από τα αποτελέσματα που προέκυψαν, διαπιστώθηκε ότι η κορυφή 3528 Da ανιχνεύεται στα φάσματα 72 από τα 73 στελέχη *B. melitensis* (98,63%). Αντίθετα, στο στέλεχος B42 (1,37%) παρατηρήθηκε μόνο η κορυφή 7328 Da, που είναι χαρακτηριστικός βιοδείκτης των εμβολιακών στελεχών Rev-1.

Πίνακας 12: Κορυφές που μπορούν να συμβάλουν στη διάκριση των τριών βιότυπων της *B. melitensis* καθώς και στη διαφοροποίησή τους από το εμβολιακό στέλεχος Rev-1 (p και $q < 0,05$).

m/z (Da)	3528	5207	7328	8026	8038	9664
<i>B. melitensis</i> bv. 1	x				x	
<i>B. melitensis</i> bv. 2	x	x		x		x
<i>B. melitensis</i> bv. 3	x			x		
Rev-1			x		x	

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΣΥΖΗΤΗΣΗ

5.1. ΓΕΝΙΚΑ

Η βρουκέλλωση αποτελεί μία από τις συχνότερες ζωνόσους στην Ελλάδα (ΚΕΕΛΠΝΟ, 2012a). Για την εξάλειψή της στον άνθρωπο είναι απαραίτητη η εκρίζωσή της στο ζωικό πληθυσμό. Στη χώρα μας, εδώ και αρκετές δεκαετίες, εφαρμόζονται προγράμματα ελέγχου και εκρίζωσης της νόσου στα ζώα, χωρίς όμως τα αναμενόμενα αποτελέσματα. Οι αδυναμίες των προγραμμάτων αυτών εντοπίζονται κυρίως στη συχνή υπο-δήλωση του νοσήματος (Bikas et al., 2003; Pappas et al., 2006; WHO, 2006; Avdikou et al., 2005; Jelastopulu et al., 2010; Κοκολάκη & Φανουράκη, 2010; Σπαθή, 2018; Fouskis et al., 2018) και την έλλειψη αξιόπιστων εργαστηριακών τεχνικών που χρησιμοποιούνται στη διάγνωσή της (Nielsen & Yu, 2010; Kuila et al., 2017). Επιπλέον, η αδυναμία διάκρισης του εμβολίου Rev-1 από τα φυσικά μολυσματικά στελέχη *B. melitensis* με τις ορολογικές δοκιμές δυσχεραίνει ακόμη περισσότερο την επιδημιολογική επιτήρηση και αντιμετώπιση της νόσου (Banai et al., 1996; Bardenstein et al., 2002).

Για όλους τους παραπάνω λόγους, κρίνεται απαραίτητη η εφαρμογή ή η ανάπτυξη νέων μεθόδων που χαρακτηρίζονται από υψηλή ακρίβεια, χαμηλό κόστος, άμεση λήψη αποτελεσμάτων, ενώ παράλληλα δεν εμφανίζουν τα προβλήματα ταυτοποίησης των συμβατικών τεχνικών. Η μέθοδος MALDI-TOF MS, αν και χρησιμοποιείται ήδη από τη δεκαετία του 1970 στην κλινική μικροβιολογία (Gantt et al., 1999), έχει περιορισμένη εφαρμογή στη περίπτωση της βρουκέλλωσης. Το γεγονός αυτό αποδίδεται αφενός στις μη πλήρως ενημερωμένες βάσεις δεδομένων λόγω της επικινδυνότητας του μικροοργανισμού και αφετέρου στην αδυναμία υποστήριξης του ακριβούς εξοπλισμού της από τις αναπτυσσόμενες χώρες, όπου η νόσος κυρίως ενδημεί.

Λαμβάνοντας υπόψη, λοιπόν, την τρέχουσα κατάσταση στην Ελλάδα, τη σημασία που έχει η αντιμετώπιση του νοσήματος στη Δημόσια Υγεία και την περιορισμένη χρήση της MALDI-TOF MS στη διάγνωση του νοσήματος, κρίθηκε σκόπιμο να δημιουργηθεί μια βάση δεδομένων ώστε να διερευνηθεί η δυνατότητα της μεθόδου στην ταυτοποίηση των βρουκελλών και την τυποποίηση της *B. melitensis* μέσω

ειδικών βιοδεικτών. Επίσης, δεδομένου ότι δεν υπάρχουν γνωστές μελέτες σε εμάς που να έχουν αξιολογήσει τη μέθοδο MALDI-TOF MS στη διάκριση των φυσικά μολυσματικών στελεχών *B. melitensis* από το εμβολιακό στέλεχος Rev-1, αποφασίστηκε στο πλαίσιο της παρούσας μελέτης να αξιολογηθεί και η σχετική δυνατότητα της μεθόδου.

5.2. ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ ΣΤΗΝ ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΚΑΙ ΤΗΝ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΤΗΣ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Η βιβλιοθήκη αναφοράς που κατασκευάστηκε στην παρούσα μελέτη, βασίστηκε στη χρήση 11 πρότυπων στελεχών *Brucella* spp., εμβολιακών και φυσικά μολυσματικών, τα οποία αντιπροσωπεύουν τα κυριότερα είδη που προσβάλλουν τον άνθρωπο και τα ζώα στη χώρα μας. Σύμφωνα με προηγούμενες αναφορές, τα πιο διαδεδομένα είδη βρουκέλλωσης στην Ελλάδα είναι οι *B. melitensis*, *B. abortus* και *B. suis* (Andriopoulos et al., 2018; Papararaskevas et al., 2018; Σπαθή, 2018). Το είδος *B. onis*, αν και δεν προσβάλλει τον άνθρωπο και η συχνότητα απομόνωσής του από τα πρόβατα είναι σχετικά σπάνια (ΚΕΕΛΠΝΟ, 2012b), θεωρήθηκε σκόπιμο να συμπεριληφθεί στη δημιουργία της βάσης MALDI-TOF MS προκειμένου να ελεγχθεί η δυνατότητα διάκρισής του από τη *B. melitensis*.

Για την επικύρωση της βιβλιοθήκης αναφοράς και την εκτίμηση της διαχωριστικής ικανότητας της μεθόδου συγκεντρώθηκαν συνολικά 75 στελέχη βρουκελλών. Τα στελέχη απομονώθηκαν από ζώα και ασθενείς της ελληνικής περιφέρειας κατά τη χρονική περίοδο 1999-2018. Αν αναλογιστούμε το γεγονός ότι η θεμελίωση της διάγνωσης της νόσου τόσο στον άνθρωπο όσο και στα ζώα πραγματοποιείται κυρίως με τις ορολογικές δοκιμές και ότι η απομόνωση του συγκεκριμένου μικροοργανισμού στις καλλιέργειες είναι εξαιρετικά δύσκολη, ο αριθμός των στελεχών της παρούσας διατριβής θεωρείται αρκετά ικανοποιητικός.

Σε όλα τα στελέχη της μελέτης, πρότυπα και ενδημικά, ως θρεπτικό υπόστρωμα για την εκχύλιση του κλάσματος των ριβοσωμικών πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε το στερεό υπόστρωμα TSA. Η εκλογή αυτή βασίστηκε στις υποδείξεις του κατασκευαστή του οργάνου (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). Σύμφωνα με αυτές, η εκχύλιση των πρωτεϊνών έπρεπε να πραγματοποιηθεί στο ίδιο θρεπτικό

υλικό που χρησιμοποιήθηκε για την εξαγωγή του γενωμικού DNA και τη βιοχημική ταυτοποίηση των στελεχών, ώστε τα αποτελέσματα των επιμέρους τεχνικών να είναι συγκρίσιμα. Επιπλέον, σε αντίθεση με προηγούμενες μελέτες (La Scola & Raoult, 2009; Ferreira et al., 2010; Lista et al., 2011; Measureur et al., 2015; Measureur et al., 2018) αποφεύχθηκε η χρήση αιματούχου άγαρ ή εμπλουτισμού του υποστρώματος με αίμα, καθώς υπήρχε η πιθανότητα οι πρωτεΐνες του αίματος να «επιμολύνουν» το τελικό πρωτεϊνικό προφίλ στα υπό εξέταση στελέχη (Pelzer et al., 2007; Karger et al., 2013).

5.3. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΗΝ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΣΕ ΕΠΙΠΕΔΟ ΕΙΔΟΥΣ – ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΜΕ ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΚΑΙ ΣΥΜΒΑΤΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

Από την ανάλυση των στελεχών με τη μέθοδο MALDI-TOF MS διαπιστώθηκε ότι η νέα βιβλιοθήκη αναφοράς μπορεί να συμβάλει στην ταυτοποίηση των βρουκελλών σε επίπεδο είδους με πολύ υψηλή ακρίβεια σημειώνοντας στην πλειοψηφία των στελεχών υψηλά score values (> 2.300). Αντίστοιχα αποτελέσματα με τη δική μας μελέτη έδωσαν και άλλες έρευνες στο παρελθόν (Lista et al., 2011; Sayour & Sayour, 2015; Measureur et al., 2018; Sali et al., 2018) με μόνη εξαίρεση τη μελέτη της Ferreira και των συνεργατών της το 2010. Σε αυτήν τη μελέτη, η ταυτοποίηση των βρουκελλών πραγματοποιήθηκε μέχρι επίπεδο γένους, γεγονός που αποδόθηκε στην κακή ποιότητα των φασμάτων της βιβλιοθήκης.

Κατά τη σύγκριση των αποτελεσμάτων της MALDI-TOF MS με τα ευρήματα των βιοχημικών δοκιμών ταυτοποίησης καθώς και των μοριακών δοκιμών παρατηρήθηκε απόλυτη συμφωνία ή συμβατότητα (100%). Ωστόσο, η MALDI-TOF MS υπερτερεί σαφώς όσον αφορά την ταχύτητα έκδοσης αποτελεσμάτων, το κόστος και την ασφάλεια του προσωπικού στον παθογόνο μικροοργανισμό.

Ένα ακόμη πλεονέκτημα της MALDI-TOF MS είναι ότι η μέθοδος δεν επηρεάζεται από διασταυρούμενες αντιδράσεις όπως συμβαίνει με τις ορολογικές δοκιμές. Σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες (Gerbier et al., 1997; Al Dahouk et al., 2010; Apostolou et al., 2010; Christopher et al., 2010) οι ορολογικές δοκιμές που χρησιμοποιούνται στη διάγνωση της βρουκέλλωσης, επηρεάζονται συχνά από στενά συγγενικούς μικροοργανισμούς με το γένος *Brucella*, όπως είναι οι *Yersinia*

enterocolitica O:9, *Escherichia hermanni*, *Escherichia coli* O:157, *Salmonella* O:30, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Vibrio cholerae* O:1, *Francisella tularensis*, *Xanthomonas maltophilia* και *Ochrobactrum anthropii*. Από τη σύγκριση των πρωτεϊνικών αποτυπωμάτων των 75 στελεχών της μελέτης με τα φάσματα της κοινής βιβλιοθήκης της Bruker δεν προέκυψε κανένα αποτέλεσμα εσφαλμένης ταυτοποίησης (score values < 1.700), γεγονός που αποδεικνύει ότι τα ψευδώς θετικά αποτελέσματα, που αποδίδονται σε τέτοιου τύπου διασταυρούμενες αντιδράσεις, με τη μέθοδο MALDI-TOF MS αποφεύγονται.

5.4. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ multiplex PCR

Από τα αποτελέσματα της μοριακής ταυτοποίησης των στελεχών με τη multiplex PCR διαπιστώνουμε ότι η μέθοδος μπορεί ξεκάθαρα να συμβάλει στη διάκριση των ειδών *B. melitensis* και *B. abortus* τόσο μεταξύ τους, όσο και από τα είδη *B. onis*, *B. suis* και *B. canis*. Σε περιοχές, όπως η Ελλάδα, όπου η νόσος ενδημεί και υπάρχει μεγάλη ανάπτυξη της αιγο-προβατοτροφίας, η ικανότητα διάκρισης μεταξύ των ειδών *B. melitensis* και *B. onis* μπορεί να αποβεί πολύ σημαντική, καθώς και τα δύο είδη μπορούν να προσβάλουν τα πρόβατα, με διαφορετική όμως λοιμογόνο δύναμη. Η *B. onis* δεν προκαλεί τόσο σημαντικές οικονομικές απώλειες στα ζώα, ενώ παράλληλα δεν προσβάλλει τον άνθρωπο (Tsolis et al., 2009).

Η επικύρωση της multiplex PCR πραγματοποιήθηκε με την αξιολόγηση της ευαισθησίας, της ειδικότητας και της επαναληψιμότητας της μεθόδου. Ο έλεγχος της αναλυτικής και διαγνωστικής ειδικότητας της μεθόδου σημείωσε εξαιρετικά αποτελέσματα, καθώς δε φάνηκε να επηρεάζεται από τους παθογόνους μικροοργανισμούς που χρησιμοποιήθηκαν ως αρνητικοί μάρτυρες (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus megaterium*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri* και *Escherichia coli* 8879). Η επαναληψιμότητα της μεθόδου βρέθηκε άριστη, αφού επιβεβαιώθηκε σε όλα τα δείγματα DNA (μαρτύρων και βακτηριακών στελεχών), τα οποία εξετάστηκαν εις διπλούν την ίδια ημέρα υπό τις ίδιες συνθήκες. Τέλος, η υψηλότερη αναλυτική ευαισθησία της μεθόδου, δηλαδή η ελάχιστη ανιχνεύσιμη συγκέντρωση gDNA βρουκέλλας ήταν 0,1 ng, ευαισθησία αρκετά ικανοποιητική σε σχέση με τα αποτελέσματα προηγούμενων ερευνητών (Fekete et al., 1992; Bricker & Halling, 1994). Ωστόσο, τόσο η διαγνωστική αξία της multiplex PCR όσο και της

Real-Time PCR αποδείχθηκαν άριστες μόνο στις περιπτώσεις που η εξαγωγή του gDNA προερχόταν από προηγούμενη καλλιέργεια του στελέχους. Αντίθετα, σε εξαγωγή του gDNA απευθείας από μολυσμένο ιστό τα αποτελέσματα δε βρέθηκαν ικανοποιητικά, γεγονός που έχει επισημανθεί και σε προηγούμενη μελέτη (Yu & Nielsen, 2010) και αποδίδεται πιθανότατα σε ουσίες-αναστολείς της πολυμεράσης που υπάρχουν στους ιστούς και μειώνουν την ευαισθησία της μεθόδου.

5.5. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΠΟΥ ΠΡΟΚΥΠΤΟΥΝ ΑΠΟ ΤΗ ΒΙΟΧΗΜΙΚΗ ΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ *B. melitensis*

Προκειμένου να αξιολογηθεί η μέθοδος MALDI-TOF MS στη διάκριση των βιότυπων της *B. melitensis*, όλα τα στελέχη αρχικά υποβλήθηκαν σε ανάλυση με τις μεθόδους της κλασσικής μικροβιολογίας. Αν και ο στόχος της εργασίας αυτής δεν είχε επιδημιολογικό χαρακτήρα, θεωρείται σκόπιμο να αξιολογηθούν ορισμένα χρήσιμα στοιχεία που προέκυψαν, δεδομένου ότι υπάρχει ένα επιδημιολογικό κενό στη χώρα μας αναφορικά με τους βιότυπους της *B. melitensis*. Οι λόγοι που συμβάλλουν σε αυτό το κενό είναι η συχνή υπο-δήλωση του νοσήματος, η διάγνωση της νόσου με τις ορολογικές δοκιμές και το γεγονός ότι η διάκριση σε βιότυπους δε θεωρείται απαραίτητη για την έναρξη της θεραπευτικής αγωγής στον άνθρωπο ή τη λήψη μέτρων αντιμετώπισης της βρουκέλλωσης στο ζωικό πληθυσμό.

Από τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, προέκυψε ότι ο επικρατέστερος βιότυπος της *B. melitensis* στη χώρα μας είναι ο βιότυπος 3, ενώ σε μικρότερη κλίμακα απομονώνεται ο βιότυπος 1, γεγονός που συμφωνεί πλήρως με τα ευρήματα άλλων ερευνητών σε χώρες της Μεσογείου και της Μέσης Ανατολής (Benkirane, 2006; Lucero et al., 2006; Samadi et al., 2010; Blasco & Mollina-Flores, 2011; Sayan et al., 2012).

Μία άλλη σημαντική παρατήρηση είναι το γεγονός ότι από το 1993 και έπειτα άρχισε να παρατηρείται αλλαγή στο βιότυπο της *B. melitensis* που απομονωνόταν από ασθενείς. Έτσι, σε αντίθεση με προηγούμενες μελέτες (Τζαμουράνης, 1970; Τσάγκλας 1993) που αναφέρουν ότι μέχρι το 1993 ο επικρατέστερος βιότυπος της *B. melitensis* στον άνθρωπο είναι ο βιότυπος 2, τα αποτελέσματα της δικής μας μελέτης έδειξαν ότι η συχνότητα απομόνωσης του βιότυπου 2 στον άνθρωπο έχει πλέον περιοριστεί και έχει αντικατασταθεί από τον βιότυπο 3 (Πίνακας 10). Το γεγονός

αυτό ενισχύει την άποψη άλλων ερευνητών ότι πολλά στελέχη *B. melitensis* που είχαν ταυτοποιηθεί στο παρελθόν ως βióτυπος 2 ουσιαστικά ανήκουν στο βióτυπο 3, καθώς οι δύο βióτυποι συχνά εμφανίζουν την ιδιότητα να μεταπίπτουν ο ένας στον άλλο (Garin-Bastuji et al., 1998; Samadi et al., 2010).

5.6. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ MALDI-TOF MS ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΗ ΔΥΝΑΤΟΤΗΤΑ ΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ *B. melitensis*

Όπως επισημαίνεται και από άλλους συγγραφείς (Ferreira et al., 2010; Lista et al., 2011; Sayour & Sayour, 2015) η ταυτοποίηση των βρουκελλών σε επίπεδο βióτυπου είναι εξαιρετικά δύσκολη λόγω της υψηλής γενωμικής ομολογίας που παρουσιάζουν τα είδη του γένους μεταξύ τους. Μάλιστα, στο παρελθόν είχε προταθεί η ταξινόμησή τους σε ένα γένος με μοναδικό είδος τη *B. melitensis*, ενώ τα υπόλοιπα είδη να αποτελούν τους βióτυπους της (Vergier et al., 1985). Ωστόσο, η πρόταση αυτή δεν έγινε αποδεκτή από το σύνολο της επιστημονικής κοινότητας εξαιτίας των πολλών διαφορών που παρουσιάζουν τα είδη μεταξύ τους (Moreno et al., 2002).

Στη δική μας μελέτη με τη χρήση ειδικών στατιστικών προγραμμάτων της βιοπληροφορικής καταλήξαμε στον προσδιορισμό τεσσάρων χαρακτηριστικών πρωτεϊνικών κορυφών που θα μπορούσαν να αποτελέσουν πιθανούς βιοδείκτες για τη διάκριση των τριών βióτυπων της *B. melitensis*. Όπως φαίνεται και στον Πίνακα 12, για τη διάκριση της *B. melitensis* bv. 2 μπορούν να χρησιμοποιηθούν δύο πιθανοί βιοδείκτες, ενώ η διάκριση των βióτυπων 1 και 3 ουσιαστικά βασίζεται σε μία μετατόπιση κορυφής που παρατηρείται μεταξύ τους. Παρόμοια αποτελέσματα έχουν παρατηρηθεί κατά την πρωτεομική ανάλυση και άλλων μικροοργανισμών με μεγάλη γενωμική ομολογία (Barbuddhe et al., 2008; Sauget et al., 2014).

Με την αναζήτηση των ειδικών βιοδεικτών στα πρωτεϊνικά προφίλ των στελεχών της μελέτης παρατηρήθηκε ότι η μέθοδος MALDI-TOF MS μπορεί να τυποήσει συνολικά 47 από τα 62 στελέχη *B. melitensis* bv. 3 (75,81%). Αντίθετα, η εκτίμηση της διαχωριστικής ικανότητας για τους άλλους δύο βióτυπους δε μπόρεσε να πραγματοποιηθεί, καθώς τα μόνα διαθέσιμα στελέχη αξιοποιήθηκαν στην κατασκευή της βάσης δεδομένων.

Μέχρι σήμερα υπάρχει μόνο μία αναφορά στην παγκόσμια βιβλιογραφία σχετικά με τη χρήση της MALDI-TOF MS στην τυποποίηση των στελεχών *B. melitensis* (Sayour & Sayour, 2015). Στη μελέτη αυτή, οι ερευνητές κατάφεραν να τυποποιήσουν το 95,19% των στελεχών *B. melitensis* bv. 3, ποσοστό πολύ μεγαλύτερο από αυτό που καταγράφηκε στη δική μας μελέτη. Ωστόσο, οι ίδιοι ερευνητές απόδωσαν το υψηλό αυτό ποσοστό επιτυχίας καθώς και την αδυναμία τους να προσδιορίσουν βιοδείκτες για τον βióτυπο 2 στην απουσία στελεχών *B. melitensis* bv. 2 από την κατασκευή της βάσης τους. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι το ποσοστό που καταγράφηκε στην τυποποίηση των στελεχών *B. melitensis* bv. 3 στο πλαίσιο της δικής μας μελέτης ήταν αρκετά ικανοποιητικό, δεδομένου ότι στη δική μας βάση περιλαμβάνονταν όλοι οι βióτυποι της *B. melitensis*.

5.7. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ MALDI-TOF MS ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΗ ΔΙΑΚΡΙΣΗ ΤΩΝ ΦΥΣΙΚΑ ΜΟΛΥΣΜΑΤΙΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ *B. melitensis* ΑΠΟ ΤΟ ΕΜΒΟΛΙΑΚΟ ΣΤΕΛΕΧΟΣ Rev-1 – ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ PCR-RFLP

Για να αξιολογήσουμε τη δυνατότητα της μεθόδου MALDI-TOF MS να διακρίνει τη φυσική από την εμβολιακή λοίμωξη, ως μέθοδος επιβεβαίωσης επιλέχθηκε η PCR-RFLP. Σύμφωνα με τα όσα αναφέρονται στη βιβλιογραφία, οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για τη διάκριση του εμβολίου Rev-1 από τα φυσικά μολυσματικά στελέχη, είναι η αντοχή του εμβολίου στη στρεπτομυκίνη (Fosgate et al., 2002) και η μεθοδολογία της PCR-RFLP (Bardenstein et al., 2002). Ωστόσο, η πρώτη εμφανίζει αρκετούς περιορισμούς λόγω της αντοχής που παρουσιάζουν πολλά φυσικά στελέχη σε διάφορα αντιβιοτικά (Young et al., 1999). Αντίθετα, με τη μεθοδολογία της PCR-RFLP ο διαχωρισμός αυτός είναι πιο εφικτός. Η ικανότητα αυτή της μεθόδου στηρίζεται στο γεγονός ότι στο εμβολιακό στέλεχος Rev-1, το αλληλόμορφο γονίδιο *omp2a* παρουσιάζει μία σημειακή μετάλλαξη λόγω της αντικατάστασης βάσεως στην αλληλουχία αναγνώρισης της περιοριστικής ενδονουκλεάσης PstI, ενώ στα φυσικά μολυσματικά στελέχη της *B. melitensis* τα δύο αλληλόμορφα γονίδια (*omp2a* και *omp2b*) έχουν ακριβώς την ίδια αλληλουχία βάσεων. Έτσι, η κοπή των προϊόντων ενίσχυσης της PCR στο στέλεχος Rev-1 δίνει τρία θραύσματα (282, 238 και 44 bp), ενώ στα φυσικά μολυσματικά στελέχη δίνει μόνο δύο (238 και 44 bp), συμβάλλοντας

αποτελεσματικά στη μεταξύ τους διάκριση (Bardenstein et al., 2002; Μήτκα, 2005; Noutsios et al., 2012).

Από τη σύγκριση των πρωτεϊνικών προφίλ των πρότυπων στελεχών *B. melitensis* και των τριών εμβολιακών στελεχών Rev-1 προέκυψαν δύο κορυφές που φαίνεται ότι θα μπορούσαν να συμβάλουν στη μεταξύ τους διάκριση. Κατά την αναζήτηση των βιοδεικτών αυτών στα 73 στελέχη *B. melitensis* διαπιστώθηκε ότι σε 72 στελέχη υπήρχε η πρωτεϊνική κορυφή 3528 Da, χαρακτηριστική των μολυσματικών στελεχών, ενώ στο στέλεχος B42 ανιχνεύτηκε μόνο η κορυφή 7328 Da, χαρακτηριστική των εμβολιακών στελεχών (Πίνακας 12). Αντίστοιχη εικόνα με το στέλεχος B42 έδωσαν και τα τρία εμβολιακά στελέχη Rev-1, που χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες. Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα της MALDI-TOF MS με τα ευρήματα της PCR-RFLP διαπιστώθηκε συμφωνία στο ανώτατο επιτρεπτό επίπεδο (100%), αποδεικνύοντας ότι η μέθοδος MALDI-TOF MS θα μπορούσε μέσω ειδικών βιοδεικτών να συμβάλει στη διάκριση της φυσικής λοίμωξης από το εμβολιακό στέλεχος Rev-1.

Η δυνατότητα αυτή της μεθόδου MALDI-TOF MS είναι ιδιαίτερα σημαντική για δύο λόγους. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, ο εμβολιασμός των ζώων με το στέλεχος Rev-1 προκαλεί ανοσολογική απάντηση καθιστώντας αδύνατο το διαχωρισμό του από τη φυσική λοίμωξη με τις συνήθεις ορολογικές δοκιμές (Banai et al., 1996). Επομένως, με την ένταξη της μεθόδου MALDI-TOF MS στην καθημερινή διαγνωστική προσέγγιση της νόσου, θα μπορούσαν τέτοιου τύπου προβλήματα να ξεπεραστούν συμβάλλοντας παράλληλα στην οριστική αντιμετώπιση του νοσήματος στη χώρα μας. Ο δεύτερος σημαντικός λόγος είναι ότι θα μπορούσε να συμβάλει στην άμεση έναρξη της κατάλληλης θεραπευτικής αγωγής στον άνθρωπο. Όπως είναι γνωστό, στον άνθρωπο το εμβόλιο προκαλεί νόσο με ήπια κλινική εικόνα με αποτέλεσμα την καθυστερημένη προσέλευσή του στο νοσοκομείο και τη συχνή μετάπτωση της νόσου σε χρόνια μορφή. Επίσης, το εμβόλιο εμφανίζει αντοχή στη στρεπτομυκίνη, ένα αντιβιοτικό που συμμετέχει σχεδόν σε όλα τα θεραπευτικά σχήματα της βρουκέλλωσης στον άνθρωπο. Επομένως, η έγκαιρη διάγνωση της νόσησης του ασθενούς από το εμβόλιο θα μπορούσε να οδηγήσει στην άμεση έναρξη της

κατάλληλης θεραπευτικής αγωγής σε αυτόν, αποφεύγοντας με αυτόν τον τρόπο τις υποτροπές και τις μακροχρόνιες επιπτώσεις στην υγεία του.

5.8. ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΜΕΛΕΤΗΣ

Ένας βασικός περιορισμός της μελέτης θεωρείται η ανάγκη προτυποποίησης της μεθόδου MALDI-TOF MS. Όπως επισημαίνεται και από άλλους ερευνητές (Williams et al., 2003; Wunschel et al., 2005; Vargha et al., 2006; Freiwald & Sauer, 2009), η αναπαραγωγιμότητα της μεθόδου (ενδο- και διεργαστηριακή) και η ποιότητα των παραγόμενων φασμάτων επηρεάζονται σε μεγάλο βαθμό από παράγοντες όπως είναι τα πρωτόκολλα καλλιέργειας του δείγματος και εκχύλισης των πρωτεϊνών, η επιλογή του χημικού υποστρώματος και του διαλύτη, οι παράμετροι του οργάνου και τα στατιστικά προγράμματα επεξεργασίας και ανεύρεσης των πρωτεϊνικών κορυφών. Πολλές φορές φάσματα του ίδιου μικροοργανισμού μπορεί να εμφανίζουν διαφορές, γεγονός που θεωρείται αναμενόμενο αν λάβουμε υπόψη ότι όλα τα φάσματα αντανακλούν την έκφραση πρωτεϊνών ενός γονιδιώματος. Ωστόσο, θεωρούμε ότι η πιστή εκτέλεση των πρωτοκόλλων και η χρήση προηγμένων εργαλείων βιοπληροφορικής με εξειδικευμένα λογισμικά προγράμματα επεξεργασίας και ανάλυσης δεδομένων μπορούν να συμβάλουν στην παραγωγή ποιοτικών φασμάτων και τη λήψη αποτελεσμάτων υψηλής ακρίβειας.

Ένας επιπλέον περιοριστικός παράγοντας της μελέτης ενδεχομένως να είναι ο μικρός αριθμός των στελεχών *B. melitensis* βιότυπου 1 και 2, που συγκεντρώθηκε για τις ανάγκες του πειράματος και δεν επέτρεψε την πλήρη αξιολόγηση της διαχωριστικής ικανότητας της μεθόδου. Ενδεικτικά αναφέρεται ότι αν ο αριθμός των στελεχών αυτών ήταν μεγαλύτερος, ενδεχομένως να προέκυπταν περισσότεροι στατιστικά σημαντικοί βιοδείκτες, γεγονός που θα βελτίωνε σημαντικά τη διαχωριστική ικανότητα της μεθόδου.

5.9. ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ ΓΙΑ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΈΡΕΥΝΑ

Με βάση τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, μελλοντικές έρευνες θα μπορούσαν ενδεχομένως να εστιάσουν στη διερεύνηση της επίδρασης ορισμένων παραμέτρων όπως είναι το stress, η ανοσολογική αντίδραση του ξενιστή και η χορήγηση αντιμικροβιακών φαρμάκων στην πρωτεϊνική έκφραση των

μικροοργανισμών. Περαιτέρω διερεύνησης χρήζουν επίσης και ορισμένοι παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν την αναπαραγωγιμότητα της μεθόδου και δεν ελέγχθηκαν στο πλαίσιο της παρούσας μελέτης. Τέλος, θα ήταν πολύ χρήσιμο να απομονωθούν νέα στελέχη βρουκελλών με στόχο τη συμπληρωματική ενημέρωση της βιβλιοθήκης αναφοράς με νέα φάσματα. Το γεγονός αυτό θα μπορούσε να βελτιώσει τη μέθοδο αυξάνοντας παράλληλα τη δυναμική της στην ταυτοποίηση των βρουκελλών σε επίπεδο είδους και βιότυπου.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

1. Η μέθοδος MALDI-TOF MS κατάφερε να ταυτοποιήσει με υψηλή ακρίβεια όλα τα στελέχη της μελέτης παρέχοντας συγκρίσιμα αποτελέσματα με εκείνα των μοριακών και βιοχημικών δοκιμών. Ωστόσο, η μέθοδος MALDI-TOF MS πλεονεκτεί έναντι των άλλων τεχνικών ως προς το χρόνο έκδοσης των αποτελεσμάτων (<1 λεπτό / δείγμα), το κόστος ανάλυσης και την έκθεση του προσωπικού στον παθογόνο μικροοργανισμό, χαρακτηριστικά που την καθιστούν ιδανική για εφαρμογή στην καθημερινή διάγνωση της βρουκέλλωσης.
2. Η ακρίβεια της μεθόδου MALDI-TOF MS δεν επηρεάζεται από άλλους μικροοργανισμούς που φέρουν κοινούς αντιγονικούς επιτόπους με τις βρουκέλλες. Το γεγονός αυτό προσδίδει στη μέθοδο μία υπεροχή έναντι των ορολογικών δοκιμών καθώς αποφεύγονται τα ψευδώς θετικά αποτελέσματα που δυσχεραίνουν τη διάγνωση της νόσου.
3. Παρά τη μεγάλη γενωμική ομολογία που παρατηρείται μεταξύ των ειδών του γένους *Brucella*, η μέθοδος MALDI-TOF MS θα μπορούσε να συμβάλει μέσω της χρήσης ειδικών πρωτεϊνών-βιοδεικτών στην τυποποίηση των στελεχών της *B. melitensis*. Έτσι, θα μπορούσε να συμβάλει στην παρακολούθηση του νοσήματος, την ανίχνευση πιθανών επιδημικών εξάρσεων και τον προγραμματισμό προληπτικών μέτρων ή δράσεων παρέμβασης.
4. Η μέθοδος MALDI-TOF MS θα μπορούσε με τη χρήση ειδικών βιοδεικτών να συμβάλει στη διάκριση του εμβολιακού στελέχους Rev.1 από τα φυσικά μολυσματικά στελέχη της *B. melitensis*. Το γεγονός αυτό έχει τεράστια σημασία στα προγράμματα αντιμετώπισης και επιδημιολογικής επιτήρησης

της νόσου αλλά και στην άμεση χορήγηση κατάλληλης θεραπευτικής αγωγής στους ασθενείς. Παρόμοια αποτελέσματα προέκυψαν και από την ανάλυση των στελεχών με τη μέθοδο PCR-RFLP που επιβεβαίωσαν τα αποτελέσματα προηγούμενων ερευνών στο Ισραήλ (Bardenstein et al., 2002) και την Ελλάδα (Μήτκα, 2005; Noutsios et al., 2012). Ωστόσο, η μέθοδος MALDI-TOF MS πλεονεκτεί έναντι της μοριακής τεχνικής PCR-RFLP δεδομένου ότι είναι άμεση, οικονομική και δεν απαιτεί εξειδίκευση του προσωπικού που τη χρησιμοποιεί.

5. Η βάση δεδομένων που κατασκευάστηκε στο πλαίσιο της παρούσας μελέτης, θα μπορούσε να αξιοποιηθεί μελλοντικά και στην ανάλυση δειγμάτων από αναπτυσσόμενες χώρες όπου η νόσος ενδημεί και δεν υπάρχει η δυνατότητα αγοράς μιας τόσο σύγχρονης τεχνολογίας. Ωστόσο, απαραίτητη προϋπόθεση είναι η πιστή εκτέλεση των προαναφερθέντων πρωτοκόλλων και η αποστολή μικροβιολογικά ασφαλών δειγμάτων, τηρώντας αυστηρά τους διεθνείς κανονισμούς περί μεταφοράς επικίνδυνων υλικών.
6. Κατά τη βιοτύπηση των στελεχών της *B. melitensis* με τις μεθόδους της κλασσικής μικροβιολογίας καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι ο επικρατέστερος βióτυπος της *B. melitensis* στη χώρα μας για το χρονικό διάστημα 1996-2018 τόσο στα ζώα όσο και στον άνθρωπο είναι ο βióτυπος 3. Σε μικρότερη κλίμακα απομονώνεται ο βióτυπος 1, ενώ ο βióτυπος 2 που μέχρι το 1993 ήταν ο επικρατέστερος στον άνθρωπο, έχει πλέον εξαφανιστεί.
7. Το πρωτόκολλο της multiplex PCR που αναπτύχθηκε στο πλαίσιο της παρούσας έρευνας και χρησιμοποιήθηκε στην ανάλυση και ταυτοποίηση των στελεχών της μελέτης, παρουσίασε αποτελέσματα υψηλής ακρίβειας ενώ παράλληλα εμφάνισε ικανοποιητική ευαισθησία, ειδικότητα και επαναληψιμότητα. Ωστόσο, τα αποτελέσματα βρέθηκαν ικανοποιητικά μόνο στην περίπτωση που η εξαγωγή του gDNA πραγματοποιούνταν ύστερα από προηγούμενη καλλιέργεια των στελεχών. Όταν η εξαγωγή γενωμικού διενεργούνταν απευθείας από το ύποπτο δείγμα η ευαισθησία και η ειδικότητα της μεθόδου επηρεάζονταν σημαντικά.

Βιβλιογραφία

Διεθνής Βιβλιογραφία

1. **Aguado, J. M., Barros, C., Gomez Garces, J. L. and Fernandez-Guerrero, M. L.** (1987) Infective aortitis due to *Brucella melitensis*. *Scand J Infect Dis.* 19, 483-484
2. **Al Dahouk, S., Tomaso, H., Nöckler, K., Neubauer, H. and Frandoulidis, D.** (2003a) Laboratory-based Diagnosis of Brucellosis-A Review of the Literature. Part I: Techniques for Direct Detection and Identification of *Brucella* spp. *Clin Lab.* 49, 487-505
3. **Al Dahouk, S., Tomaso, H., Nöckler, K., Neubauer, H. and Frandoulidis, D.** (2003b) Laboratory-Based Diagnosis of Brucellosis—A Review of the Literature. Part II: Serological Tests for Brucellosis. *Clin Lab.* 49, 577-589
4. **Al Dahouk, S., Nöckler, K. and Tomaso, H.** (2010). *Brucella*. In: D. Liu, ed., *Molecular Detection of Foodborne Pathogens*. Boca Ratón: CRC Press, pp.317-327
5. **Al Dahouk, S., Sprague, L. D. and Neubauer, H.** (2013) New developments in the diagnostic procedures for zoonotic brucellosis in humans. *Rev sci tech Off Int Epiz.* 32(1), 177-188
6. **Aldomy, F. M., Jahans, K. L. and Itarazi, Y. H.** (1992) Isolation of *B. melitensis* from aborting ruminants in Jordan. *J Comp Pathol.* 107, 239-42
7. **Alivisatos, G. P. and Edipides, T.** (1953) Reaction of Goats' Milk with Stained Antigens in the Detection of Brucellosis. *Bull World Hlth Org.* 9, 871-876

8. **AlShaalan, M. A., Alalola, S. A., Almuneef, M. A., Albanyan, E. A., Balkhy, H. H., AlShahrani, D. A. et al.** (2014) Brucellosis in children: Prevention, diagnosis and management guidelines for general pediatricians endorsed by the Saudi Pediatric Infectious Diseases Society (SPIDS) *International Journal of Pediatrics and Adolescent Medicine* 1, 40-46
9. Alton, G. G., Jones, L. M. and Pietz, D. E. (1975) Laboratory Techniques in Brucellosis, 2nd Edition, World Health Organization, Geneva. 1-163
10. Alton, G. G., Jones, L. M., Angus, R. D. and Verger, J. M. (1988) Techniques for the brucellosis laboratory, INRA Publications, Paris, France. 1-190
11. Alton, G. G. (1990). *B. melitensis*. In: Nielsen and Duncan, eds., *Animal Brucellosis*. Boca Raton: CRC Press, pp.383-409
12. **Ananiades, B. and Miaoulis, N.** (1931) L'avortement epizootique des brebis en Grece. *Ren Gen Med Vet.* 40, 626-721
13. **Andriopoulos, P., Floros, D., Gioti, N., Mariolis, A., Rojas Gil, A. P. and Tsironi, M.** (2018) *Brucella* Seroprevalence in a High-Risk Population in Greece: A Cross-Sectional Study. *Interdiscip Perspect Infect Dis*. Article ID 8751921, 1-6 <https://doi.org/10.1155/2018/8751921>
14. **Apostolou, F., Liberopoulos, E. and Elisaf, M.** (2010) New aspects in the diagnosis and treatment of *Brucella* infection. *Archives of Hellenic Medicine* 27(1), 37-47
15. **Ariza, J., Corredoira, J., Pallares, R., Viladrich, P. F., Rufi, G., Pujol, M. et al.** (1995) Characteristics of and risk factors for relapse of brucellosis in humans. *Clin Infect Dis.* 20, 1241-1249

- 16. Avdikou, I., Maipa, V. and Alamanos, Y.** (2005) Epidemiology of human brucellosis in a defined area of Northwestern Greece. *Epidemiol Infect.* 133, 905-910.
- 17. Bang, B.** (1897) The etiology of epizootic abortion. *J Comp Path Therap.* 10, 125
- 18. Barbuddhe, S., Maier, T., Schwarz, G., Kostrzewa, M., Hof, H., Domann, E.** et al. (2008) Rapid Identification and Typing of *Listeria* Species by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight Mass Spectrometry. *Appl Environ Microbiol.* 74(17), 5402-5407
- 19. Bardenstein, S., Mandelboim, M., Ficht, T. A., Baum, M. and Banai, M.** (2002) Identification of the *Brucella melitensis* vaccine strain Rev.1 in animals and humans in Israel by PCR analysis of the PstI site polymorphism of its omp2 gene. *J Clin Microbiol.* 40(4), 1475–1480
- 20. Behan, K. A. and Klein, G. E.** (1982) Reduction of *Brucella* species and *Francisella tularensis* cross-reacting agglutinins by dithiothreitol. *J Clin Microbiol.* 16, 756-757
- 21. Benkirane, A.** (2006) Ovine and caprine brucellosis: world distribution and control/eradication strategies in West Asia/North Africa region. *Small Rumin Res.* 62, 19–25
- 22. Berberon, P., Gonzales-Fajardo, J., Mangialardi, N. and Courbier, R.** (1992) False aneurysm of the abdominal aorta due to *Brucella suis*. *Ann Vasc Surg.* 6, 460-463

- 23. Bercovich, Z., Goler, L., Baysal, T., Schreuder, B. E. C. and Zijderveld, F. G.** (1998) Evaluation of the current used diagnostic procedures for the detection of *Brucella melitensis* in sheep. *Small Rumin Res.* 31(1), 1-6
- 24. Biancifiori, F., Nannini, D., Di Matteo, A. and Belfiore, P.** (1996) Assessment of an indirect ELISA in milk for the diagnosis of ovine brucellosis. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 19, 17–24
- 25. Bikas, C., Jelastopulu, E., Leontsinidis, M. and Kondakis, X.** (2003) Epidemiology of human brucellosis in a rural area of north-western Peloponnese in Greece. *Eur J Epidemiol.* 18, 267-274
- 26. Blasco, J. M., Moriyón, I., Marín, C. and Diaz, R.** (1985). Evaluation of a radial immunodiffusion test for differentiating infected from Rev 1 vaccinated sheep. In: J.M. Verger and R. Plommet, eds., *Brucella melitensis*. Dordrecht: Martinus Nijhoff Publishers, pp.147-154
- 27. Blasco, J. M. and Molina-Flores, B.** (2011) Control and eradication of *Brucella melitensis* infection in sheep and goats. *Vet. Clin. N. Am. (Food Anim. Pract.)* 27, 95–104
- 28. Bricker, B. J. and Halling, S. M.** (1994) Differentiation of *Brucella abortus* bv. 1, 2, and 4, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis*, and *Brucella suis* bv.1 by PCR. *J Clin Microbiol.* 32(11), 2660-2666
- 29. Carbonelle, E., Cécile, M., Bille, E., Day, N., Dauphin, B., Beretti, J. L., et al.** (2011) MALDI-TOF mass spectrometry tools for bacterial identification in clinical microbiology laboratory. *Clin Biochem.* 44, 104-109

- 30. Cardoso, P. G., Macedo, G. C., Azevedo, V. and Oliveira, S. C.** (2006) *Brucella* spp noncanonical LPS: Structure, biosynthesis, and interaction with host immune system. *Microb Cell Fact.* 5, 13
- 31. Carmichael, L. E.** (1967) Contagious abortion in beagles. *Hounds & Hunting* 64, 14-18.
- 32. Caron, E., Peyrard, T., Kohler, S., Cabane, S., Liautard, J. P. and Dornand, J.** (1994) Live *Brucella* spp. fail to induce tumour necrosis factor alpha secretion upon infection of U937-derived phagocytes. *Infect Immun.* 62, 5267-5274
- 33. Casanova, A., Ariza, J., Rubio, M., Masuet, C. and Díaz, R.** (2009) Brucellacapt versus classical tests in the serological diagnosis and management of human brucellosis. *Clin Vaccine Immunol.* 16(6), 844–851
- 34. Cassar, P.** (1992). History of human brucellosis in Malta. In: M. Plommet and M. Lasram, eds., *Prevention of Brucellosis in the Mediterranean Countries: Proceedings of the International Seminar Organized by CIHEAM, CEC, MINAG (Malta)*. Malta: Backhuys Publishers, pp.3-5
- 35. Gaido, A., Salatin, A., Neumann, R., Marinconz, R., Rossetto, C., Aguirre, N., Suárez, V. and Aguirre, D.** (2011). Goat brucellosis: a serological study in flocks from the east of Salta, Argentina. In: *Proceedings of the Brucellosis 2011 International Research Conference (including the 64th Annual Brucellosis Research Conference)*. Argentina: UCA Auditorium, p.94
- 36. Castañeda, M. R.** (1947) A practical method for routine blood cultures in brucellosis. *Proc Soc Exp Biol Med.* 64, 114-115

- 37. Celli, J. and Govel, J. P.** (2004) Organelle robbery: *Brucella* interactions with the endoplasmic reticulum. *Curr Opin Microbiol.* 7, 93–97
- 38. CFSPH** (2009) Ovine and Caprine Brucellosis: *Brucella melitensis*. The Center for Food Security and Public Health. Iowa State University. College of Veterinary Medicine. Ημερομηνία ανάκτησης: 8/05/2015
http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/brucellosis_melitensis.pdf
- 39. Chand, P., Rajpurohit, B. S., Malhotra, A. K. and Poonia, J. S.** (2005) Comparison of milk-ELISA and serum-ELISA for the diagnosis of *Brucella melitensis* infection in sheep. *Vet Microbiol.* 108, 305-311
- 40. Cherkaoui, A., Hibbs, J., Emonet, S., Tangomo, M., Gorard, M., Francois, P. et al.** (2010) Comparison of two Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry methods with conventional phenotypic identification for routine identification of bacteria to the species level. *J Clin Microbiol.* 48(4), 1169-1175
- 41. Christopher, S., Umapathy, B. L. and Ravikumar, K.L.** (2010) Brucellosis: Review on the Recent Trends in Pathogenicity and Laboratory Diagnostics. *J Lab Physicians* 2(2), 55-60
- 42. Claydon, M. A., Davey, S. N., Edwards-Jones, V. and Gordon, D. B.** (1996) The rapid identification of intact microorganisms using mass spectrometry. *Nat Biotechnol.* 14, 1584–1586
- 43. Cloeckert, A., Verger, J. M., Grayon, M. and Vizcaino, N.** (1996) Molecular and immunological characterization of the major outer membrane proteins of *Brucella*. *FEMS Microbiol Lett.* 145, 1-8

- 44. Cloeckaert, A., Grayon, M. and Grepinet, O.** (2000) An *IS711* element downstream of the *bp26* gene is a specific marker of *Brucella* spp. isolated from marine mammals. *Clin Diagn Lab Immunol.* 7(5), 835-839
- 45. Cloeckaert, A., Vizcaíno, N., Paquet, J. Y., Bowden, R. A. and Elzer, P. H.** (2002) Major outer membrane proteins of *Brucella* spp.: past, present and future. *Vet Microbiol.* 90(1-4), 229-247
- 46. Colmenero, J. D., Reguera, J. M., Martos, F., Sánchez-De-Mora, D., Delgado, M., Causse, M., et al.** (1996) Complications associated with *Brucella melitensis* infection: a study of 530 cases. *Medicine (Baltimore)* 75(4), 195-211
- 47. Comerci, D. J., Altabe, S., De Mendoza, D. and Ugalde, R. A.** (2006) *Brucella abortus* synthesizes phosphatidylcholine from choline provided by the host. *J Bacteriol.* 188(5), 1929–1934
- 48. Connolly, J. P., Comerci, D., Aefantis, T. G., Walz, A., Quan, M., Chafin, R., et al.** (2006) Proteomic analysis of *Brucella abortus* cell envelope and identification of immunogenic candidate proteins for vaccine development. *Proteomics* 6, 3767-3780
- 49. Corbel, M.** (1997) Brucellosis: An overview. *Emerg Inf Dis.* 3, 213–21
- 50. Corbel, M.J.** (1998). *Brucella*. In: L. H. Collier, A. Balows, and M. Sussman, eds., *Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections*. New York: Oxford University Press, Inc., pp.829-852
- 51. Corbel, M. J. and MacMillan, A. P.** (1998). Brucellosis. In: L. H. Collier and A. Balows, eds., *Topley & Wilson 's Microbiology and Microbial Infections*. London: Arnold, pp.2039-2068

- 52. Counterman, A. E., Thompson, M. S. and Clemmer, D. E.** (2003) Identifying a protein by MALDI-TOF Mass Spectrometry. An Experiment for the Undergraduate Laboratory. *J Chem Ed.* 80(2), 177-180
- 53. Croxatto, A., Prod'hom, G. and Greub, G.** (2012) Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiol Rev.* 36(2), 380-407
- 54. Cunningham, S. A. and Patel, R.** (2013) Importance of using Bruker's Security-Relevant library for Biotyper Identification of *Burkholderia pseudomallei*, *Brucella* species, and *Francisella tularensis*. *J Clin Microbiol.* 51(5), 1639
- 55. Cutler, S. J., Whatmore, A. M. and Commander, N. J.** (2005) Brucellosis- new aspects of an old disease. *J Appl Microbiol.* 98, 1270-1281
- 56. Dash, N., Al-Zarouni, M., Rattan, A. and Panigrahi, D.** (2012) Misidentification of *Brucella melitensis* as *Bergeyella zoohelcum* by MicroScan WalkAway: A case report. *Med Princ Pract.* 21, 495-497
- 57. Dave, K. A., Headlam, M. J., Wallis, T. P. and Gorman, J. J.** (2011) Preparation and Analysis of Proteins and peptides using MALDI-TOF/TOF Mass Spectrometry. *Curr Protoc Protein Sci.* 16(13), 1-21
- 58. De, B. K., Stauffer, L., Koylass, M. S., Sharp, S. E., Gee, J. E., Helsel, L. O., et al.** (2008) Novel *Brucella* Strain (BO1) Associated with a Prosthetic Breast Implant Infection. *J Clin Microbiol.* 46(1), 43-49
- 59. Dean, A. S., Crump, L., Greter, H., Schelling, E. and Zinsstag, J.** (2012a) Global Burden of Human Brucellosis: A Systematic Review of Disease Frequency. *PLoS Negl Trop Dis.* 6(10), 1-9

- 60. Dean, A. S., Crump, L., Greter, H., Hattendorf, J., Schelling, E. and Zinsstag, J.** (2012b) Clinical Manifestations of Human Brucellosis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS Negl Trop Dis.* 6(12), 1-9
- 61. Deneke, Y., Deb, R. and Ramesh, D.** (2011) Diagnosis of ovine brucellosis using conventional and molecular tools. *Biotechnology International* 4(1), 4-15
- 62. Diaz, R., Jones, L. M., Leong, D. and Wilson, J. B.** (1968) Surface antigens of smooth Brucellae. *J Bacteriol.* 96, 893-901
- 63. Diaz, R., Garatea, P., Jones, L. M. and Moriyón, I.** (1979) Radial immunodiffusion test with a *Brucella* polysaccharide antigen for differentiating infected from vaccinated cattle. *J Clin Microbiol.* 10, 37-41
- 64. Díaz-Aparicio, E., Aragón, V., Marín, C., Alonso, B., Font, M., Moreno, E., Pérez-Ortiz, S., et al.** (1993) Comparative analysis of *Brucella* serotypes A and M and *Yersinia enterocolitica* O:9 polysaccharides for serological diagnosis of brucellosis in cattle, sheep, and goats. *J Clin Microbiol.* 31, 3136-3141
- 65. Drancourt, M., Brouqlli, P. and Raoult, D.** (1997) *Afipia clevelandensis* antibodies and cross-reactivity with *Brucella* spp. and *Yersillia ellierocolilica* O:9. *Clin Diagn Lab Immunol.* 4, 748-752
- 66. ECDC** (2010) Annual Epidemiological Report on Communicable Diseases in Europe 2010. European Centre for Disease Prevention and Control. Stockholm. Ημερομηνία ανάκτησης: 28/05/2015.
http://ecdc.europa.eu/en/publications/publications/1011_sur_annual_epidemiological_report_on_communicable_diseases_in_europe.pdf

- 67. ECDC** (2011) Annual Epidemiological Report on Communicable Diseases in Europe 2011. European Centre for Disease Prevention and Control. Stockholm. Ημερομηνία ανάκτησης: 3/06/2015.
http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/1111_SUR_Annual_Epidemiological_Report_on_Communicable_Diseases_in_Europe.pdf
- 68. Edmonds, M. D., Cloeckert, A. and Elzer, P. H.** (2002) *Brucella* species lacking the major outer membrane protein Omp25 are attenuated in mice and protect against *Brucella melitensis* and *Brucella ovis*. *Vet Microbiol.* 88, 205–221
- 69. Eisenberg, T., Hamann, H. P., Kaim, U., Schlez, K., Seeger, H., Schauerte, N., et al.** (2012) Isolation of Potentially Novel *Brucella* spp. from Frogs. *Appl Environ Microbiol.* 78, 3753-3755
- 70. Elsaghir, A. A. and James, E. A.** (2003) Misidentification of *Brucella melitensis* as *Ochrobactrum anthropi* by API 20NE. *J Med Microbiol.* 52, 441–442
- 71. Enright, F. M.** (1990). The pathogenesis and pathobiology of infection in domestic animals. Animal brucellosis. In: Nielsen and Duncan, eds., Boca Raton: CRC Press, pp.301-320
- 72. Erdenlig, S., Baklan, E. A., Saytekin, A. M. and Karagul, M. S.** (2011) The identification, characterization and distribution of *Brucella* isolates from livestock in Turkey, 2009 to 2011. Ημερομηνία ανάκτησης: 05/10/2016
<http://www.aam.org.ar/brucellosis2011/descargas/brucellosis2011-argentina.pdf>

- 73. Eschenbrenner, M., Wagner, M. A., Horn, T. A., Kraycer, J. A., Mujer, C. V., Hagijs, S., et al.** (2002) Comparative Proteome Analysis of *Brucella melitensis* Vaccine Strain Rev 1 and a Virulent Strain, 16M. *J Bacteriol.* 184(18), 4962-4970
- 74. Espinosa, B. J., Chacaltana, J., Mulder, M., Pía Franco, M., Blazes, D. L., Gilman, R. H., et al.** (2009) Short Report: Comparison of Culture Techniques at Different Stages of Brucellosis. *Am J Trop Med Hyg.* 80(4), 625–627
- 75. European Union Committee** (2001) Serological diagnosis of sheep and goat Brucellosis. Scientific committee on animal health and animal welfare. Ημερομηνία ανάκτησης: 28/05/2015.
https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/sci-com_scah_out59_en.pdf
- 76. Evans, A. C.** (1918) Further studies on *Bacterium abortus* and related bacteria. II. A comparison of *Bacterium abortus* with *Bacterium bronchisepticus* and with the organism which causes Malta fever. *J Infect Dis.* 22, 580
- 77. Ewalt, D. R., Payeur, J. B., Martin, B. M., Cummins, D. R. and Miller, W. G.** (1994) Characteristics of a *Brucella* species from a bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). *J Vet Diagn Invest.* 6, 448-452
- 78. Ewalt, D. R. and Bricker, B. J.** (2000) Validation of the abbreviated *Brucella* AMOS PCR as a rapid screening method for differentiation of *Brucella abortus* field strain isolates and the vaccine strains, 19 and RB51. *J Clin Microbiol.* 38, 3085-3086

- 79. Fadeel, M. A., Hoffmaster, A. R., Shi, J., Pimentel, G. and Stoddard, R. A.** (2011) Comparison of four commercial IgM and IgG ELISA kits for diagnosing brucellosis. *J Med Microbiol.* 60(12), 1767–1773
- 80. Farina, R.** (1985). Current serological methods in *Brucella melitensis* diagnosis. In: J. M. Verger and R. Plommet, eds., *Brucella melitensis*. Dordrecht: Martinus Nijhoff Publishers, pp.139-146
- 81. Farrell, I. D.** (1974) The development of a new selective medium for the isolation of *Brucella abortus* from contaminated sources. *Res Vet Sci.* 16, 280-286
- 82. Fekete, A., Bantle, J. A., Halling, S. M. and Stich, R. W.** (1992) Amplification fragment length polymorphism in *Brucella* strains by use of polymerase chain reaction with arbitrary primers. *J Bacteriol.* 174, 7778-7783
- 83. Fenselau, C. and Demirev, P. A.** (2001) Characterization of intact microorganisms by MALDI mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev.* 20, 157–171
- 84. Fensterbank, R., Pardon, P. and Marly, J.** (1982) Comparison between subcutaneous and conjunctival routes of vaccination with Rev 1 strain against *Brucella melitensis* infection in ewes. *Ann Rech Vet.* 13, 295-301
- 85. Fensterbank, R., Pardon, P. and Marly, J.** (1985) Vaccination of ewes by a single conjunctival administration of *Brucella melitensis* Rev 1 vaccine. *Ann Rech Vet.* 16, 351-356
- 86. Ferreira, L., Castano, S. V., Sanchez-Juanes, F., Gonzales-Cabrero, S., Menegotto, F., Orduna-Domingo, A., et al.** (2010) Identification of *Brucella*

- by MALDI-TOF Mass Spectrometry. Fast and Reliable Identification from agar Plates and Blood Cultures. *PLoS ONE* 5(12), e14235
- 87. Fosgate, G. T., Carpenter, T. E., Chomel, B. B., Case, J. T., De Bess, E. E. and Reilly, K. F.** (2002) Time-space clustering of human brucellosis, California, 1973-1992. *Emerg Infect Dis.* 8, 672-678
- 88. Foster, G., Osterman, B. S., Godfroid, J., Jacques, I. and Cloeckert, A.** (2007) *Brucella ceti* sp. nov. and *Brucella pinnipedialis* sp. nov. for *Brucella* strains with cetaceans and seals as their preferred hosts. *Int J Syst Evol Microbiol.* 57, 2688–2693
- 89. Fouskis, I., Sandalakis, V., Christidou, A., Tsatsaris, A., Tzanakis, N., Tselentis, Y., et al.** (2018) The epidemiology of Brucellosis in Greece, 2007-2012: a ‘One Health’ approach. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 00, 1–12
- 90. Freiwald, A. and Sauer, S.** (2009) Phylogenetic classification and identification of bacteria by mass spectrometry. *Nat Protoc.* 4(5), 732-742
- 91. Gandhi, K., Kumar, A., Sarkar, P., Aghav, A. and Lal, D.** (2013) MALDI-TOF MS: Applications in Dairy and Related Sectors. *Research and Reviews: Journal of Dairy Science and Technology* 2(2), 19-27
- 92. Gantt, S. L., Valentine, N. B., Saenz, A. J., Kingsley, M. T. and Wahl, K. L.** (1999) Use of an internal control for matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry analysis of bacteria. *J Am Soc Mass Spectrom* 10, 1131–1137
- 93. Garcia-Yoldi, D., Marín, C. M., De Miguel, M. J., Muñoz, P. M., Vizmanos, J. L. and López-Goñi, I.** (2006) Multiplex PCR assay for the identification and differentiation of all *Brucella* species and the vaccine strains

- Brucella abortus* S19 and RB51 and *Brucella melitensis* Rev1. *Clin Chem.* 52, 779–781
94. **Garin-Bastuji, B., Blasco, J. M., Grayon, M. and Verger, J. M.** (1998) *Brucella melitensis* infection in sheep: present and future. *Vet. Res.* 29, 255–274
95. **Gerbier, G., Garin-Bastuji, B., Pouillot, R., Very, P., Cau, C., Berr, V. et al.** (1997) False positive serological reactions in bovine brucellosis: evidence of the role of *Yersinia enterocolitica* serotype O:9 in a field trial. *Vet. Res.* 28, 375–383
96. **Giebel, R., Worden, C., Rust, S. M., Kleinheinz, G. T., Robbins, M. and Sandrin, T. R.** (2010) Microbial fingerprinting using Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS): Applications and Challenges. *Adv Appl Microbiol.* 6(71), 149-184
97. **Godfroid, J., Cloeckert, A., Liautard, J. P., Kohler, S., Fretin, D., Walravens, K., et al.** (2005) From the discovery of the Malta fever’s agent to the discovery of a marine mammal reservoir, brucellosis has continuously been a re-emerging zoonosis. *Vet Res.* 36, 313-26
98. **Griffin, L. Y., Agel, J., Albohm, M. J., Arendt, E. A., Dick, R. W., Garrett, W. E., et al.** (2000) Noncontact anterior cruciate ligament injuries: Risk, factors and preventions strategies. *JAAOS* 8, 141-149
99. **Gür, A., Geyik, M. F., Dikici, B., Nas, K., Cevik, R., Sarac, J. et al.** (2003) Complications of brucellosis in different age groups: a study of 283 cases in southeastern Anatolia of Turkey. *Yonsei Med J.* 44(1), 33-44

- 100. Hadjichristodoulou, C., Voulgaris, P., Toulieres, L., Babalis, T., Manetas, S., Goutziana, G. et al.** (1994) Tolerance of the human brucellosis vaccine and the intradermal reaction test for brucellosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 13, 129–134
- 101. Hamdy, M. E. R. and Amin, A. S.** (2002) Detection of *Brucella* species in the milk of infected cattle, sheep, goats and camels by PCR. *Vet J.* 163(3), 299-305
- 102. Hashemi Tabar, G. R. and Jafari, A.** (2014) Preventive and Control Programme for Brucellosis in Human and Animals-A review article. *Journal of Zoonoses.* 1(1), 9-30
- 103. Hinić, V., Brodard, I., Thomann, A., Cvetnić, Ž., Makaya, P. V., Frey, J. et al.** (2008) Novel identification and differentiation of *Brucella melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. canis*, and *B. neotomae* suitable for both conventional and Real-Time PCR systems. *J Microbiol Meth.* 75, 375-378
- 104. Holland, R. D., Wilkes, J. G., Rafii, F., Sutherland, J. B., Persons, C. C., Voorhees, K. J. et al.** (1996) Rapid identification of intact whole bacteria based on spectral patterns using matrix-assisted laser desorption/ionization with time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 10, 1227–1232
- 105. Horrocks, W. H.** (1905) Preliminary note on goats as a means of propagation of Mediterranean Fever. *Proc R Soc.* 76 (series B), 378-384
- 106. Horrocks, W. H. and Kennedy, J. C.** (1906). In: *Goats as a means of propagation of Mediterranean Fever. Reports of the Mediterranean Fever Commission, Part IV.* London: Harrison & Sons, pp.37-69

- 107. Huber, B., Scholz, H. C., Lucero, N. and Busse, H. J.** (2009) Development of a PCR assay for typing and subtyping of *Brucella* species. *Int J Med Microbiol.* 299, 563-73
- 108. Hughes, M. L.** (1897) Mediterranean, Malta or undulant fever, Macmillan & Co, London, UK. 1-10
- 109. Ilhan, Z., Solmaz, H., Aksakal, A., Gulhan, T., Ekin, I. H. and Boynukara, B.** (2008) Detection of *Brucella melitensis* DNA in the milk of sheep after abortion by PCR assay. *Arch Med Vet.* 40, 141-146
- 110. Jelastopulu, E., Merekoulias, G. and Alexopoulos, E. C.** (2010) Underreporting of communicable diseases in the prefecture of Achaia, western Greece, 1999-2004 – missed opportunities for early intervention. *Euro Surveill.* 15:19579
- 111. Jones, L. M., Berman, D. T., Moreno, E., Deyoe, B. L., Gilsdorf, M. J., Huber, J. D. et al.** (1980) Evaluation of a radial immunodiffusion test with polysaccharide B antigen for diagnosis of bovine brucellosis. *J Clin Microbiol.* 12, 753-760
- 112. Jumas-Bilak, E., Michaux-Charachon, S., Bourg, G., Ramuz, M. and Allardet-Servent, A.** (1998) Unconventional genomic organization in the alpha subgroup of the *Proteobacteria*. *J Bacteriol.* 180(10), 2749-2755
- 113. Kalogeropoulou, E., Solbach, W. and Knobloch, J.** (2008) MALDI-TOF mass spectrometry. *Acta Microbiologica Hellenica* 53(5), 258-267
- 114. Karagiannis, I., Mellou, K., Gkolfinopoulou, K., Dougas, G., Theocharopoulos, G., Vourvidis, D. et al.** (2012) Outbreak investigation of brucellosis in Thassos, Greece. *Euro Surveill.* 17(11), pii: 20116

- 115. Karger, A., Melzer, F., Timke, M., Bettin, B., Kostrzewa, M., Nöckler, K. et al.** (2013) Inter-laboratory Comparison of Intact Cell Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) in the Identification and Differentiation of *Brucella* spp. *J Clin Microbiol*. Doi: 10.1128/JCM.01720-13
- 116. Kattar, M. M. Zalloua, P. A., Araj, G. F., Samaha-Kfoury, J., Shbaklo, H., Kanj, S. S. et al.** (2007) Development and evaluation of Real-Time polymerase chain reaction assays on whole blood and paraffin-embedded tissues for rapid diagnosis of human brucellosis. *Diagn Microbiol Infect. Dis.* 59(1), 23-32
- 117. Kim, S., Hameer, D., Ruparel, T., Conrad, G. and Jingyue, J.** (2003) Digital genotyping using molecular affinity and mass spectrometry. *Nat Rev Genet.* 4, 1001-1008
- 118. Kolar, J. and Kral, J.** (1956) Brucellosis in sheep and goats. *CSI Hyg Epid Micro.* 4, 116-124
- 119. Konstantinidis, A., Minas, A., Pournaras, S., Kansouzidou, A., Papastergiou, P., Maniatis, A. et al.** (2007) Evaluation and comparison of fluorescence polarization assay with three of the currently used serological tests in diagnosis of human brucellosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 26, 715-721
- 120. Krishnamurthy, T. and Ross, P. L.** (1996) Rapid identification of bacteria by direct matrix assisted laser desorption/ionization mass spectrometric analysis of whole cells. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 10, 1992–1996

- 121. Kuila, P., Dutta, D., Chakrabarty, U., Chatterjee, D. and Das, S. (2017)**
Comparison of serological tests and PCR for diagnosis of human brucellosis suffering from fever. *Asian J Pharm Clin Res.* 10(5), 109-111
- 122. Kyriazis, I. D., Kambouris, M. E., Poulas, K. and Patrinos, G. P. (2014)**
Molecular techniques for the detection and characterization of microorganisms. *Archives of Hellenic Medicine* 31(1), 23-40
- 123. Lapaque, N., Moriyón, I., Moreno, E. and Gorvel, J. P. (2005)** *Brucella* lipopolysaccharide acts as a virulence factor. *Curr Opin Microbiol.* 8, 60-66
- 124. La Scola, B. and Raoult, D. (2009)** Direct Identification of Bacteria in Positive Blood Culture Bottles by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation Time-of-Flight Mass Spectrometry. *PLoS ONE* 4, e8041
- 125. Lay, J. O. (2001)** MALDI-TOF Mass Spectrometry of bacteria. *Mass Spectrom Rev.* 20, 172-194
- 126. Leal-Klevezas, D. S., Martinez-Vazquez, I. O., López-Merino, A. and Martinez- Soriano, J. P. (1995)** Single-step PCR for detection of *Brucella* spp. from blood and milk of infected animals. *J Clin Microbiol.* 33, 3087-3090
- 127. Leon, C. F. (1994)** Brucellosis ovina y caprina. Office International des Epizooties – OIE, Paris, France. 451
- 128. Lewis, J. K., Wei, J. and Siuzdak, G. (2000).** Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry in Peptide and Protein Analysis. In: R. A. Meyers, ed., *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. Chichester: John Wiley & Sons Ltd, pp.5880-5894
- 129. Lin, J. and Ficht, T. A. (1995)** Protein synthesis in *Brucella abortus* induced during macrophage infection. *Infect Immun.* 63, 1409-1414

- 130. Lista, F., Reubsaet, F. A., De Santis, R., Parchen, R. R., Ad L de Jong, Kieboom, J. et al.** (2011) Reliable identification at the species level of *Brucella* isolates with MALDI-TOF-MS. *BMC Microbiol.* 11, 267
- 131. Lucero, N. E., Ayala, S. M., Escobar, G. I. and Jacob, N. R.** (2008) *Brucella* isolated in humans and animals in Latin America from 1968 to 2006. *Epidemiol. Infect.* 136, 496–503
- 132. Majcherczyk, A. P., McKenna, T., Morellon, P. and Vaudaux, P.** (2006) The discriminatory power of MALDI-TOF mass spectrometry to differentiate between isogenic teicoplanin-susceptible and teicoplanin-resistant strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett.* 255, 233-239
- 133. Mancini, F. R., Bella, A., Graziani, C., Marianelli, C., Mughini-Gras, L., Pasquali, P. et al.** (2014) Trends of human brucellosis in Italy, 1998-2010. *Epidemiol Infect.* 142, 1188–1195
- 134. Mantur, B. G., Biradar, M. S., Bidri, R. C., Mulimani, M. S., Veerappa, K., Kariholu, P. et al.** (2006) Protean clinical manifestations and diagnostic challenges of human brucellosis in adults: 16 years' experience in an endemic area. *J Med Microbiol.* 55, 897-903
- 135. Mantur, B. G., Amarnath, S. K., Parande, A. M., Patil, G. A., Walvekar, R. R., Desai, A. S. et al.** (2011) Comparison of a novel immunocapture assay with standard serological methods in the diagnosis of brucellosis. *Clin Lab.* 57(5-6), 333–341

- 136. Marianelli, C., Martucciello, A., Tarantino, M., Vecchio, R., Iovane, G. and Galiero, G.** (2008) Evaluation of Molecular methods for the Detection of *Brucella* Species in Water Buffalo Milk. *J Dairy Sci.* 91, 3779-3786
- 137. Marín, C. M., Moreno, E., Moriyón, I., Diaz, R. and Blasco, J. M.** (1999) Performance of competitive and indirect enzyme-linked immunosorbent assays, gel immunoprecipitation with native hapten polysaccharide, and standard serological tests in diagnosis sheep brucellosis. *Clin Diagn Lab. Immunol.* 6, 269–272
- 138. Martin Roop II, R., Gaines, J. M., Anderson, E. S., Caswell, C. C. and Martin, D. W.** (2009) Survival of the fittest: how *Brucella* strains adapt to their intracellular niche in the host. *Med Microbiol Immunol.* 198, 221-338
- 139. Massis, F. D., Ancora, M., Atzeni, M., Rolesu, S., Bandino, E., Danzetta, M. L. et al.** (2015) MLVA as an Epidemiological Tool to Trace Back *Brucella melitensis* Biovar 1 Re-Emergence in Italy. *Transbound Emerg Dis.* 62, 463-469
- 140. Mayer-Scholl, A., Draeger, A., Göllner, C., Scholz, H. C. and Nöckler, K.** (2010) Advancement of a multiplex PCR for the differentiation of all currently described *Brucella* species. *J Microbiol Meth.* 80, 112–114
- 141. Megid, J., Mathias, L. A. and Robles, C. A.** (2010) Clinical manifestations of Brucellosis in Domestic Animals and Humans. *Open Vet Sci J.* 4, 119-126
- 142. Memish, Z. A., Mah, M. W., Al-Mahmood, S. A. and Khan, Y.** (2000) *Brucella* bacteraemia: clinical and laboratory observations in 160 patients. *J Infect.* 40, 59-63

- 143. Mesureur, J., Ranaldi, S., Monnin, V., Girard, V., Arend, S., Welker, M. et al.** (2015) A simple and safe protocol for preparing *Brucella* samples for matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry analysis. *J Clin Microbiol* 54, 449–452
- 144. Mesureur, J., Arend, S., Cellière, B., Courault, P., Cotte-Pattat, P.-J., Totty, H., et al.** (2018) A MALDI TOF MS database with broad genus coverage for species-level identification of *Brucella*. *PLoS Negl Trop Dis* 12, e0006874
- 145. Metcalf, H. E., Luchsinger, D. W. and Ray, W. C.** (1994). *Brucellosis*. In: G. W. Beran, ed., *Handbook of Zoonoses 2nd edition Section A: Bacterial, Rickettsial, Chlamydial, and Mycotic*. Boca Ratón, Florida: CRC Press LLC, pp.9-40
- 146. Meyer, K. F. and Shaw, E. B.** (1920) A comparison of the morphologic, cultural and biochemical characteristics of *B. abortus* and *B. melitensis*: studies on the genus *Brucella* novigen I. *J Infect Dis.* 27, 173
- 147. Meyer, M. E. and Cameron, H. S.** (1961) Metabolic characterization of the genus *Brucella*. I. Statistical evaluation of the oxidative rates by which type I of each species can be identified. *J Bacteriol.* 82, 387-395
- 148. Miyasaka, K. C., Daniel D. M., Stone M. L. and Hirshman, P.** (1991) The incidence of knee ligament injuries in general population. *Am J Knee Surg.* 4, 3
- 149. Morales-Otero, P.** (1930) Experimental infection of *Brucella abortus* in man: preliminary report. Puerto Rico. *J Pub Health Trop Med.* 5, 114

- 150. Morata, P., Queipo-Ortuño, M. I., Reguera, J. M., Miralles, F., Lopez-Gonzalez, J. J. and Colmenero J. D.** (2001) Diagnostic Yield of a PCR Assay in Focal Complications of Brucellosis. *J Clin Microbiol* 39, 3743-3746
- 151. Moreno, E., Stackebrandt, E., Dorsch, M., Wolters, J., Busch, M. and Mayer, H.** (1990) *Brucella abortus* 16S rRNA and lipid A reveal a phylogenetic relationship with members of the alpha-2 subdivision of the class *Proteobacteria*. *J Bacteriol.* 172(7), 3569-3576
- 152. Moreno, E., Cloeckaert, A. and Moriyón, I.** (2002) *Brucella* evolution and taxonomy. *Vet Microbiol.* 90, 209–227
- 153. Moriyón, I. and López-Goñi, I.** (1998) Structure and properties of the outer membranes of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis*. *Int Microbiol.* 1, 19-26
- 154. Najum, A. A.** (2014) Diagnosis of *Brucella melitensis* infection in goats' milk by milk ring test & polymerase chain reaction. *Magazin of Al-Kufa University for Biology* 6(1), 1-4
- 155. Navarro, E., Casao, M. A. and Solera, J.** (2004) Diagnosis of human brucellosis using PCR. *Expert Rev Mol Diagn.* 4, 115-123
- 156. Nicoletti, P.** (2010) Brucellosis: Past, Present, and Future. *Sec Biol Med Sci., MASA* 31(1), 21-32
- 157. Nielsen, K.** (2002) Diagnosis of brucellosis by serology. *Vet Microbiol.* 90(1-4), 447-59
- 158. Nielsen, K. and Yu, W. L.** (2010) Serological Diagnosis of Brucellosis. *Sec Biol Med Sci., MASA* 31(1), 65-89

- 159. Noutsios, G. T., Papi, R. M., Ekateriniadou, L. V., Minas, A. and Kyriakidis, D. A.** (2012) Molecular typing of *Brucella melitensis* endemic strains and differentiation from the vaccine strain Rev-1. *Vet. Res. Commun.* 36, 7-20
- 160. O'Callaghan, D. and MacMillan, A.** (2002). *Brucella*. In M. Sussman, ed. *Molecular Medical Microbiology*. Newcastle, UK: Academic Press, pp.1991-2010
- 161. OIE** (2012) **MANUAL OF DIAGNOSTIC TESTS AND VACCINES FOR TERRESTRIAL ANIMALS** (mammals, birds and bees). World Organization for Animal Health. Ημερομηνία ανάκτησης: 2/10/2018
<https://www.oie.int/doc/ged/D12009.PDF>
- 162. Papaparaskevas, J., Kandili, A., Pantazatou, A., Gartzonika, C., Trikka-Graphatos, E., Stathi, A., et al.** (2018) Epidemiology of brucellosis in Greece, 2001-2016. 28th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Madrid, Spain. Ημερομηνία ανάκτησης: 7/01/2019
file:///C:/Users/Lenovo/Downloads/O0409_abstract.pdf
- 163. Pappas, G., Akritidis, N., Bosilkovski, M. and Tsianos, E.** (2005) Brucellosis. *N Engl J Med.* 352, 2325-2336
- 164. Pappas, G., Papadimitriou, P., Akritidis, N., Christou, L. and Tsianos, E. V.** (2006) The new global map of human brucellosis *Lancet Infect Dis.* 6, 91-99
- 165. Pappas, G.** (2010) The changing *Brucella* ecology: novel reservoirs, new threats. *Int J Antimicrob Agents.* 36 Suppl 1, S8-11

- 166.** Pérez-Sancho, M., García-Seco, T., Domínguez, L. and Álvarez, J. (2015) Control of Animal Brucellosis-The Most Effective Tool to Prevent Human Brucellosis. In: M. M. Baddour, ed. *Updates on Brucellosis*. London, UK: IntechOpen, pp. 931-978
- 167.** Perkins, S. D., Smither, S. J. and Atkins, H. S. (2010) Towards a *Brucella* vaccine for humans. *FEMS Microbiol Rev.* 34(3), 379-394
- 168.** Perry, M. B. and Bundle, D. R. (1990). Lipopolysaccharide antigens and carbohydrates of *Brucella*. In: L. D. Adams, ed. *Advances in Brucellosis Research*. Austin, Texas: A&M University, pp.76-88
- 169.** Pishva, E., Salehi, R., Hoseini, A., Kargar, A., Taba, F. E., Hajiyan, M. et al. (2015) Molecular typing of *Brucella* species isolates from Human and livestock bloods in Isfahan province. *Adv Biomed Res.* 4, 104
- 170.** Prince, H. E., López, J., Yeh, C., Tablante, J., Morgan, J., Kaneko, B. et al. (2009) Performance characteristics of the Euroimmun enzyme-linked immunosorbent assay kits for *Brucella* IgG and IgM. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 65(2), 99–102
- 171.** Probert, W. S., Schrader, K. N., Khuong, N. Y., Bystrom, S. L. and Graves, M. H. (2004) Real-Time Multiplex PCR Assay for Detection of *Brucella* spp., *B. abortus*, and *B. melitensis*. *J Clin Microbiol* 42, 1290-1293
- 172.** Queipo-Ortuno, M. I., Colmenero, J. D., Reguera, J. M., García-Ordoñez, M. A., Pachón, M. E., Gonzalez, M. et al. (2005) Rapid diagnosis of human brucellosis by SYBR Green I-based Real-Time PCR assay and melting curve analysis in serum samples. *Clin Microbiol Infect.* 11(9), 713-718

- 173. Rashman, M. S., Uddin, M. J., Park, J. H., Chae, J. S., Rashman, M. B. and Islam, M. A.** (2006) A short history of Brucellosis: Special emphasis in Bangladesh. *Bangl J Vet Med* 4(1), 01-06
- 174. Redkar, R., Rose, S., Bricker, B. and DelVecchio, V.** (2001) Real-Time detection of *Brucella abortus*, *Brucella melitensis* and *Brucella suis*. *Mol Cell Probes* 15(1), 43-52
- 175. Reguera, J. M., Alarcon, A., Miralles, F., Pachon, J., Juarez, C., Colmenero, J. D.** (2003) *Brucella* endocarditis: Clinical, diagnostic, and therapeutic approach. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 22(11), 647-650
- 176. Ribeiro, L., Herr, S., Chaparro, F. and van der Vyver, F. H.** (1990) The isolation and serology of *Brucella melitensis* in a flock of goats in Central Rsa. *Onderstepoort J Vet Res.* 57(2), 143-145
- 177. Rijpens, N. P., Jonnes, G., Van Asbroeck, M., Rossau, R. and Herman, L. M. F.** (1996) Direct detection of *Brucella* spp. in raw milk by PCR and reverse hybridization with 16S-23S rRNA spacer probes. *Appl Environ Microbiol.* 62(5), 1683-1688
- 178. Romero, C. and Lopez-Goñi, I.** (1999) Improved method for purification of bacterial DNA from bovine milk for detection of *Brucella* spp. by PCR. *Appl Environ Microbiol.* 65, 3735-3737
- 179. Ross, H. M., Foster, G., Reid, R. J., Jahans, K. L. and MacMillan, A. P.** (1994). *Brucella* species infection in sea-mammals. *Vet Rec.* 134, 359
- 180. Roushan, M. R. H. and Ebrahimpour, S.** (2015) Human Brucellosis: An Overview. *Caspian J Intern Med.* 6, 46-47

- 181. Roy, S., McElwain, T. F. and Wan, Y.** (2011). A network control theory approach to modeling and optimal control of zoonoses: Case study of brucellosis transmission in sub-Saharan Africa. *PLoS Negl Trop Dis.* 5(10), e1259
- 182. Russo, G., Pasquali, P., Nenova, R., Aleksandrov, T., Ralchev, S., Vullo, V. et al.** (2009) Reemergence of human and animal brucellosis, Bulgaria. *Emerg Infect Dis.* 15(2), 314-316
- 183. Saaedzadeh A., Sharifiyazdi H. & Firouzi R.** (2013) Molecular characterization of *Brucella melitensis* Rev. 1 strain in aborted sheep and goats in Iran. *Comp Clin Path* 22, 409–412. <https://doi.org/10.1007/s00580-012-1424-7>
- 184. Sali, M., De Maio, F., Tarantino, M., Garofolo, G., Tittarelli, M., Sacchini, L. et al.** (2018) Rapid and safe one-step extraction method for the identification of *Brucella* strains at genus and species level by MALDI-TOF mass spectrometry. *PLoS ONE* 13, e0197864. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197864>
- 185. Samadi, A., Ababneh, M. M. K., Giadinis, N. D. and Lafi, S. Q.** (2010a) Ovine & caprine brucellosis (*Brucella melitensis*) in Aborted Animals in Jordanian Sheep and Goat Flocks Volume 2010, *Vet Med Int.* Doi:10.4061/2010/458695
- 186. Samadi, A., Ababneh, M. M. K., Giadinis, N. D. and Lafi, S. Q.** (2010b). Ovine and caprine brucellosis (*Brucella melitensis*). In: D. Hemming, ed., *Animal Science Reviews 2010*. UK: CAB International, pp.171-184

- 187. Santis, R. D., Ciammaruconi, A., Pomponi, A., Fillo, S. and Lista, F.** (2011) *Brucella*: Molecular Diagnostic Techniques in Response to Bioterrorism Threat. *J Bioterr Biodef.* S2:004. Doi: 10.4172/2157-2526.S2-004
- 188. Sauer, S., Freiwald, A., Maier, T., Kube, M., Reinhardt, R. and Kostrzewa, M.** (2008) Classification and identification of bacteria by mass spectrometry and computational analysis. *PLoS ONE* 3, e2843
- 189. Sauget, M., Nicolas-Chanoine, M.-H., Cabrolier, N., Bertrand, X. and Hocquet, D.** (2014) Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry assigns *Escherichia coli* to the phylogroups A, B1, B2 and D. *Int J Med Microbiol.* 304, 977-983
- 190. Sauret, J. M. and Vilissova, N.** (2002) Human brucellosis. *J Am Board Fam Pract.* 34, 540-542
- 191. Sayan, M., Kilic, S. and Ujanik, M. H.** (2012) Epidemiological survey of rifampicin resistance in clinic isolates of *Brucella melitensis* obtained from all regions of Turkey. *J Infect Chemother* 18, 41-46
- 192. Sayour, A. E. and Sayour, H.** (2015) Binomial identification of *Brucella* isolates by MALDI-TOF mass spectrometry. Second Scientific Conference of Food Safety and Technology. Ημερομηνία ανάκτησης: 30/11/2018
https://www.researchgate.net/publication/282443232_Binomial_identification_of_Brucella_isolates_by_MALDI-TOF_mass_spectrometry
- 193. Schlabritz-Loutsevitch, N. E., Whatmore, A. M., Quance, C. R., Koylass, M. S., Cummins, L. B., Dick Jr, E. J., et al.** (2009) A novel *Brucella* isolate

in association with two cases of stillbirth in non-human primates – first report.

J Med Primatol. 38(1), 70-73

- 194. Scholz, H. C., Hubalek, Z., Sedláček, I., Vergnaud, G., Tomaso, H., Al Dahouk, S. et al.** (2008a) *Brucella microti* sp. nov., isolated from the common vole *Microtus arvalis*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 58(Pt 2), 375–382
- 195. Scholz, H. C., Pfeffer, M., Witte, A., Neubauer, H., Al Dahouk, S., Wernery, U. et al.** (2008b) Specific detection and differentiation of *Ochrobactrum anthropi*, *Ochrobactrum intermedium* and *Brucella* spp. by a multi-primer PCR that targets the recA gene. *J Med Microbiol.* 57, 64-71.
- 196. Scholz, H. C., Hofer, E., Vergnaud, G., Le Fleche, P., Whatmore, A. M., Al Dahouk, S. et al.** (2009) Isolation of *Brucella microti* from mandibular lymph nodes of red foxes, *Vulpes vulpes*, in lower Austria. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 9, 153–156
- 197. Scholz, H. C., Nöckler, K., Göllner, C., Bahn, P., Vergnaud, G., Tomaso, H. et al.** (2010) *Brucella inopinata* sp. Nov., isolated from a breast implant infection. *Int J Syst Evol Microbiol.* 60(Pt 4), 801-808
- 198. Seifert, S. H. N.** (1996) *Tropical Animal Health*. London: Kluwer Academic Publishers. pp.356-365
- 199. Shaalan, M. A., Memish, Z. A., Mahmoud, S. A., Alomari, A., Khan, M. Y., Almuneef, M. et al.** (2002) Brucellosis in children: Clinical observations in 115 cases. *Int J Infect Dis.* 6, 182-186
- 200. Shapiro, D. S. and Wong, I. D.** (1999). *Brucella*. In: P. R. Murray, E. J. Baron, M. A. Tenover and R. H. Tenover, eds., *Manual of clinical microbiology*. Washington: ASM Press, pp.625-632

201. Sohn, A. H., Probert, W. S., Glaser, C. A., Gupta, N., Bollen, A. W., Wong, J. D. et al. (2003) Human neurobrucellosis with intracerebral granuloma caused by a marine mammal *Brucella* spp. *Emerg Infect Dis.* 9, 485-488
202. Stableforth, A. W. and Jones, L. M. (1963) Report of the subcommittee on taxonomy of the genus *Brucella*. *Int Bull Bacteriol Nomencl Taxon.* 13(3), 145-158
203. Tsolis, R. M., Seshadri, R., Santos, R. L., Sangari, F. J., García Lobo, J. M., de Jong, M. F. et al. (2009) Genome Degradation in *Brucella ovis* Corresponds with Narrowing of Its Host Range and Tissue Tropism. *PLoS ONE* 4(5), e5519. doi:10.1371/journal.pone.0005519
204. Vargha, M., Takáts, Z., Konopka, A. and Nakatsu, C. H. (2006) Optimization of MALDI-TOF MS for strain level differentiation of *Arthrobacter* isolates. *J Microbiol Methods.* 66(3), 399-409
205. Verger, J. M., Grimont, F., Grimont, P. A. D. and Crayon, M. (1985) *Brucella*, a monospecific genus as shown by deoxyribonucleic acid hybridization. *Int J Syst Bacteriol.* 35, 292-295
206. Whatmore, A. M., Davison, N., Cloeckaert, A., Al Dahouk, S., Zygmunt, M. S., Brew, S. D. et al. (2014) *Brucella papionis* sp. nov., isolated from baboons (*Papio* spp.). *Int J Syst Evol Microbiol.* 64, 4120-4128
207. WHO (2006) Brucellosis in humans and animals. World Health Organization. Geneva. Ημερομηνία ανάκτησης: 25/03/2015
<http://www.who.int/csr/resources/publications/Brucellosis.pdf>

- 208. Williams, T. L., Andrzejewski, D., Lay, J. O., Jr. and Musser, S. M.** (2003) Experimental Factors Affecting the Quality and Reproducibility of MALDI TOF Mass Spectra Obtained from Whole Bacteria Cells. *J Am Soc Mass Spectrom* 14, 342–351
- 209. Wright, A. E. and Semple, D.** (1897) On the employment of dead bacteria in the serum diagnosis of typhoid and Malta Fever. *Br Med J.* i, 1214
- 210. Wunschel, S. C., Jarman, K. H., Petersen, C. E., Valentine, N. B. and Wahl, K. L.** (2005) Bacterial Analysis by MALDI-TOF Mass Spectrometry: An Inter-Laboratory Comparison. *J Am Soc Mass Spectrom.* 16, 456-462
- 211. Yagupsky, P.** (1999) Detection of brucellae in blood cultures. *J Clin Microbiol.* 37, 3437-3442
- 212. Yantzi, D.** (1985) *Brucella melitensis* in Greece: Current situation report. In: J. M. Verger and M. Plommet. eds., *Brucella melitensis*. Dordrecht, Boston, Lancaster: Martinus Nijhoff Publishers, pp. 43-46
- 213. Young, E. J. and Corbel, M. J.** (1989). In: *Brucellosis: Clinical and Laboratory Aspects*. Boca Ratón: CRC Press, p.31
- 214. Young, E. J.** (1999) *Brucella* species. In: V. Yu, T. C. Merigan and S. L. Barriera eds., *Antimicrobial Therapy and Vaccines*. Baltimore: Williams & Wilkins, pp.71-80
- 215. Young, E. J.** (2005). *Brucella* species. In: G. L. Mandell, J. E. Bennett and R. Dolin. eds., *Principles and practice of infectious diseases*. Churchill Livingstone, pp.2669-2674
- 216. Yu, W. L. and Nielsen, K.** (2010) Review of detection of *Brucella* spp. by polymerase chain reaction. *Croat Med J.* 51(4), 306-13

217. Zammit, T. (1905). In: *A preliminary note on the examination of the blood of goats suffering from Mediterranean fever. Reports of the Royal Society of London, Mediterranean Fever Commission, Part III.* London: Harrison and Sons, p.83
218. Zhan, Y. and Cheers, C. (1995) Differential activation of *Brucella*-reactive CD4+ cells by *Brucella* infection or immunization with antigenic extracts. *Infect Immun.* 63, 969-995

Ελληνική Βιβλιογραφία

1. Αρσένη, Α. και Χατζηβασιλείου Μ. (1971). Διαχωρισμός αντιγονικών ποικιλιών της *Brucella melitensis*. Βρουκέλλαι-βρουκελλώσεις. 4^ο Εθνικό Συμπόσιο Μικροβιολογίας, Αθήνα, σελ. 68-76
2. Γιαντζής, Δ. και Καστανίδου, Χ. (1984) Πλήρης ταυτοποίηση στελεχών βρουκέλλας που απομονώθηκαν στη Β. Ελλάδα από πρόβατα, γίδια και βοοειδή. *Ελληνική Κτηνιατρική Εταιρεία* 4, σελ. 165-175
3. Γιαντζής, Δ., Σαρρής, Κ., Μπουρτζή-Χατζοπούλου, Ε., Καστανίδου, Χ. και Παπαδόπουλος Ο. (1988) Ορολογική διάγνωση της βρουκέλλωσης των προβάτων: Σύγκριση μεταξύ των ορολογικών ευρημάτων και της απομόνωσης βρουκελλών από τα πρόβατα. *Δελτίον Ελληνικής Κτηνιατρικής Εταιρείας* 39(2), σελ. 111-116
4. Ερμείδης, Χ. Πάσχος Κ. και Φελώνη, Δ. (2016) Βρουκέλλωση: Σύγχρονη ανασκόπηση της ζωνόσου. *Το Βήμα του Ασκληπιού* 15(2), σελ. 115-149

5. **Κανσουζίδου-Κανακούδη, Α. και Δανηλίδης, Δ. Β.** (1986) Βιολογικοί χαρακτήρες 345 στελεχών βρουκελλών που απομονώθηκαν από ανθρώπους. *Δελτίο της Ελληνικής Μικροβιολογικής Εταιρείας* 31, σελ. 95-102
6. **Κανσουζίδου-Κανακούδη, Α., Μήτκα, Σ. και Δανηλίδης, Δ. Β.** Είδη και βιότυποι βρουκελλών που απομονώθηκαν από ανθρώπους. 17ο Εθνικό Συνέδριο Μικροβιολογίας - Ιατρικής Βιοπαθολογίας, Θεσ/νίκη, 26-28 Απριλίου 1996, Τόμος περιλήψεων, 37
7. **Κανσουζίδου-Κανακούδη, Α., Υφαντίδου, Α., Μήτκα, Σ., Χαριτίδου, Χ., Βάρνης, Θ. και Χαϊδούλη, Ε.** (2002) Αλλαγή στον βιότυπο της βρουκέλλας που προκαλεί νόσο στον άνθρωπο στη Βόρεια Ελλάδα. *Δελτίο της Ελληνικής Μικροβιολογικής Εταιρείας* 47, σελ 385-391
8. Κατσιαούνης, Θ. (1996). Συμβολή στη μελέτη της επιδημιολογίας της βρουκέλλωσης. Αναζήτηση του μικροοργανισμού στο γάλα των μηρυκαστικών. Διδακτορική διατριβή Α.Π.Θ. Θεσσαλονίκη, 1-177
9. **ΚΕΕΛΠΝΟ (Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων)** (2012a) Βρουκέλλωση: Επιδημιολογικά δεδομένα. Ημερομηνία ανάκτησης: 20/12/2016 <http://www2.keelpno.gr/blog/?p=1751>
10. **ΚΕΕΛΠΝΟ (Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων)** (2012b) Πρόγραμμα ελέγχου και εκρίζωσης της βρουκέλλωσης των αιγών και των προβάτων. Ημερομηνία ανάκτησης: 20/12/2016 <http://www2.keelpno.gr/blog/?p=1779>
11. **ΚΕΕΛΠΝΟ (Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων)** (2012c) Μύθοι και αλήθειες για την Βρουκέλλωση. Ημερομηνία ανάκτησης: 20/12/2016 <http://www2.keelpno.gr/blog/?p=1812>

- 12. ΚΕΕΛΠΝΟ (Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων)** (2012d)
Οικολογία της *Brucella* spp. στα τρόφιμα. Ημερομηνία ανάκτησης:
20/12/2016 <http://www2.keelpno.gr/blog/?p=1768>
- 13. ΚΕΕΛΠΝΟ (Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων)** (2012e) Η
βρουκέλλωση στον άνθρωπο: Διάγνωση και θεραπεία. Ημερομηνία
ανάκτησης: 27/04/2018 <http://www2.keelpno.gr/blog/?p=1770>
- 14.** Κοκολάκη, Ε. και Φανουράκη, Ε. (2010). Η βρουκέλλωση σε ανθρώπους και
ζώα στην ανατολική Κρήτη για το χρονικό διάστημα 1998-2008. Επιπτώσεις
στη Δημόσια Υγεία. Μεταπτυχιακή Εργασία Πανεπιστημίου Κρήτης,
Ηράκλειο, 1-152
- 15.** Madad, A. (1979). Μελέτη των ειδικών ανοσοσφαιρινών του ορού στη
βρουκέλλωση του προβάτου. Διδακτορική διατριβή Α.Π.Θ. Θεσσαλονίκη, 1-
97
- 16.** Μήτκα, Σ. (2005). Εκτίμηση των νεότερων μοριακών τεχνικών στην
εργαστηριακή διάγνωση της βρουκέλλωσης. Διδακτορική διατριβή Α.Π.Θ.
Θεσσαλονίκη, 1-215
- 17. Παναγιωτόπουλος, Ε.Κ., Παπανικολάου, Κ.Γ. και Τσακίρης, Α.Κ.** (1974)
Μελέτη επί 12 περιπτώσεων οξείας βρουκελλώσεως. *Ιατρική Επιθεώρηση*
Ενόπλων Δυνάμεων 8, σελ. 137
- 18.** Παπαδόπουλος, Ο. (2003). Λοιμώδη Νοσήματα των Ζώων. Αριστοτέλειο
Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Θεσσαλονίκη, σελ. Β36-Β50 και Π14-Π16
- 19.** Παπαπαναγιώτου, Ι., Δουμπόγιας, Ι. και Κτενίδου, Σ. (1971). Μελέτη
στελεχών *Brucella melitensis* απομονωθέντων εξ ανθρώπων. 4^ο Εθνικό
Συμπόσιο Μικροβιολογίας, Αθήνα, σελ. 77-84

20. Σπαθή, Α. (2018). Αναδρομική μελέτη της επίπτωσης της Βρουκέλλωσης στην ΠΕ Αχαΐας και η επίδραση στη Δημόσια Υγεία. Διπλωματική Εργασία Πανεπιστημίου Πατρών, Πάτρα, σελ. 1-125
21. Στουρνάρα-Τσελεπίδου, Α. (2008). Συμβολή στη μελέτη της ανοσολογικής απάντησης ενήλικων και ανήλικων προβάτων και αιγών με κλασσικές και νεότερες ορολογικές δοκιμές μετά από οφθαλμικό εμβολιασμό με εμβόλιο Rev-1. Διδακτορική Διατριβή Α.Π.Θ. Θεσσαλονίκη, σελ. 1-319
22. Σφηκάκης, Π., Γιαμαρέλλου, Ε., Μπασιάρης, Χ. και Δάϊκος, Γ. (1977) Βρουκελλική οστεοαρθρίτις *in vitro*, δεδομένα επί 25 περιπτώσεων. *Ιπποκράτης* 6, σελ. 15
23. Τζαμουράνης, Ν. (1970). Ενδοκαρδίτις εκ βρουκέλλας. Μελέτη στελεχών απομονωθέντων εκ 4 περιπτώσεων ενδοκαρδίτιδος εκ *Br. melitensis*. Institut Pasteur Hellenique, 31
24. Τσάγκλας, Η. (1993). Οι βρουκελλώσεις στην Ελλάδα. Εξελιξη προγραμμάτων εκκρίζωσης – γεωγραφική κατανομή. *Δελτίο Ελληνικής Κτηνιατρικής Εταιρείας* 44(3), σελ. 269-273
25. ΥΠΑΑΤ (Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης & Τροφίμων) (2014) Βρουκέλλωση (Μελιταίος Πυρετός), 2^η έκδοση. Ημερομηνία ανάκτησης: 14/02/2019
http://www.minagric.gr/images/stories/docs/agrotis/Aigoprobata/meliteos_piretos291214_new.pdf
26. ΥΠΑΑΤ (Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης & Τροφίμων) (2015) Εργαστηριακή Διάγνωση της Βρουκέλλωσης. Ημερομηνία ανάκτησης: 25/09/2018

http://www.minagric.gr/images/stories/docs/agrotis/Aigoprobata/ergastiriakh_diagnosh_broukelosh.pdf

- 27. ΥΠΑΑΤ (Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης & Τροφίμων) (2017)** Εθνικό Πρόγραμμα για την Αντιμετώπιση της Βρουκέλλωσης των Αιγών & των Προβάτων. Ημερομηνία ανάκτησης: 25/09/2018

http://www.minagric.gr/images/stories/docs/agrotis/Aigoprobata/ethniko_programma_broukelosh270717.pdf

- 28. Φούτζηλας, Γ., Σαρρής, Κ., Γεωργιάδης, Ι. και Λεοντίδης, Σ. (1978)** Η βρουκέλλωσις εις ορισμένας περιοχάς της Βορειοδυτικής Ελλάδας. *Ιατρική Επιθεώρηση Ενόπλων Δυνάμεων* 12, σελ. 47-53

- 29. Χατζηχριστοδούλου, Χ. (1997).** Επιδημιολογική διερεύνηση, επιτήρηση και πρόληψη της βρουκέλλωσης σε γεωργοκτηνοτροφική περιοχή της Ελλάδας με τη βοήθεια Μηχανογραφημένης Χαρτογράφησης. Διδακτορική Διατριβή Πανεπιστημίου Κρήτης. Ηράκλειο, σελ. 1-159.