

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΙΑΤΡΙΚΟ ΤΜΗΜΑ
ΤΟΜΕΑΣ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΟΡΟΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΡΙΚΕΤΣΙΩΝ
ΤΗΣ ΟΜΑΔΑΣ ΤΟΥ ΚΗΛΙΔΩΔΟΥΣ ΠΥΡΕΤΟΥ
ΣΤΟ ΝΟΜΟ ΦΩΚΙΔΑΣ**

**ΘΩΜΑ ΑΝΔ. ΜΠΑΜΠΙΛΛΗ
Πτυχιούχου Φαρμακευτικής**

Διδακτορική διατριβή

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 1994

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

(N.5343/1932, άρθρο 202)

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	viii
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	x
ΣΥΝΤΟΜΟ ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ	xi
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ	2
ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ	3
Φαινοτυπική ταξινόμηση	3
Φυλογενετική ταξινόμηση	6
ΒΑΚΤΗΡΙΟΛΟΓΙΑ	9
Μορφολογία και χρώσεις	9
Δομή	9
Μεταβολισμός	11
Καλλιέργεια	12
Αντιγονικά χαρακτηριστικά	13
Στοιχεία γενετικής	14
ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΡΙΚΕΤΣΙΩΝ ΤΗΣ ΟΚΠ	15
ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ	24
Οικολογία	24
Κρότανες	28
Ταξινόμηση	28
Κύκλος ανάπτυξης	31
Γεωγραφική κατανομή	32
Παθογόνες ρικέτσες	32
Μη παθογόνες ρικέτσες	34
Ρικέτσες της ΟΚΠ στην Μεσογειακή λεκάνη	34
Ελλάδα	34
Βουλγαρία	34
Γαλλία	34
Ιταλία	35
Πορτογαλία	35
Ρουμανία	35
Ισπανία	35
Τουρκία	36
Πρώην Γιουγκοσλαβία	36
Ισραήλ	36
Αίγυπτος	36
Τυνησία	37

Εποχιακή κατανομή.....	37
Ηλικία και φύλο.....	37
ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ.....	38
ΑΝΟΣΟΒΙΟΛΟΓΙΑ.....	39
Κυτταρική Ανοσία.....	39
Χυμική ανοσία.....	39
Διασταυρούμενες αντιδράσεις μεταξύ ρικετσιών της ΟΚΠ και ΟΤ.....	40
Διασταυρούμενες αντιδράσεις ρικετσιών με <i>Proteus</i>	41
Διασταυρούμενες αντιδράσεις με <i>Legionella</i>	41
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ.....	42
Άμεση διάγνωση.....	42
Απομόνωση ρικετσιώσεων.....	42
Ενδοπεριτοναϊκός ενοφθαλμισμός του παθολογικού υλικού σε ποντίκι ή αρουραίο.....	42
Εμβρυοφόρα αυγά κοτόπουλου.....	42
Κυτταροκαλλιέργειες.....	43
Ταχεία καλλιέργεια ρικετσιών από τα κυκλοφορούντα μονοκύτταρα αίματος (shell-vial).....	43
Ανίχνευση ρικετσιών.....	43
Ανίχνευση ρικετσιών με ανοσοφθορισμό σε βιονία δέρματος.....	43
Ανίχνευση ρικετσιών σε κυκλοφορούντα ενδοθηλιακά κύτταρα.....	44
Η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης της DNA πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR).....	44
Εμμεση διάγνωση.....	44
Η αντίδραση Weil-Felix.....	45
Η σύνδεση συμπληρώματος.....	45
Η μικροσυγκόλληση.....	45
Η συγκόλληση με latex.....	45
Παθητική αιμοσυγκόλληση.....	46
Εμμεσος ανοσοφθορισμός.....	46
Η δοκιμασία line blot.....	46
ELISA.....	46
Western Blot.....	46
ΠΡΟΦΥΛΑΞΗ.....	47

ΘΕΡΑΠΕΙΑ.....	47
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	48
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	49
ΜΕΡΟΣ ΠΡΩΤΟ.....	52
ΟΡΟΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ.....	52
Συλλογή ορών.....	52
Παραγωγή αντιγόνου.....	54
Κυτταροκαλλιέργειες.....	54
Μόλυνση κυττάρων με ρικέτσιες.....	56
Χρώση Gimenez.....	56
Καθαρισμός ρικετσιών με renografin gradient.....	57
Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των ρικετσιών με την μέθοδο Lowry.....	59
ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	60
Εμμεσος ανοσοφθορισμός.....	60
Ανάλυση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου, παρουσία SDS (SDS-PAGE).....	61
Western blot.....	64
Ευαισθησία, ειδικότητα, θετική και αρνητική διαγνωστική αξία του ΑΦ.....	65
ΜΕΡΟΣ ΔΕΥΤΕΡΟ.....	67
Συλλογή κροτώνων.....	67
Ταξινόμηση των κροτώνων.....	67
Ανίχνευση.....	67
Τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης της DNA πολυμεράσης (PCR).....	67
Επιβεβαίωση του πολ/μου σε πηκτή αγαρόζης.....	71
Δοκιμασία αιμόλεμφο.....	73
Απομόνωση ρικετσιών από την αιμόλεμφο κροτώνων.....	74
Η τεχνική των shell-vial.....	74
Ταυτοποίηση.....	76
Ανοσοποίηση ποντικών για την παραγωγή ορών.....	76
Ανάλυση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου, παρουσία SDS (SDS-PAGE).....	76
Εμμεσος ανοσοφθορισμός ορών ποντικού.....	77
Προσδιορισμός οροτύπου με εφαρμογή της μεθόδου του Philip (1978).....	78
Υδρόλυση των προϊόντων πολ/μου με περιοριστικά ένζυμα (PCR-RFLP).....	79
Ηλεκτροφόρηση πηκτής με ώση πεδίου (Pulsed Field Gel Electrophoresis, PFGE).....	80
Στατιστική ανάλυση.....	84
Σύγκριση με άλλες ρικέτσιες.....	84
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	85
ΜΕΡΟΣ ΠΡΩΤΟ.....	87
ΟΡΟΛΟΓΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ.....	87
Εμμεσος ανοσοφθορισμός.....	87
Western blot.....	88

Ευαισθησία, ειδικότητα, θετική και αρνητική διαγνωστική αξία	91
ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ	93
Κατανομή κατά ηλικία και φύλο	93
Επαγγελματική κατανομή	94
Γεωγραφική κατανομή	96
ΜΕΡΟΣ ΔΕΥΤΕΡΟ	97
Συλλογή και ταξινόμηση των κροτώνων	97
Δοκιμασία αιμολέμφου	98
Πολλαπλασιασμός του γενώματος	98
Απομόνωση και καλλιέργεια ρικετσίων από την αιμόλεμφο	98
Ανάλυση πρωτεϊνών σε πηκτή ακρυλαμίδιου, παρουσία SDS (SDS-PAGE)	100
Western blot	101
Προσδιορισμός οροτύπου με εφαρμογή της μεθόδου του Philip (1978)	102
Υδρόλυση των προϊόντων πολ/μου με περιοριστικά ένζυμα (PCR-RFLP)	103
Ηλεκτροφόρηση πηκτής με ώση πεδίου (Pulsed Field Gel Electrophoresis, PFGE)	105
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	107
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	116
SUMMARY	117
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	118

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

°C:	βαθμοί Κελσίου
ΑΦ:	έμμεσος ανοσοφθορισμός
ATP:	τριφωσφορική αδενοσίνη
bp:	ζεύγη βάσεων
DMSO:	διμεθυλοσουλφοξείδιο
DNA:	δεοξυριβονουκλεϊνικό οξύ
EDTA:	αιθυλενοδιάμινοτετραοξικό οξύ
EtdBr:	βραμιούχο αιθίδιο
GTP:	τριφωσφορική γουανοσίνη
IgA:	ανοσοσφαιρίνη Α
IgG:	ανοσοσφαιρίνη G
IgM:	ανοσοσφαιρίνη Μ
kb:	χιλιοβάσεις
kDa:	χιλιοδαλτον
ΚΠΒΟ:	Κηλιδώδης Πυρετός Βραχωδών Ορέων
ΛΠΣ:	λιποπολυσακχαρίτης
Μ:	μοριακότητα διαλύματος
ΜΒ:	μοριακό βάρος
ΜΚΠ:	Μεσογειακός Κηλιδώδης Πυρετός
NAD:	Νικοτιναμίδο-αδενο-δινουκλεοτίδιο
ΟΚΠ:	Ομάδα Κηλιδωδών Πυρετών
ΟΤ:	Ομάδα Τύφου
PBS:	ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών, (Phosphate Buffer Saline)
PFGE:	Pulsed field gel electrophoresis
SDS-PAGE:	sodium dodecyl sulfate- polyacrylamide gel electrophoresis
SDS:	το μετά νατρίου άλας του θειικού δωδεκυλίου, ανιονικό απορπαντικό
SPA:	Specific Protein Antigen
TEMED:	N,N,N',N'-τετραμεθυλοαιθυλενοδιαμίνη
Tris:	Τρις-(υδροξυ-μεθυλο-)αμινο-μεθάνιο
UV:	υπεριώδες
WB:	Western Blot
WF:	Weil-Felix

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Οι ρικέτσιες είναι ενδοκυττάρια παράσιτα. Οι κηλιδώδεις πυρετοί περιλαμβάνουν ένα ευρύ φάσμα ζωοτικών λοιμώξεων που οφείλονται σε ρικέτσιες που εμφανίζουν μεταξύ τους μεγάλες ομοιότητες και οι οποίες είναι γνωστές με την ονομασία **Spotted Fever Group Rickettsiae (Ρικέτσιες της Ομάδας των Κηλιδωδών Πυρετών)**. Οι ρικέτσιες της ομάδας αυτής μεταφέρονται κυρίως από κρότωνες (κ. τομπκούρια). Από την ομάδα αυτή παθογόνες για τον άνθρωπο θεωρούνται οι: *R. rickettsii*, *R. conorii*, *R. sibirica*, *R. akari*, *R. australis*, *R. japonica*. Αντίθετα οι *R. bellii*, *R. montana*, *R. parkeri*, *R. rhipicephali*, *R. helvetica* και *R. slovaca* δεν έχουν μέχρι σήμερα απομονωθεί από άνθρωπο και ως εκ τούτου θεωρούνται, μέχρι αποδείξεως του εναντίον, ως μη παθογόνες.

Η *R. conorii* βρίσκεται στις περισσότερες χώρες της Δυτικής Μεσογείου. Στην Ανατολική Μεσόγειο η διασπορά της δεν είναι γνωστή εξαιτίας της έλλειψης οροεπιδημιολογικών ερευνών. Η πρόσφατη ανακάλυψη της "*R. israeli*" στο Ισραήλ αποκαλύπτει ότι στην Ανατολική Μεσόγειο υπάρχουν και άλλες ρικέτσιες εκτός από την *R. conorii*. Πιθανά η περιοχή της Ανατολικής Μεσογείου να αποτελεί μεταβατική ζώνη όπου η διερεύνηση των κυκλοφορούντων ρικετσιών εμφανίζει ενδιαφέρον.

Το κυριώτερο εμπόδιο στην εκτέλεση οροεπιδημιολογικών ερευνών οφείλεται στο γεγονός ότι η μελέτη των ρικετσιών προϋποθέτει την εφαρμογή κλασικών μεθόδων καλλιέργειας και ταυτοποίησης, οι οποίες εκτός από χρονοβόρες απαιτούν την ύπαρξη οργανωμένων εργαστηρίων και πολλά υλικά. Πρόσφατα οι τεχνικές άμεσης και έμμεσης διάγνωσης των ρικετσιώσεων βελτιώθηκαν σημαντικά. Η εφαρμογή της ταξιακής καλλιέργειας (shell-vial) στην απομόνωση των ρικετσιών επέτρεψε την αποκάλυψη νέων στελεχών. Ο συνδυασμός της τεχνικής της αλυσωδωτής αντίδρασης της DNA πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) και της επίδρασης περιοριστικών ενζύμων (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP) έδωσε την δυνατότητα προσδιορισμού των γενεακών κατατομών των στελεχών αναφοράς (Regnery et al., 1991). Οι ίδιες τεχνικές επέτρεψαν την ανίχνευση της *R. typhi* σε πειραματικά μολυσμένους ψύλλους. Η εφαρμογή των μεθόδων αυτών σε επιδημιολογικές έρευνες θα συμβάλει στην καλύτερη διερεύνηση του **Μεσογειακού Κηλιδωδούς Πυρετού (ΜΚΠ)** και θα δείξει εάν είναι εφικτή η εφαρμογή τους σε μελέτες πεδίου.

Με την εισαγωγή της δοκιμασίας Western blot η έμμεση ορολογική διάγνωση του ΜΚΠ παρουσίασε σημαντική βελτίωση, γιατί με την μέθοδο αυτή αποκαλύπτονται οι πρωτεΐνες 115- και 135-kDa (Specific Protein Antigen, SPA) που είναι ειδικές της *R. conorii*. Μέχρι σήμερα στις επιδημιολογικές μελέτες ο ανοσοφθορισμός (ΑΦ) συγκέντρωνε τις προτιμήσεις των περισσότερων ερευνητών. Η εφαρμογή όμως της μεθόδου αυτής τόσο στην κλινική διάγνωση όσο και στην αναδρομική διάγνωση παλιών λοιμώξεων προϋποθέτει τον προσδιορισμό της ευαισθησίας, ειδικότητας, της θετικής και αρνητικής διαγνωστικής αξίας.

Ο ΜΚΠ στην Ελλάδα έχει γίνει αντικείμενο δημοσίευσης κλινικών περιστατικών και ορισμένων μόνο επιδημιολογικών ερευνών: των Pateraki, Tselentis & et al, (1970), των Douka-Segditsa et al, (1972) και των Pateraki & Parakyriakou (1973). Στις μελέτες αυτές εφαρμόστηκε η συγκόλληση κατά Giroud. Τεχνική που σήμερα θεωρείται ξεπερασμένη. Από τότε συστηματική οροεπιδημιολογική μελέτη της νόσου λείπει από την ελληνική βιβλιογραφία. Η

οροπεδιμολογική μελέτη του ΜΚΠ απαιτεί την εφαρμογή ευαίσθητων και ειδικών τεχνικών για τον προσδιορισμό της συχνότητας του. Θεωρήσαμε σκόπιμο να εφαρμόσουμε για τον σκοπό αυτό την τεχνική του Western blot. Σαν δεύτερη τεχνική εφαρμόστηκε ο ΑΦ και αυτό γιατί η θετική και αρνητική προγνωστική αξία του δεν έχει ακόμη προσδιορισθεί. Η διερεύνηση του ΜΚΠ επεκτάθηκε επίσης στην αναζήτηση των κυκλοφορούντων ρικετσιών στα αρθρόποδα. Για την ανίχνευση, απομόνωση και ταυτοποίηση των ρικετσιών εφαρμόστηκαν τόσο κλασσικές όσο και τεχνικές μοριακής βιολογίας.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μελέτη εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βακτηριολογίας, Παρασιτολογίας και Ζωονόσων του Ιατρικού Τμήματος του Πανεπιστημίου Κρήτης από το Μάιο του 1989 έως τον Οκτώβρη του 1993 με την καθοδήγηση του Αν. Καθηγητή κ. Τσελέντη Ιωάννη.

Στην πραγματοποίηση της διατριβής αυτής συνετέλεσαν οι παρακάτω στους οποίους εκφράζω τις θερμές μου ευχαριστίες :

- Τον Πανεπιστημιακό Δάσκαλο καθηγητή κ. Τσελέντη Ιωάννη για την ανεκτίμητη προσφορά του στην επιστημονική μου κατάρτιση, το αμέριστο ενδιαφέρον και την συνεχή παρακολούθηση της προσπάθειάς μου, τις πολύτιμες συμβουλές του και γενικώς την πολύπλευρη βοήθειά του στην περάτωση της παρούσης μελέτης.

- Τον καθηγητή κ. Raoul Didier, Διευθυντή της Μονάδας Ρικετσιώσεων της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου της Μασσαλίας και τους συνεργάτες του Vestris Guy, Eremeσνά Marina, Roux Veronique, Tissot-Dupont Herve για την πρόθυμη προσφορά της πολύχρονης πείρας τους στις ρικετίες.

- Την στενή συνεργάτιδα κ. Ψαρουλάκη Άννα γιατί συνέβαλε ουσιαστικά στην εκτέλεση και συγγραφή της εργασίας αυτής.

- Τον ιατρό κ. Χατζηχριστοδούλου Χρήστο για την αγαστή συνεργασία μας στον τομέα της επιδημιολογίας.

- Τον δόκτορα Παπαδόπουλο Βύρωνα για την συνεισφορά του στην συγκέντρωση και ταξινόμηση των κροτώνων.

- Τους συνεργάτες του εργαστηρίου λέκτορα του Ιατρικού Τμήματος ιατρό κ. Χαρθάλου Αικατερίνη, ιατρό κ. Γκίκα Αγγιλέα, βιολόγο κ. Σκούλικα Εφη, κτηνίατρο κ. Μανιατά Ιωάννη και την βιολόγο κ. Σπυριδάκη Ιωάννα.

- Τον κ. Καράγκο Σ. και την κ. Μπακιριτζή Δ. για την καλαισθησία της εργασίας.

- Την οικογένειά μου και την Ευδοξία για την πολλαπλή προσφορά και συμπαράστασή τους.

ΣΥΝΤΟΜΟ ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

Γεννήθηκα στη Λάρισα στις 18 Απριλίου 1965. Τον Σεπτέμβριο του 1988 αποφοίτησα από το Φαρμακευτικό Τμήμα της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου της Αθήνας. Από τον Οκτώβριο του 1988 μέχρι σήμερα είμαι μεταπτυχιακός φοιτητής του Εργαστηρίου Βακτηριολογίας, Παρασιτολογίας, Ζωονόσων και Γεωγραφικής Ιατρικής του Ιατρικού Τμήματος της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Κρήτης, υπό την καθοδήγηση του αν. καθηγητή Ι. Τσελέντη. Τά διαστήματα 1.10.1990-31.9.1991 και 1.6.1992-1.11.1992 ήμουν εξωτερικός βοηθός (attache etranger) του καθ. D. Raoult, διευθυντή της Unite des Rickettsies, του Ιατρικού Τμήματος του Πανεπιστημίου της Μασσαλίας. Η παραπάνω μονάδα είναι συνεργαζόμενο εργαστήριο του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας και Εθνικό Κέντρο Αναφοράς των Ρικετσιώσεων στη Γαλλία.

Ανακοινώσεις

1. T. Babalis, Ch. Chatzichristodoulou, Ch. Ladakis, D. Raoult, I. Tselentis. Etude seroepidemiologique de *R. conorii* et *Coxiella burnetii* en Grece. 11th Interdisciplinary Meeting On Anti-Infectious Chemotherapy 5-6 December 1991 (R.I.C.A.I.) Paris, France.

2. A. Stein, T. Babalis, D. Raoult. Detection et identification de *Coxiella burnetii* par amplification genique et analyse des profils de restriction. 11th Interdisciplinary Meeting on Anti-Infectious Chemotherapy 5-6 December 1991 (R.I.C.A.I.) Paris, France.

3. I. Vouldoukis, L. Monjour, A. Bneogy, T. Babalis and Y. Tselentis. Leishmaniasis: Role of TNF-A and IL-6 in the healing process. Third Euroleish Workshops, Biochemistry, Immunology and Molecular Iology of Leishmania, 10-14 March 1992, Spain.

4. Μπαμπάλης Θ., Μανέτας Σ., Χατζηχριστοδούλου Χ., Τσελέντης Ι. Οροεπιδημιολογική μελέτη Q πυρετού σε αγροτική περιοχή της Ελλάδας. 18ο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο, Μάιος 1992, Αθήνα.

5. Μπαμπάλης Θ., Χατζηχριστοδούλου Χ., Τσελέντης Ι. Οροεπιδημιολογική μελέτη της *R. conorii* σε αγροτικό πληθυσμό του Ν. Φωκίδας. 18ο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο, Μάιος 1992, Αθήνα.

6. Χατζηχριστοδούλου Χ., Μπαμπάλης Θ., Γκουτζιάνα Γ., Βούλγαρης Π., Σωτηριάδης Ε., Τσελέντης Ι. Επιδημιολογική μελέτη ανθρώπινοζοονόσων σε παιδιά γεωργικοκτηνοτροφικής περιοχής της Ελλάδας. 30ο Πανελλήνιο Παιδιατρικό Συνέδριο, 13-14 Ιουνίου 1992, Λεμεσός, Κύπρος.

7. T. Babalis, Y. Tselentis, V. Roux, A. Psaroulaki, D. Raoult. Isolation and Identification of A Greek Rickettsial Strain. 6th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 28-31 Μαρτίου 1993, Seville, Spain.

8. A. Gikas, E. Kyriakakis, N. Lydataki, D. Boursos, T. Babalis, M. Saridaki, M. Gigourtaki, M. Kouledaki, G. Metaxaris, M. Froudarakis, D. Kofteridis, I. Tselentis. Etude multicentrique de l' infection aigue a *Coxiella burnetii* en Crete (Grece). Aspects clinique, bacteriologique et therapeutique. 13th Interdisciplinary Meeting On Anti-Infectious Chemotherapy 2 December 1993 (R.I.C.A.I.), Paris, France.

9. Α. Φαρουλάκη, Ι. Τσελέντης, Ι. Μανιατάς, Ι. Σπυριδάκη και Θ. Μπαμπάλης. Οικολογική μελέτη του ενδημικού τύφου στην Χαλκίδα. Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο, 17-21 Μαΐου 1994, Νο 125, σελ. 32, Αθήνα.

Δημοσιεύσεις

1. Y. Tselentis, T. Babalis, D. Chrysanthis, A. Gikas, G. Chaliotis and D. Raoult (1992). Clinicoepidemiological study of murine typhus on the greek island of Evia. *European Journal of Epidemiology* Vol. 8, No 2 March 1992.

2. T. Babalis, H. Tissot Dupont, Y. Tselentis, C. Chatzichristodoulou and D. Raoult. (1993). *Rickettsia canarii* in Greece: Comparison of a Microimmunofluorescence assay and Western Blotting for Seroepidemiology. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 48(6):784-792.

3. T. Babalis, Y. Tselentis, V. Roux, A. Psaroulaki and D. Raoult. (1994). Isolation and Identification of a rickettsial strain related to *Rickettsia massillae* in greek ticks. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 50(3):365-372.

4. C. Hadjichristodoulou, P. Voulgaris, L. Toulieres, T. Babalis, S. Manetas, G. Goutziana, I. Kastritis and I. Tselentis (1994). Tolerance of the human brucellosis vaccine nad the intradermal reaction test for brucellosis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 13(2):129-134.



ΕΙΣΑΓΩΓΗ

ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ

Η πρώτη κλινική περιγραφή του ΜΚΠ χρονολογείται το 1910, όπου οι Conor και Bruch δημοσίευσαν 7 περιπτώσεις εξανθηματικού πυρετού αγνώστου αιτιολογίας στην Τυνησία (Conor 1910α). Σ'αυτή την πρώτη δημοσίευση, οι συγγραφείς επικαλούνται την ομοιότητα ανάμεσα στον "εξανθηματικό πυρετό της Τυνησίας" και τον Κηλιδώδη Πυρετό των Βραχωδών Ορέων (ΚΠΒΟ), που περιγράφηκε στις ΗΠΑ στο τέλος του 19ου αι και του οποίου η επισταμένη μελέτη άρχισε μεταξύ 1906 και 1909 (Weiss 1991). Την ίδια αυτή χρονιά οι ίδιοι συγγραφείς περιγράφουν και πάλι στην Τυνησία τέσσερις νέες περιπτώσεις του Εξανθηματικού Πυρετού (Conor 1910β). Σε μια μάλιστα απ'αυτές τις περιπτώσεις οι συγγραφείς παρατηρούν την ύπαρξη φλεγμονώδους εσχάρας στο αριστερό αυτί αργάστον, που αποδίδουν σε δήξη εντόμου. Η περιγραφή της εσχάρας στο σημείο του ενοφθαλμισμού αξιολογήθηκε το 1924 από τους Boineai και Pieri στην Μασσαλία, που της έδωσε το όνομα "tâche noire" (1927). Κατά τον Pieri η εσχάρα ενοφθαλμισμού χαρακτηρίζει την νόσο και αποδίδεται σε δήξη κρότωννα. Τα επόμενα χρόνια, ο Olmer D. (Olmer D. 1925) περιγράφει την κλινική μορφή της νόσου. Ενώ η κλινική περιγραφή του ΜΚΠ αποσαφηνίζεται, η αιτιολογία της θα παραμείνει για πολύ καιρό αγνώστη (Touillec 1930, Plazy & Marcandier 1930). Εντούτοις, η ομοιότητα της κλινικής εικόνας με τον επιδημικό τύφο και τον ΚΠΒΟ, καθώς και η ύπαρξη θετικών ορολογικών αντιδράσεων των Weil-Felix (Weil 1916) υπέβαλαν ήδη από την εποχή αυτή την αναζήτηση του αιτιολογικού παράγοντα στις ρικέτσιες. Αξίζει να σημειωθεί ότι η περιγραφή του επιδημικού τύφου είχε ήδη πραγματοποιηθεί από τον Brill στις ΗΠΑ (1898, 1910) και ο αιτιολογικός παράγοντας αυτού αποδείχθηκε από τον Zinsser ότι ήταν ρικέτσια το 1933 (Zinsser 1933). Εξάλλου και ο ΚΠΒΟ, που η λοιμώδης αιτιολογία του είχε ήδη εξαγγελθεί από τον Ricketts το 1908, αποδείχθηκε ότι είχε ως αιτιολογικό παράγοντα παθογόνο ρικέτσια (Weiss & Strauss 1991).

Ο αιτιολογικός παράγοντας του ΜΚΠ βρέθηκε μετά από πάροδο 10 ετών, γύρω στο 1931 από τους Blanc και Caminopetro (1932). Ο αιτιολογικός παράγοντας ονομάστηκε *R. conorii*, προς τιμή των ερευνητών Ricketts και Conor. Ο Durand το 1930 απέδειξε την πειραματική μετάδοση της νόσου από τον κρότωννα του σκύλου *Rhipicephalus sanguineus* και ο Blanc το 1931 έδειξε ότι η μετάδοση των ρικετσιών στους κρότωννες είναι κάθετη (από γενεά σε γενεά) και οριζόντια.

Την ανακάλυψη του αιτιολογικού παράγοντα και την έντονη ερευνητική δραστηριότητα στις αρχές του αιώνα ακολούθησε περίοδος χωρίς ιδιαίτερο ερευνητικό ενδιαφέρον μέχρι το 1980 οπότε με την είσοδο του ανοσοφθορισμού ο Raouil επανεξετάζει την κλινική ποικιλομορφία της νόσου και περιγράφει την ύπαρξη βαριών κλινικών μορφών (Raouil 1983).

Τα τελευταία χρόνια η ερευνητική δραστηριότητα παρουσιάζει και πάλι έντονη κινητικότητα: ανάπτυξη μεθόδων ταξίσης καλλιέργειας, νέες ορολογικές μέθοδοι, τοποποίηση με τεχνικές μοριακής βιολογίας, μελέτη της σχέσης ρικετσιών-ξενιστών κυττάρων, ευαισθησία και μηχανισμοί αντοχής στα αντιβιοτικά κλπ.

ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ

Φαινοτυπική ταξινόμηση

Η κατάταξη των ρικετσιών έχει αλλάξει ριζικά με την πάροδο του χρόνου. Στην αρχή περιελάμβανε είδη του γένους *Rickettsia* αλλά και βακτήρια που μεταδίδονταν ως επι το πλείστον με αρθρώποδα και δεν αναπτύσσονταν σε μη κυτταρικά θρεπτικά υλικά. Ο ακριβέστερος όμως ορισμός του γένους είχε σαν συνέπεια την σταδιακή αποβολή των βακτηρίων που δεν ανταποκρίνονταν στα χαρακτηριστικά του γένους *Rickettsia*. Η διαδικασία αυτή άρχισε από την 6η έκδοση του Bergey's Manual of Systematic Bacteriology και συμπληρώθηκε στην 8η με την απομάκρυνση της *Rickettsia sennetsu* και την κατάταξη της στο γένος *Ehrlichia* (Weiss & Moulder 1984). Σήμερα στην ευρύτερη τάξη των *Rickettsiales* κατατάσσονται όλα τα βακτήρια που δεν αναπτύσσονται σε θρεπτικά υλικά αλλά μόνο στο ενδοκυττάριο περιβάλλον και δεν εμφανίζουν πολύπλοκο ενδοκυττάριο κύκλο ανάπτυξης (Chlamydiales). Η τάξη αυτή περιλαμβάνει τρεις οικογένειες: *Anaplasmataceae*, *Bartonellaceae* και *Rickettsiaceae*. Από τις παραπάνω οικογένειες, λοιμώξεις στον άνθρωπο προκαλούν μόνο οι δύο τελευταίες. Η οικογένεια των *Rickettsiaceae* διαχωρίζεται από εκείνη των *Bartonellaceae* από την μορφολογία του κυτταρικού τοιχώματος και από το γεγονός ότι δεν καλλιεργείται σε ερυθροκύτταρα αλλά μόνο σε εμπύρνα κύτταρα (βλ. επόμενο πίνακα).

Χαρακτήρες	Rickettsiaceae	Bartonellaceae	Anaplasmataceae
Κυτταρικό τοίχωμα τριών στιβάδων			
Καλλιέργεια σε:			
εμπύρνα κύτταρα	+	+	-
ερυθροκύτταρα	-	+	+

Η οικογένεια των *Rickettsiaceae* διαιρείται σε τρία φύλα (phyllum) (βλ. πίνακα 1, σελ. 5): τις *Rickettsiae*, τις *Ehrlichiae* και τις *Wolbachiae*. Από τα τρία αυτά φύλα, παθογόνα για τον άνθρωπο είναι μόνο τα δύο πρώτα.

Το φύλο των *Rickettsiae* αποτελείται από τρία γένη *Rochalimaea*, *Coxiella* και *Rickettsia*.

Τα είδη του γένους *Rochalimaea* καλλιεργούνται σε θρεπτικό υλικό ελεύθερο από κύτταρα και εντοπίζονται στην εξωτερική επιφάνεια ευκαρυωτικών κυττάρων (Weiss 1982), αποτελώντας εξαίρεση στην οικογένεια των *Rickettsiaceae*. Το γένος *Coxiella* περιλαμβάνει ένα μοναδικό εκπρόσωπο, την *C. burnetii*, η οποία όμως εμφανίζει μεγάλη φαινοτυπική ποικιλομορφία ως προς την λοιμογόνο της δύναμη, την κυτταροπαθογόνο δράση, την σύνθεση του λιποπολυσακχαρίτη (ΛΠΣ) και την ευαισθησία στα αντιβιοτικά. Επιπλέον το είδος αυτό παράγει ενδοσπόρια με αποτέλεσμα να είναι πιο ανθεκτικό σε διάφορους φυσικούς και χημικούς παράγοντες και στο περιβάλλον. Τα 3 αυτά γένη εμφανίζουν επίσης διαφορές στον μεταβολισμό τους. Όπως θα δούμε παρακάτω στο κεφάλαιο το είδος του μεταβολισμού οι *Rickettsiae*, αντίθετα με την *C. burnetii* (Paretsky 1968), δεν διαθέτουν γλυκολυτικά ένζυμα (Coolbaugh 1976) και επομένως δεν μεταβολίζουν την γλυκόζη, ενώ έχουν την ικανότητα να παράγουν ενέργεια από το γλυταιμικό οξύ μέσω του κύκλου του Krebs. Τέλος η *C. burnetii* αναπτύσσεται μέσα στο φαγολυσοσώμα (γι αυτό και το άριστο pH της είναι 4,5) ενώ οι *Rickettsiae*, όπως θα δούμε πιο κάτω αναπτύσσονται είτε στο κυτταρόπλασμα είτε στον πυρήνα. Αξίζει επίσης να σημειωθεί ότι

το ποσοστό CG του DNA της *C. burnetii* έχει σημαντική απόκλιση από εκείνο του γένους *Rickettsia* (43% έναντι 29-33%) (βλ. επόμενο πίνακα).

Χαρακτήρες	<i>Rickettsia</i>	<i>Rochalimaea</i>	<i>Coxiella</i>
Καλλιέργεια σε θρεπτικά υλικά	-	+	-
Ανάπτυξη σε ευκαρυωτικά κύτταρα:			
στο κυτταρόπλασμα ή στον πυρήνα	+	-	-
στο φαγολυσόσωμα	-	-	+
επικυτταρικά	-	+	-
Σχηματισμός ενδοσπορίων	-	-	+
Αριστο pH	7.0	7.0	4.5
Μεταβολισμός της γλυκόζης	-	-	ασθενής
του γλουταμικού οξέος	+	ασθενής	+
του ηλεκτρικού οξέος	ασθενής	+	+
Mol% G + C του DNA	29-33	39	43

Το γένος *Rickettsia* διαίρεται σε τρεις ομάδες:

- Την ομάδα του **τύφου (OT)** που περιλαμβάνει τα είδη:

R. prowazekii (επιδημικός τύφος)

R. typhi (ενδημικός τύφος)

R. canada

- Την ομάδα των **κηλιδώδων πυρετών (OKΠ)** που περιλαμβάνει μέχρι στιγμής 9 γνωστά είδη:

R. australis (πυρετός της Queensland)

R. rickettsii (κηλιδώδης πυρετός Βραχωδών Ορέων)

R. conorii (Μεσογειακός κηλιδώδης πυρετός)

R. sibirica (πυρετός Βόρειας Ασίας)

R. akari (ricketsialprox)

R. parkeri

R. montana

R. rhipicephali

R. bellii

Τα τελευταία χρόνια προτάθηκαν τα παρακάτω είδη:

R. slovac

R. japonica (Uchida 1992)

R. helvetica (Peter et al, 1985, Beati et al, 1993)

R. massilia (Beati, Eremeeva et al 1992, Raoult 1993 προσωπική επικοινωνία)

- Την ομάδα του **τύφου των θάμνων (scrub typhus)**, ανακριβής όρος που έχει επικρατήσει στην ελληνική βιβλιογραφία. Κανονικά θα έπρεπε να ονομάζεται τύφος των θάμνωδων περιοχών. Η ομάδα αυτή έχει μοναδικό εκπρόσωπο την

R. tsutsugamushi

Η φαινοτυπική ταξινόμηση των *Rickettsiae* βασίστηκε στην αρχή τουλάχιστον αποκλειστικά σε **οικολογικά, γεωγραφικά, κλινικά** και **μορφολογικά** χαρακτηριστικά. Η ανάλυση όμως της αντιγονικής τους σύνθεσης επέτρεψε την ταξινόμηση τους με κριτήρια λιγότερο υποκειμενικά, έτσι που να θεωρείται σε τελική ανάλυση σήμερα κυρίως **οροτυπική**. Εκτενέστερη ανάλυση όλων των φαινοτυπικών χαρακτηριστικών και κυρίως εκείνων που έχουν επιλεγεί για την ταυτοποίηση των ρικετσιών θα γίνει σε επόμενο κεφάλαιο.

Οικογένεια	Φυλή	Γένος	Ομάδα	Είδος	
Rickettsiaceae	Rickettsiae	Rickettsia	Τύφου	<i>R. prowazekii</i> <i>R. typhi</i> <i>R. canada</i>	
			Κηλιδωδών Πυρετών	<i>R. akari</i> <i>R. australis</i> <i>R. bellii</i> <i>R. conorii</i> <i>R. helvetica</i> <i>R. japonica</i> <i>R. montana</i> <i>R. parkeri</i> <i>R. rhipicephali</i> <i>R. rickettsii</i> <i>R. sibirica</i> <i>R. siovacae</i>	
			Θάμνιων	<i>R. tsutsugamushi</i>	
			Rochalimaea	<i>R. quintana</i> <i>R. vinsonii</i> <i>R. henseli</i>	
			Coxiella	<i>C. burnetii</i>	
	Ehrlichiae	Ehrlichia			<i>E. canis</i> <i>E. chaffeensis</i> <i>E. sennetsu</i> <i>E. phagocytophila</i>
					<i>C. ruminantium</i>
				Cowdria Neorickettsia	
	Wolbachiae	Wolbachia			<i>W. pipientis</i> <i>W. melophagi</i> <i>W. persica</i>
				Rickettsiella	<i>R. popilliae</i> <i>R. grylli</i> <i>R. chironomi</i>

Πίνακας 1 : Ταξινόμηση των βακτηρίων της οικογένειας των **Rickettsiaceae** σύμφωνα με το Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.

Φυλογενετική ταξινόμηση

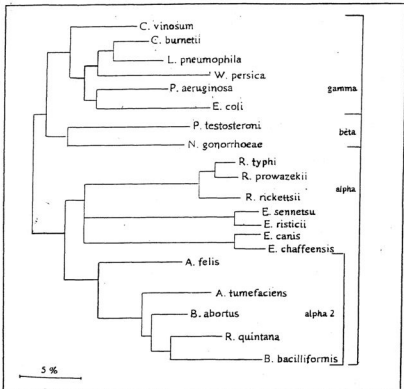
Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως (σελ. 5) η φαινοτυπική ταξινόμηση δεν λαμβάνει υπόψη της την εξέλιξη και τις ταξινομικές σχέσεις των ομάδων και ειδών του γένους. Οι μελέτες των Fox και Woese έθεσαν τις σύγχρονες βάσεις της φυλογενετικής ανάλυσης (Fox et al., 1980, Woese 1987). Κατ'αυτούς ο καταρτισμός γενεολογικού δένδρου των μικροοργανισμών απαιτεί την επιλογή μακρομοριακής ουσίας που από την μια μεριά συναντάται σε όλα ανεξαιρέτα τα είδη όπου παίζει πάντα τον ίδιο ρόλο και από την άλλη εξελίσσεται πολύ αργά, έτσι που να μπορεί να χαρακτηριστεί σαν "βιολογικό χρονόμετρο" (Weisburg et al., 1989). Τις παραπάνω ιδιότητες έχει το 16S rRNA και από τότε η σύγκριση της αλληλουχίας του γονιδίου του έχει χρησιμοποιηθεί στην φυλογενετική ταξινόμηση πολλών μικροοργανισμών. Είδη του γένους *Rickettsiae* ταξινομήθηκαν για πρώτη φορά με την μέθοδο αυτή το 1985 από τον Weisburg (Weisburg et al., 1985). Ο ερευνητής αυτός βρήκε ότι η *R. quintana* και ορισμένοι παθογόνοι μικροοργανισμοί των φυτών (agrobacteria) και ενδοκυττάρια συμβιωτικά βακτήρια (rhizobacteria) ανήκουν στην ίδια υποδιαίρεση (αλφα-2) των πορφυρών βακτηρίων (purple bacteria). Η συσχέτιση της *R. quintana* με παθογόνα των φυτών οδήγησαν τον Weisburg στην διατύπωση της υπόθεσης ότι οι ρικετίαιες κατάγονται από παθογόνα μικρόβια των φυτών που σε ένα πρώτο χρόνο εξελίχθηκαν σε ενδοκυττάρια παράσιτα εντόμων και αργότερα προσαρμόστηκαν στα θηλαστικά (Weisburg et al., 1985). Το 1989 ο Weisburg επέκτεινε την έρευνα του σε μεγαλύτερο αριθμό ρικετιών (*R. rickettsii*, *R. prowazekii*, *R. typhi*, *W. persica*, *R. quintana*, *C. burnetii*) και βρήκε ότι τα είδη του γένους *Rickettsia* τοποθετούνται στην κορυφή της υποδιαίρεσης α των πορφυρών βακτηρίων, ενώ η *R. quintana* καταλαμβάνει ακραία θέση κοντά στο *Agrobacterium tumefaciens* (βλ. σχήμα επόμενης σελίδας). Η *Coxiella burnetii* κατατάσσεται στην υποδιαίρεση γ, γεγονός που δικαιολογεί την απομάκρυνση της από την οικογένεια *Rickettsiaceae* όπως εξάλλου έχει υποστηριχθεί από αρκετούς ερευνητές (Roux & Raoult 1992, Weiss & Moulder 1984). Σύμφωνα με τον Weisburg η ανάλυση των αλληλουχιών του 16S rRNA της *R. prowazekii*, *R. typhi*, και *R. rickettsii* έδειξε ότι οι δυο πρώτες εμφανίζουν μεταξύ τους υψηλότερο ποσοστό ομοιότητας (99.5%) σε σύγκριση με εκείνο της *R. rickettsii* επιβεβαιώνοντας με τον τρόπο αυτό ότι η φαινοτυπική κατάταξη τους στην ομάδα του τύπου (OT) ήταν ορθή (Weisburg et al., 1989).

Η εργασία του Weisburg αποτελεί σταθμό στην ταξινόμηση των ρικετιών. Η μελέτη όμως απορούσε ένα μόνο είδος της ομάδας των κηλιδωδών πυρετών (OKΠ), την *R. rickettsii*.

Το κενό αυτό ήθελε να καλύψει περιορισμένος αριθμός μελετών (Anderson & Tzianabos 1989; Ralph et al., 1990; Regnery et al., 1991) που με αυστηρά κριτήρια δεν μπορούν να χαρακτηρισθούν σαν φυλογενετικές μελέτες, επειδή όμως τα αποτελέσματά τους αφορούν γενετικές συσχετίσεις αναφέρονται στο παρόν κεφάλαιο. Από αυτές θα αναλυθούν μόνο δύο που αν και χρησιμοποιούν διαφορετική μεθοδολογία καταλήγουν σε παραπλήσια αποτελέσματα.

Η εργασία του Ralph δεν μελετά ένα τμήμα του DNA αλλά ολόκληρο το γονιδίωμα των ρικετιών που αναλύει σε κλάσματα μεγέθους μετά από επίδραση περιοριστικών ενζύμων (*Rsa* I, *Hind* III). Η κατατομή των κλασμάτων που "ανάβουν" με την χρήση δύο διαφορετικών ανιχνεύσεων (που παρασκευάσε από την *R. rickettsii* και την *R. rhipicephali*) επιτρέπει γενετικές συσχετίσεις. Με τον τρόπο αυτό έδειξε ότι η *R. bellii*, η *R. akari* και η *R. australis* παρόλο που δεν είναι στενά συνδεδεμένες μεταξύ τους, αποκλίνουν σημαντικά από όλα τα υπόλοιπα είδη της OKΠ που εξέτασε. Η *R. rickettsii*, η *R. parkeri* και η *R. sibirica* και ένα μη κατονομασθέν αφρικανικό στέλεχος εμφανίζουν μεταξύ τους τόσο μεγάλη

γενετική ομοιότητα ώστε θα μπορούσαν να θεωρηθούν στελέχη του ίδιου είδους (Ralph et al., 1990).



Φυλογενετική θέση των *Rickettsiae*. Το μήκος της διακλαδωτικής γραμμής αντιστοιχεί σε 5% ποικιλομορφία.

Η μελέτη του Regnery αναλύει το γένομα ενός ενζύμου και μιας πρωτεΐνης: της κιτρικής συνθετάσης και της 190-kDa αντίστοιχα. Από τα δύο αυτά μόρια μόνο το γονίδιο της 190-kDa αποδεικνύεται χρήσιμο στην διερεύνηση των γενετικών σχέσεων μεταξύ των ειδών της ΟΚΠ, ενώ το μόριο της κιτρικής συνθετάσης, που είναι σχετικά πιο συντηρημένο (δια μέσου της εξελικτικής διαδικασίας), δίνει πληροφορίες για όλα τα είδη της οικογένειας *Rickettsiaceae*. Ο συνδυασμός βάβαια των δύο αυτών μορίων εκτός από τις ταξινομικές πληροφορίες που παρέχει, είναι πολύ χρήσιμος στην ταυτοποίηση των ρικετσιών όπως θα δούμε πιο κάτω. Ο Regnery πολλαπλασιάζει τμήματα των γονιδίων των πιο πάνω πρωτεϊνών με αλυσιδωτή αντίδραση της DNA πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) και στη συνέχεια αναλύει τον πολυμορφισμό των κλασμάτων του DNA μετά από υδρόλυση με περιοριστικά ένζυμα (*Alu* I για την κιτρική συνθετάση και *Rsa* I και *Pst* I για την 190-kDa). Αν και οι γενετικές αποκλίσεις οδηγούν στον σχηματισμό δενδρογράμματος που είναι διαφορετικό από εκείνο του *Ralph*, τα βασικά συμπεράσματα, όπως ήδη αναφέρθηκε, είναι σχεδόν ίδια, σε ότι αφορά την *R. bellii*, *R. akari* και *R. australis* αλλά διαφορετικά σε ότι αφορά την *R. rickettsii* και την *R. sibirica* (η *R. parkeri* δεν εξετάστηκε από τον Regnery), που για τον Regnery δεν θεωρούνται σταλέχη του ίδιου είδους, αλλά διαφορετικά είδη (Regnery et al., 1991).

Οι περισσότερες από τις εργασίες που αναφέρθηκαν μέχρι τώρα αφορούν την μελέτη είτε μικρού μόνο τμήματος του DNA που κωδικοποιεί λιγότερο ή περισσότερο συντηρημένες πρωτεΐνες είτε την μελέτη μεγαλύτερων τμημάτων του γενομάτος που υβριδοποιούνται με τους ίδιους ανιχνευτές που προέρχουν όμως πάντα από ρικετίες (*Ralph* et al., 1990). Η ανάλυση ολόκληρου του γενομάτος έγινε πρόσφατα εφικτή με την χρησιμοποίηση ενδονουκλεασών που "κόβουν" ολόκληρο το γένομα σε πολυάριθμα μικρά τμήματα και με την ηλεκτροφόρηση σε ώση πεδίου (Pulsed Field Gel Electrophoresis, PFGE). Ο όρος "ηλεκτροφόρηση σε ώση πεδίου" δεν είναι εννοιολογικά ακριβής στα Ελληνικά, αλλά και η πιο δόκιμη διατύπωση του όρου είναι "ηλεκτροφόρηση με εφαρμογή διαφορετικού δυναμικού κατά παλμούς". Ο δόκιμος όμως αυτός όρος είναι εκτενής για καθημερινή χρήση. Η μέθοδος αυτή επιτρέπει τον ακριβή προσδιορισμό της γενετικής απόστασης μεταξύ των ειδών. Μόλις πρόσφατα εφαρμόστηκε στην μελέτη των ρικετσιών από τους Roux και Raoult (1993). Σύμφωνα με την μελέτη αυτή οι ρικετίες της ΟΚΠ ταξινομούνται σε 7 υποομάδες. Η πρώτη υποομάδα που είναι και η πολυπληθέστερη περιλαμβάνει πολύ κοντινά είδη (*R. rickettsii*, *R. conorii*, «*R. israelii*», *R. parkeri*, «*R. thais*», «*R. ethiopica*», *R. sibirica*, *R. slovacae*). Η δεύτερη περιλαμβάνει τρία είδη (*R. japonica*, *R. montana* και «*R. massilia*» ή *MtuI*). Οι υπόλοιπες υποομάδες περιλαμβάνουν από ένα μόνο είδος (*R. helvetica*, *R. bellii*, *R. australis*, *R. rhipicephali*, *R. akari*). Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής επιβεβαιώνουν εκείνα των εργασιών του *Ralph* και του *Regnery*. Επιπλέον δίνεται για πρώτη φορά η ταξινομική θέση των *R. japonica*, *R. helvetica* και «*R. massilia*» ή *MtuI*. Η *R. helvetica* εμφανίζει εξίσου σημαντική απόκλιση από όλα τα άλλα είδη της ΟΚΠ όσο και η *R. bellii*. Η *R. japonica* και η «*R. massilia*» ή *MtuI* κατατάσσονται στην ίδια υποομάδα με την *R. montana*.

Η βραχεία αυτή ανασκόπηση δείχνει ότι υπάρχει αντιστοιχία μεταξύ οροτυπικής (φαινοτυπικής) και φυλογενετικής ή ακριβέστερα γενοτυπικής ταξινόμησης. Η αντιστοιχία αυτή δεν είναι και τόσο περίεργη εφόσον τόσο η οροτυπική όσο και η γενοτυπική ταξινόμηση αφορά την μελέτη των ίδιων αντιγονικών πρωτεϊνών.

ΒΑΚΤΗΡΙΟΛΟΓΙΑ

Μορφολογία και χρώσεις

Οι ρικέτσιες είναι υποχρωστικά ενδοκυττάρια βακτήρια, μορφής κόκκου ή κοκκοβάκιλλου με μήκος 0,8-2,0 μm και διάμετρο 0,3-0,4 μm. Πολλαπλασιάζονται με εγκάρσια διχοτόμηση.

Η κάψουλα βάφεται κόκκινη με την μέθοδο Gimenez (Gimenez 1964). Με χρώση Gram αντιδρούν ελαφρά όπως τα Gram αρνητικά, ενώ με την χρώση Giemsa εμφανίζονται κυανές.

Ο κύκλος ζωής των ρικετσιών της ΟΚΠ διαφέρει από αυτόν της ΟΤ. Μετά από μια σύντομη παραμονή στο κυτταρόπλασμα, όπου πολλαπλασιάζονται γεωμετρικά, οι ρικέτσιες της ΟΚΠ "διαφεύγουν" στον μεσοκυττάριο χώρο και μολύνουν άλλα κύτταρα. Παράλληλα μερικές ρικέτσιες εισβάλλουν στον πυρήνα όπου και πολλαπλασιάζονται (Silvermann 1991).

Η *R. tsutsugamushi* πολλαπλασιάζεται στον χώρο γύρω από τον πυρήνα, χωρίς ποτέ να εισέρχεται σε αυτόν.

Δομή

Οι ρικέτσιες εμφανίζουν την τυπική δομή των Gram αρνητικών βακτηρίων. Το τοίχωμά τους αποτελείται από την κυτταροπλασματική μεμβράνη, τον περιπλασματικό χώρο και την εξωτερική μεμβράνη. Η εξωτερική μεμβράνη περιλαμβάνει ΛΠΣ, πρωτεΐνες και φωσφολιπίδια. Η πεπτιδογλυκάνη βρίσκεται στον περιπλασματικό χώρο.

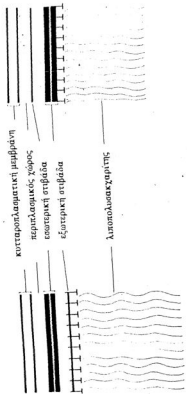
Ο Silverman (Silverman 1991) έδειξε με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο ότι η εξωτερική μεμβράνη της *R. tsutsugamushi* έχει διαφορετική δομή από εκείνη της *R. rickettsii* και της *R. prowazekii*. Στην ΟΤ και την ΟΚΠ η έξω στιβάδα της εξωτερικής μεμβράνης είναι λεπτή, ενώ εκείνη της *R. tsutsugamushi* είναι παχύτερη (βλ. σχήμα επόμενης σελ.).

Η χημική σύνθεση του ΛΠΣ των ειδών της ΟΚΠ, σε αντίθεση με την *R. prowazekii*, *R. typhi*, *R. tsutsugamushi* και *C. burnetii*, δεν έχει επαρκώς μελετηθεί (Tamura 1991). Η σύνθεση του λιπιδίου Α της *R. rickettsii* και *R. akari* είναι παρόμοια με εκείνη των ειδών της ΟΤ και αποτελείται από υδροξυλιωμένα λιπαρά οξέα (υδροξυ-μυριστικό). Στον πυρήνα (core) του ΛΠΣ των ειδών της ΟΤ βρέθηκε γλυκοζαμίνη, 2-κετο-3-δεοξυ-οκτανικό οξύ και πολύ μικρές ποσότητες επτόζης. Ο ΛΠΣ της *C. burnetii* εμφανίζει διαφορετική χημική σύνθεση στην φάση I και II και αποτελείται από ασυνήθη σάκχαρα (Amano et al., 1987; Schramek et al., 1985).

Η παρουσία μωραμικού και διαμνοπιμελικού οξέος έχει αποδειχθεί στην πεπτιδογλυκάνη της ΟΤ (Allison & Perkins 1960). Τα δύο αυτά συστατικά βρέθηκαν επίσης στην *C. burnetii*. Η χημική δομή επομένως της πεπτιδογλυκάνης των δύο αυτών ομάδων φαίνεται ότι είναι παρόμοια με εκείνη των Gram αρνητικών βακτηρίων. Οι πρωτεΐνες που συνδέονται με την πεπτιδογλυκάνη είναι ανθεκτικές στην επίδραση των πρωτεασών και φαίνεται ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στην αντοχή που εμφανίζουν οι μικροοργανισμοί αυτοί στο περιβάλλον. Η *R. tsutsugamushi* δεν έχει ΛΠΣ και πεπτιδογλυκάνη (Amano et al., 1987).

Είναι φανερό από όσα αναφέρθηκαν ότι η χημική σύνθεση του ΛΠΣ των δύο αυτών ομάδων εμφανίζει σημαντικές διαφορές. Οι διαφορές αυτές έχουν επιβεβαιωθεί με

ΕΞΩΤΕΡΙΚΗ ΜΕΜΒΡΑΝΗ ΤΩΝ RICKETTSIAE



Ομάδες του Τύφου
και των Εξανθηματικών Πυρετών

Ομάδα του τύφου των θάμνων (scrub typhus)

ηλεκτροφόρηση παρουσία SDS (SDS-PAGE) και Western blot με χρήση μονοκλωνικών και πολυκλωνικών αντισωμάτων. Η SDS-PAGE κεκαθαρισμένων και κατεργασμένων με πρωτεάση K ρικετσιών της OT και της OKΠ εμφανίζει την τυπική διαβαθμισμένη κατανομή των ΛΠΣ. Η διασπορά όμως του μήκους των κλιμάκων του ΛΠΣ διαφέρει ανάλογα με το είδος. Οι μονοειδικοί και πολυκλωνικοί αντιοροί έναντι της *R. rickettsii* και *R. akari* αναγνωρίζουν στο Western blot τους ΛΠΣ όλων των ειδών της OKΠ και όχι εκείνους της OT (Vishwanath et al., 1990). Τα είδη όμως της OT αναγνωρίζονται μόνο από μονοειδικούς αντιορούς έναντι της *R. prowazekii* και *R. canada* (Vishwanath et al., 1990). Τα μονοκλωνικά αντισώματα έναντι του ΛΠΣ της *R. rickettsii* αναγνωρίζουν επίσης όλα τα είδη της OKΠ και όχι της OT (Anacker et al., 1987). Τα δεδομένα αυτά υποδηλώνουν ότι οι ΛΠΣ των ρικετσιών συνιστούν αντιγόνα ειδικά της ομάδος και ότι οι ΛΠΣ της OT και της OKΠ εμφανίζουν διαφορές στην χημική τους δομή. Τα δεδομένα αυτά καθιστούν αναγκαία την διερεύνηση της χημικής σύνθεσης των ΛΠΣ των ρικετσιών της OKΠ που όπως αναφέρθηκε δεν έχουν μέχρι τώρα μελετηθεί.

Οι ρικέτσιες δεν έχουν βλεφαρίδες, κροσσούς ή άλλους επιπρόσθετους δομικούς σχηματισμούς εκτός από γλυκοκάλυκα. Ο γλυκοκάλυκας αποτελείται από πολυσακχαρίτες, η ακριβής όμως χημική του σύνθεση δεν έχει ακόμη διερευνηθεί (Weiss 1982).

Όλες οι ορολογικές δοκιμασίες που χρησιμοποιούν ακέραια κύτταρα ανιχνεύουν αντισώματα τα οποία καταβιβάζονται σε αντιγόνα που βρίσκονται πάνω στην επιφάνεια των κυττάρων. Τα πιο ανασογόνα από τα αντιγόνα αυτά είναι ο ΛΠΣ, και ενδεχομένως οι πρωτεΐνες 120- και 190-kDa, που παρατίθενται πάνω στην επιφάνεια της εξωτερικής μεμβράνης με την μορφή τετράγωνων σχηματισμών (Silverman 1991).

Μεταβολισμός

Ο ενδοκυττάριος εντοπισμός των ρικετσιών δυσχεραίνει την μελέτη του μεταβολισμού τους. Οι ρικέτσιες δεν μπορούν να χρησιμοποιήσουν την γλυκόζη, το γλυκόξο-6-φωσφορικό οξύ, το γαλακτικό οξύ και την σακχαρόζη, αλλά δεν είναι γνωστό αν η αδυναμία καταβολισμού της γλυκόζης οφείλεται στην απουσία πέρμεαςής ή στην απουσία ενζύμων της γλυκόλυσης (Coolbaugh et al., 1976).

Πρόσφατες μελέτες του μεταβολισμού των ρικετσιών έχουν περιορισθεί στην OT. Ο Bonagrick έδειξε ότι η *R. prowazekii* χρησιμοποιεί σαν τελικό αποδέκτη ηλεκτρονίων το οξυγόνο και μεταβολίζει το γλουταμικό παράγοντας ενέργεια μέσω του κύκλου του Krebs (Weiss 1982). Οι ρικέτσιες της OKΠ χρησιμοποιούν και αυτές το γλουταμικό αλλά σε πολύ μικρότερες ποσότητες (Vegon & LeMinor 1989). Το γλουταμικό μετατρέπεται σε διάφορους ενδιάμεσους μεταβολίτες του κύκλου του Krebs και σε πυρουβικό. Υπάρχει επίσης η δυνατότητα φωσφορύωσης του ADP σε ATP (παρουσία γλουταμικού, ανόργανου φωσφορικού, αμοκινάσης και γλυκόζης) και σχηματισμού γλυκόξο-6-φωσφορικό οξύ.

Η ποσότητα του ATP που παράγεται εξαρτάται από το γλουταμικό. Η γλουταμίνη ή το γλουταμικό πρέπει να παρέχονται σε μεγάλες ποσότητες. Παρόλα αυτά και όταν ακόμη η ποσότητα του παρεχόμενου γλουταμικού είναι μεγάλη, το ποσοστό του ATP παραμένει πολύ μικρότερο από αυτό που παράγουν άλλα βακτήρια. Επομένως οι ρικέτσιες δεν έχουν την ικανότητα να παράγουν επαρκή ποσότητα ATP για την κάλυψη των αναγκών των μεταβολικών συνθετικών αναγκών τους, γεγονός που εξηγεί την ανάγκη πρόσληψης ATP και τον υποχρεωτικό ενδοκυττάριο παρασιτισμό τους. Οι ρικέτσιες της OT παίρνουν ATP από το κυτταροπλάσμα του κυττάρου-ξενιστή, μέσω ενός συστήματος ανταλλαγής ATP-ADP που πιθανά εντοπίζεται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη (Winkler 1976; Winkler

& Daugherty 1984). Εξω από τα κύτταρα οι ρικέτσιες είναι ασταθείς και χάνουν εύκολα το RNA, την μεταβολική δραστηριότητα, την τοξικότητα για τα ποντίκια και την λοιμογόνο δύναμη. Η εξασθένηση των λειτουργιών αυτών οφείλεται στην προοδευτική απώλεια του NAD που όταν επαναπροσληφθεί τις αποκαθιστά. Η μεταβολική δραστηριότητα επίσης επανέρχεται με την προσθήκη ATP και γλουταμικού. Η ψύξη στους 0°C συνεπάγεται ελάττωση της λοιμογόνου δράσης και της μεταβολικής δραστηριότητας των ρικετσιών. Η απώλεια των λειτουργιών αυτών αποδίδεται στην προοδευτική απώλεια του NAD. Η επώση στους 37°C για μερικές ώρες έχει παρόμοια αποτελέσματα λόγω απογύμνωσης των κυττάρων από το ATP (Weiss 1982).

Οι ρικέτσιες συνθέτουν μικρές ποσότητες πρωτεϊνών και λιπιδίων παρουσία καλίου και μαγνησίου. Έχει επίσης περιγραφεί ένα ενεργό σύστημα μεταφοράς της λυσίνης για την *R. prowazekii* (Smith & Winkler 1977). Ο σχηματισμός των πρωτεϊνών αυτών αναστέλλεται από την χλωραμφενικόλη και τις τετρακυκλίνες (Bovarnick et al., 1959).

Το κύτταρο-ξενιστής επιδρά ουσιαστικά στον πολλαπλασιασμό των ρικετσιών, καθώς ο πλήρωσμός τους αυξάνεται ανάλογα με την κυτταρική δραστηριότητα.

Ο μηχανισμός αυτής της προσαρμοστικής συμβίωσης δεν είναι ακόμη γνωστός. Φαίνεται όμως ότι η κυτταρική μεμβράνη του βακτηρίου υφίσταται σημαντικές τροποποιήσεις που επιτρέπουν να περνούν με ευχέρεια ορισμένοι μεταβολίτες και κυρίως τα συνένζυμα του κυττάρου.

Καλλιέργεια

Πολλοί ερευνητές προσπάθησαν να καλλιέργησουν τις ρικέτσιες σε διάφορα θρεπτικά υλικά ελεύθερα κυττάρων χωρίς όμως επιτυχία, γιατί ο πολλαπλασιασμός τους είναι αυστηρά ενδοκυττάριος. Η *R. tsutsugamushi* σε αντίθεση με τα είδη της ΟΤ και ΟΚΠ δεν απαιτεί διοξειδίο του άνθρακα στην καλλιέργεια της.

Διαδοχικά έχουν αναπτυχθεί τριών ειδών συστήματα καλλιέργειας και απομόνωσης:

- πειραματόζωα

Τα ινδικά χοιρίδια και το ποντίκι (*Microtus pennsylvanicus*) αποδείχθηκαν ευαίσθητα στη μόλυνση με ρικέτσιες της ΟΚΠ (Caminopetros & Contos 1932). Τα πειραματόζωα ενοφθαλμίζονται με δείγμα από κρότωνα ή παθολογικό υλικό από άρρωστο με απώτερο στόχο την απομόνωση των ρικετσιών. Ο ενδοπεριτοναϊκός ενοφθαλμισμός *R. conorii* σε ποντίκι προκαλεί πυρετό και ορχίτιδα, ενώ ο υποδερμικός εσχάρα. Στην περίπτωση που υπάρχει μια από τις ήδη γνωστές μη παθογόνες ρικέτσιες, το πειραματόζωο παρόλο που δεν εμφανίζει κλινικά συμπτώματα, θυσιάζεται την 10 με 12 ημετά τον ενοφθαλμισμό για να αναζητηθούν οι ρικέτσιες στον σπλήνα.

- εμβρυοφόρα αυγά όρνιθας (Cox 1942)

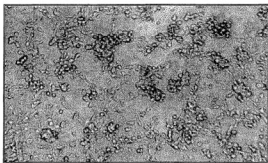
Χρησιμοποιούνται για την απομόνωση αλλά και την μαζική παραγωγή των ρικετσιών. Ο ενοφθαλμισμός του δείγματος από κρότωνα ή παθολογικό υλικό από άρρωστο γίνεται στην μεμβράνη του εμβρυοφόρου σάκου. Η ιδανική θερμοκρασία ανάπτυξης είναι 33.5°C (Stoepner et al., 1961). Το αυγό πεθαίνει σε 5-7 ημε, ενώ ο πολλαπλασιασμός των ρικετσιών διαρκεί 48 ακόμη ώρες. Η αντίχωση και αναγνώριση των ρικετσιών γίνεται με χρέση Gimenez ή ανοσοφθορισμό (Raoult 1988).

- κυτταρικές σειρές

Χρησιμοποιούμενες κυτταρικές σειρές είναι τα L929 (ακτινοβολημένα κύτταρα ποντικού), τα Vero (επιθηλιακά νεφρικά κύτταρα πθήκου) και τα *Hal (Haman embryonic lung)* που είναι διπλοειδή κύτταρα μορφής ινοβλαστών. Η τελευταία σειρά είναι μια από τις λίγες ανθρώπινες διπλοειδείς κυτταρικές σειρές που περιέχουν τον ηλεκτροφορητικό τύπο A της glucose-6-phosphate dehydrogenase (G-6-PD).

Σε αδρές γραμμές η χρήση κυτταρικών σειρών στην απομόνωση ρικετσιών βασίζεται στην επώαση για μια ώρα του δείγματος με τον κυτταρικό τάπητα σε θερμοκρασία δωματίου, επιτρέποντας έτσι να εισέλθουν οι ρικέτσιες στα κύτταρα τα οποία επωάζονται στους 32 με 34°C.

Δύο παράγοντες περιορίζουν την απόδοση των παραπάνω μεθόδων απομόνωσης α) Η πιθανή μόλυνση του δείγματος από άλλους βακτηριακούς παράγοντες και β) η πυκνότητα του δείγματος που εξαρτάται από την ποσότητα των ρικετσιών μέσα στο δείγμα. Πρακτικά, μόνο οι κυτταροκαλλιέργειες επιτρέπουν την εύκολη τροποποίηση της πυκνότητας του δείγματος.



Κύτταρα Vero ενοφθαλμισμένα με *R. conorii*

Αντιγονικά χαρακτηριστικά

Το αντιγονικό προφίλ των ρικετσιών χαρακτηρίζεται τυπικά από το κλάσμα του λιποπολυσακχαρίτη (ΛΠΣ), κοινό σε όλα τα είδη της ΟΚΠ (Anacker et al, 1987), και από πρωτεΐνες υψηλού μοριακού βάρους ειδικές για το είδος (Li et al, 1988). Η πρωτεΐνη 60 kDa, η οποία βρίσκεται σε όλες τις ρικέτσιες της ΟΚΠ (Vishwanath 1991) έχει παρατηρηθεί μόνο σε βαριά περιστατικά του ΜΚΠ και ποτέ σε ήπια (Taysseire & Raoult 1992). Ίσως να παίζει τον ρόλο δείκτη βαρύτητας της νόσου.

ΛΠΣ (60 kDa) Όπως όλα τα Gram αρνητικά βακτήρια, οι ρικέτσιες έχουν ΛΠΣ. Πιθανώς έχει διαφορετική χημική σύσταση από εκείνον της ΟΤ (Vishwanath 1991). Είναι αντιγονικός και έχει ιδιότητες ενδοτοξίνης (Raoult 1988). Παρουσιάζει συμπτωματολογία πυρετογένεσης σε κουνέλια και ινδόχοιρους (i.v. ένεση προκαλεί αύξηση της

ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΡΙΚΕΤΣΙΩΝ ΤΗΣ ΟΚΠ

Οι ρικέτσιες είναι ενδοκυττάρια βακτήρια, επομένως η ταυτοποίησή τους δεν μπορεί να βασισθεί σε μεταβολικές δοκιμασίες όπως εκείνες των εξωκυττάρων. Ο περιορισμός αυτού οδήγησε στην ανάπτυξη ορολογικών μεθόδων ταυτοποίησης, που με τον καιρό βελτιώθηκαν, χωρίς όμως να προσφέρουν μια πρακτική λύση στο πρόβλημα, επειδή αναγκαστικά εκτελούνται μόνο σε εξειδικευμένα εργαστήρια.

Τα τελευταία χρόνια η χρήση των τεχνικών μοριακής βιολογίας συνέβαλε σημαντικά στην ταυτοποίηση των ρικετσιών. Δεν κατόρθωσε όμως ακόμη μέχρι σήμερα να προσφέρει ένα ολοκληρωμένο σχήμα ταυτοποίησης. Προδιαγράφει όμως το μελλοντικό σχήμα ταυτοποίησης.

Στη συνέχεια παρουσιάζονται όχι μόνο οι τεχνικές ταυτοποίησης αλλά περιγράφεται και η εξελικτική πορεία των ερευνών που αφορούν τους κυριότερους χαρακτήρες (κριτήρια) που χρησιμοποιήθηκαν μέχρι τώρα στην ταυτοποίηση.

Οικολογικά κριτήρια: ταυτοποίηση του απομυζητικού εκτοπαρασίτου και γεωγραφική προέλευση του στελέχους

Η ταυτοποίηση του εκτοπαρασίτου με οικολογικά κριτήρια είναι χρήσιμη, αλλά δεν μπορεί από μόνη της να αποτελέσει ασφαλές και κοινά αποδεκτό κριτήριο. Για παράδειγμα, ακόμα και ανάμεσα στις ρικέτσιες της ΟΚΠ, οι οποίες μεταδίδονται κυρίως από κρότωνα, υπάρχει η *R. akari* που έχει ξενιστές μικρά ζώδια (*Allodermomyssus sanguineus*) και όχι κρότωνα (Saah 1990). Μερικά επίσης είδη ρικετσιών έχουν απομονωθεί από διαφορετικά είδη κροτώνων, όπως η *R. rickettsii* που απομονώθηκε από τους *Dermacentor spp.*, *Amblyomma spp.* και τον *R. sanguineus* (Raoult & Walker, 1990). Τέλος το ίδιο είδος κρότωνα μπορεί να μεταφέρει περισσότερα από ένα είδος ρικέτσιες. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί ο *R. sanguineus* από τον οποίο απομονώθηκαν οι *R. rickettsii*, *R. conorii*, *R. rhipicephali* και πρόσφατα το "Mt5" ή "*R. massiliai*" (Raoult & Walker, 1990; Gilot et al., 1990; Beati et al., 1992).

Η ταυτοποίηση των ρικετσιών με κριτήριο την γεωγραφική προέλευση τους ήταν αποδεκτή στο παρελθόν. Μερικές ρικέτσιες έχουν παγκόσμια εξάπλωση, άλλες βρίσκονται αποκλειστικά στο δυτικό ημισφαίριο, ενώ άλλες μόνο στο ανατολικό. Το κριτήριο αυτό εξακολουθεί να ισχύει για ορισμένες ρικέτσιες όπως η *R. canada*, που εμφανίζεται αποκλειστικά στο δυτικό ημισφαίριο και για την *R. sibirica* στο ανατολικό (Weiss & Moulder 1984). Για άλλες όμως ρικέτσιες δεν ισχύει αυτό γιατί οι περιοχές εξάπλωσής τους επικαλύπτονται. Στην Μεσόγειο επικρατεί η *R. conorii* (Espejo-Arenas & Raoult 1989). Επίσης έχουν απομονωθεί άλλα είδη όπως η *R. akari* (Novakovic et al., 1992b), η *R. slovaca* (Beati et al., 1993) και το στέλεχος Mt5 ή "*R. massiliai*" (Beati et al., 1992; Beati, Eremeeva et al., 1992). Ειδικά στο Ισραήλ απομονώθηκε το αίτιο του "Israeli spotted fever" ("*R. israelii*") το οποίο αποτελεί υπότυπο της *R. conorii* (Manor et al., 1992).

Ο χαρακτηρισμός εξάλλου των κροτωνογενών πυρετών της Ν. Αφρικής (South African tick typhus)(Walker and Gear, 1985), της Κένυας (Kenyan tick typhus), αλλά και της Ινδίας (Indian tick typhus)(Walker and Fishbein 1991; Stephen et al., 1980) μόνο με βάση την γεωγραφική τους προέλευση δεν είναι τελικά σωστός, αφού πρόσφατες έρευνες έδειξαν ότι ο αιτιολογικός παράγοντας και των τριών αυτών πυρετών είναι η *R. conorii*. Παρόλα αυτά ακόμα και σήμερα εξακολουθεί το κριτήριο της γεωγραφικής προέλευσης να χαρακτηρίζει τους παραπάνω πυρετούς.

Συμπερασματικά φαίνεται ότι η ταυτοποίηση του απομυζητικού εκτοπαρασίτου και η γεωγραφική προέλευση του στελέχους έπαιξε και παίζει σημαντικό ρόλο στον προσδιορισμό του ονόματος, αλλά όσο θα βελτιώνονται οι τεχνικές απομόνωσης και

ταυτοποίησης των ρικετσιών, τόσο πιο πολύ θα εξασθενεί η αξιοπιστία των οικολογικών και γεωγραφικών κριτηρίων στην ταυτοποίηση.

Καλλιεργητικοί χαρακτήρες

Οι ρικέτσιες δεν προκαλούν στις κυτταροκαλλιέργειες την χαρακτηριστική **κυτταροπαθογόνο δράση** (cytotoxigenic effect, **CPE**) που προκαλούν οι ιοί και που όπως είναι γνωστό διευκολύνει την ταυτοποίηση. Τα διάφορα είδη των ρικετσιών (σε αντίθεση με την *C. burnetii* που προκαλεί τον σχηματισμό μεγάλων κενοτοπιών στα κύτταρα) άλλοτε προκαλούν ποικίλο βαθμό ληκτική δράση που εξαρτάται από την κυτταρική σειρά και άλλοτε δεν προκαλούν καμιά εκφυλιστική αλλοίωση. Συγκεκριμένα, τα στελέχη του "Israeli spotted fever" (ή "*R. israeli*") προκαλούν αλλοιώσεις στα κύτταρα Vero και όχι στα κύτταρα L929. Η *R. rickettsii* και η *R. conorii* προκαλούν εξεσημασμένη CPE στα κύτταρα Vero και ασήμαντη στα L929, ενώ η *R. akari* δεν εμφανίζει κυτταροπαθογόνο δράση ούτε στα Vero ούτε στα L929. Οι πληροφορίες που μας δίνει επίσης ο σχηματισμός των "**πλακών**" (**plaque formation**) είναι περιορισμένες. Με τις ρικέτσιες της ΟΚΠ οι πλάκες σχηματίζονται πιο γρήγορα (5-8ημ) από ότι με τις ρικέτσιες της ΟΤ (8-10ημ), ενώ απαιτείται μεγαλύτερο χρονικό διάστημα για τον σχηματισμό τους από την *R. tsutsugamushi* (11-17ημ) (Weiss & Moulder 1984). Το **μέγεθος των "πλακών"** δεν επιτρέπει τον σαφή διαχωρισμό των ρικετσιών. Η διάμετρος των πλακών για τις ρικέτσιες της ΟΤ και την *R. tsutsugamushi* είναι γύρω στο 1 mm, ενώ για τις ρικέτσιες της ΟΚΠ είναι 2-3 mm (Weiss & Moulder 1984).

Σε σύγκριση με τις πενήνδες πληροφορίες που παρέχουν τα παραπάνω καλλιεργητικά χαρακτηριστικά, η μορφολογία των βακτηρίων και ο ενδοκυττάριος εντοπισμός τους δίνουν περισσότερο αξιολογήσιμα στοιχεία στην ταυτοποίηση. Με την χρήση Gimenez ή με τον ανοσοφθορισμό (ΑΦ) ή με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, η **μορφολογία των βακτηρίων** διαφέρει ανάλογα με το είδος. Έχει παρατηρηθεί μια μικρή διαφοροποίηση από ομάδα σε ομάδα (η *R. prowazekii* είναι μεγαλύτερη από την *R. rickettsii*), αλλά και ανάμεσα στα είδη της ίδιας ομάδας (η *R. rickettsii* είναι μεγαλύτερη από την *R. conorii*). Τέλος, ο **ενδοκυττάριος εντοπισμός** διαφέρει καθώς οι ρικέτσιες της ΟΤ και η *R. tsutsugamushi* εντοπίζονται μόνο στο κυτταρόπλασμα, ενώ της ΟΚΠ απαντώνται και στον πυρήνα. Στην πράξη λοιπόν ο συνδυασμός των καλλιεργητικών χαρακτηριστικών ενός υπό ταυτοποίηση στελεχούς μπορεί να συμβάλλει στην χάραξη μιας κατευθυντήριας γραμμής που αναμφίβολα είναι περισσότερο χρήσιμη στην προκαταρκτική ταυτοποίηση.

Αντιγονικοί χαρακτήρες

Είναι από τα βασικότερα κριτήρια στην ταυτοποίηση των ρικετσιών της ΟΚΠ. Διάφοροι μέθοδοι χαρακτηρισισμού με βάση τα αντιγόνα αναπτύχθηκαν διαδοχικά.

Η πρώτη μέθοδος που χρησιμοποίησε τα αντιγονικά χαρακτηριστικά ήταν οι αντιδράσεις Weil-Felix (WF) το 1916 (Weil & Felix 1916). Κατά την αντίδραση αυτή ο ορός ποντικών, που έχουν ενοφθαλισθεί με ρικέτσιες, φέρεται σε επαφή με τα σωματικά αντιγόνα τριών στελεχών του *Proteus*: OX-19, OX-2 και OX-K (βλ. επόμενο πίνακα).

Ομάδα	Αντιγόνα <i>Proteus</i>		
	OX-19	OX-2	OX-K
Τύφου	+	+	-
Κηλιδωδών	+	+	-
Πυρετών	+	+	-
Θάμων	-	-	+

Η δοκιμασία δεν χρησιμοποιείται πλέον γιατί εμφανίζει διασταυρούμενες αντιδράσεις.

Ο διαχωρισμός των ρικετσιών της ΟΚΠ από τις ρικέτσιες της ΟΤ, πραγματοποιήθηκε για πρώτη φορά με μελέτες *διασταυρούμενης προστασίας*. Οι μελέτες όμως αυτές έδειξαν ότι ο εμβολιασμός ποντικού με ένα ορισμένο είδος της ΟΚΠ προσφέρει προστασία έναντι του είδους αυτού αλλά όχι έναντι των άλλων ειδών της ομάδας (Philip et al, 1978).

Η πρώτη όμως πραγματική ορολογική ταυτοποίηση των ρικετσιών πραγματοποιήθηκε το 1942 από τον Plotz, ο οποίος κατόρθωσε να ξεχωρίσει την ΟΚΠ από την ΟΤ με τη *δοκιμασία σύνδεσης συμπληρώματος*. Κατά την εκτέλεση της δοκιμής αυτής ο Plotz δεν χρησιμοποίησε ακέραια τα υπό ταυτοποίηση στελέχη αλλά διαλυτό παράγοντα εκχύλισης των στελεχών αυτών. Τον παράγοντα αυτό έφερε σε επαφή με γνωστούς αντιορρούς ποντικών που είχαν ανοσοποιηθεί με τα διάφορα είδη ρικετσιών. Το 1944 κατόρθωσε με την ίδια μέθοδο και χρησιμοποιώντας αντιγόνο που δεν περιείχε τον διαλυτό παράγοντα, να διαχωρίσει δύο είδη της ΟΚΠ, την *R. conorii* και την *R. rickettsii* (Plotz et al, 1944).

Πολύ αργότερα ο Bell πέτυχε την ταυτοποίηση άλλων ρικετσιών της ΟΚΠ (*R. conorii* και *R. sibirica*) χρησιμοποιώντας διαφορετική μεθοδολογία: τη δοκιμασία εξουδετέρωσης της τοξίνης. Με την in vitro αυτή δοκιμασία η υπό ταυτοποίηση ρικέτσια επαυξάνεται με γνωστούς αντιορρούς έναντι ειδών της ΟΚΠ. Στη συνέχεια η τοξίνα ενίσταται σε ποντίκια. Με τον τρόπο αυτό η ταυτοποίηση της ρικέτσιας στηρίζεται στην εμφάνιση ή όχι τοξικών φαινομένων, που εξαρτώνται από το αν εξουδετερώθηκε ή όχι η τοξίνη κατά την επίωση (Bell & Stoenner 1960). Παρόλο που η δοκιμασία εξουδετέρωσης της τοξίνης ταυτοποιεί το είδος, ο Bell δεν μπόρεσε να ταυτοποιήσει τον αιτιολογικό παράγοντα (ορότυπο της *R. conorii*) του κροτωνογενή πυρετού της Ν. Αφρικής, της Κένυας και της Ινδίας από την *R. conorii*.

Ο ίδιος ερευνητής τρία χρόνια αργότερα χρησιμοποίησε την σύνδεση συμπληρώματος για να προσδιορίσει την ομάδα του στελέχους που απομόνωσε από κρότωνες στην Montana (USA) και την δοκιμασία εξουδετέρωσης της τοξίνης για να προσδιορίσει το είδος. Με την σύνδεση συμπληρώματος το υπό ταυτοποίηση στέλεχος έδωσε διασταυρούμενες αντιδράσεις με άλλα είδη της ΟΚΠ όχι όμως με την *R. prowazekii*, την *R. typhi* και την *C. burnetii*. Στη συνέχεια με τη δοκιμασία εξουδετέρωσης της τοξίνης, αντιορός του νέου στελέχους αδυνατούσε να εξουδετερώσει άλλα είδη της ΟΚΠ. Το νέο είδος ονομάστηκε *R. montana* (Bell et al, 1963). Δύο χρόνια αργότερα ο Pickens χρησιμοποιώντας την ίδια μεθοδολογία ξεχώρισε δύο επιπλέον ρικέτσιες, την *R. akari* και την *R. australis* (Pickens et al, 1965). Αν εξαιρέσει κανείς τον διαχωρισμό των ρικετσιών της ΟΤ από τις ρικέτσιες της ΟΚΠ με την δοκιμασία της σύνδεσης συμπληρώματος - όπως την πρότεινε ο Plotz και που εφαρμόστηκε σαν εξέταση ρουτίνας στο CDC (Centers for Disease Control) - όλες οι άλλες μέθοδοι δεν είναι ολοκληρωμένες ούτε επαναλήψιμες γιατί εμφανίζουν το μειονέκτημα της περιορισμένης εφαρμογής σε μικρό αριθμό στελεχών.

Η ορολογική μέθοδος ταυτοποίησης των ρικετσιών που ανέπτυξε ο Philip αποτελεί, ακόμη και σήμερα, την πρώτη συστηματική και ολοκληρωμένη προσπάθεια (Philip et al, 1978). Με την μέθοδο αυτή η ταυτοποίηση των ρικετσιών επιτυγχάνεται με διασταυρούμενο ανοσοφορισμό και υπολογισμό του βαθμού απόκλισης μεταξύ των στελεχών (Specificity Difference, SPD). Ποντίκια ενοφθαλμίζονται με τα προς ταυτοποίηση στελέχη και γίνεται λήψη του ορού 10 ημ μετά τον ενοφθαλμισμό. Στη συνέχεια προσδιορίζεται με ανοσοφορισμό ο τίτλος του κάθε ορού έναντι κάθε στελέχους. Ομόλογοι οροί εμφανίζουν υψηλότερους τίτλους από τους ετερόλογους. Με τον έμμεσο ΑΦ οι οροί των ποντικών αναγνωρίζουν τα ομόλογα αντιγόνα, δηλ. τα αντιγόνα που ενοφθαλμίζονται στα ποντίκια για να παραχθεί αντιορός, σε αραιώσεις που

είναι πιο υψηλές από εκείνες των ετερόλογων αντιγόνων. Με αυτό τον τρόπο εξετάζοντας 72 διαφορετικά στελέχη ο Philip αποκάλυψε 15 διαφορετικούς ορότυπους, δώδεκα για τις ρικέτσιες της ΟΚΠ και τρεις για την ΟΤ. Από τούς δώδεκα ορότυπους της ΟΚΠ, εννέα αντιστοιχούν σε γνωστά ρικετσιϊκά είδη: *R. rickettsii* "R" strain, *R. rickettsii* "Hpi" strain, *R. conorii*, *R. sibirica*, *R. parkeri*, *R. rhipicephali*, *R. montana*, *R. australis* και *R. akari*. Οι υπόλοιποι τρεις ορότυποι αντιστοιχούν σε μη ταξινομήσιμα στελέχη.

Παράλληλα έγινε σαφές η έλλειψη διασταυρούμενων αντιδράσεων της *R. canada* με τα υπόλοιπα μέλη της ΟΤ, ενώ διαπιστώθηκαν διασταυρούμενες αντιδράσεις της *R. akari* με την ΟΤ.

Με την μέθοδο του Philip ταυτοποιήθηκε από τον Burgdorfer και τον Peter, το 1979 και το 1985 αντίστοιχα, η *R. helvetica* (Burgdorfer et al, 1979; Peter et al, 1985) και πιο πρόσφατα από τον Uchida η *R. japonica* (Uchida et al, 1989; Uchida et al, 1992). Η τελευταία ταυτοποίηση, που αφορά ένα νέο είδος που βρέθηκε στην Ζιμπάμπουε (Νοτιοανατολική Αφρική), πραγματοποιήθηκε το 1990 από τον Kelly (Kelly & Mason 1990).

Επομένως η παραπάνω μέθοδος εμφανίζει σημαντικά πλεονεκτήματα σε σχέση με τις προηγούμενες. Τα μειονεκτήματα της όμως είναι ότι απαιτεί την παραγωγή ικανών ποσοτήτων αντιγόνου από όλα τα στελέχη αναφοράς και από τα υπό ταυτοποίηση στελέχη. Επίσης απαιτείται η παραγωγή πολυκλωνικών ορών ποικίλου, με συνέπεια σημαντική κατανάλωση χρόνου, πειραματοζώων και ανθρώπινης εργασίας. Επειδή η πλήρης εκτέλεση της μεθόδου του Philip και ο υπολογισμός της SPD είναι επίπονος και χρονοβόρος, στην πράξη εκτελείται συνήθως κατά τρόπο "επιλεκτικό" με περιορισμένο αριθμό ορών αναφοράς και χωρίς τον υπολογισμό της SPD.

Με την χρήση των μονοκλωνικών αντισωμάτων μπορεί να επιτευχθεί μεγαλύτερη ειδικότητα, χωρίς όμως να είναι η αναμενόμενη γιατί τα περισσότερα από αυτά δίνουν διασταυρούμενες αντιδράσεις, με παρόμοιους επίτοπους που βρίσκονται σε άλλα είδη ρικετσιϊκών. Το 1984 ο Lange παρήγαγε για πρώτη φορά μονοκλωνικά αντισώματα έναντι της *R. rickettsii*, τα οποία όμως αντιδρούσαν ασθενώς με την μη παθογόνο *R. montana* (Lange & Walker 1984). Μονοκλωνικά αντισώματα ειδικά του είδους στην ΟΚΠ υπάρχουν έναντι της *R. rickettsii* (Lange & Walker 1984; Li et al, 1988), της *R. akari* (Medade et al, 1988) και της *R. japonica* (Uchiyama 1990), στην ομάδα των θάμων έναντι της *R. tsutsugamushi* (Murata et al. 1986) και στην ΟΤ έναντι της *R. prowazekii* (Black et al, 1983). Ο Anacker παρήγαγε μονοκλωνικά αντισώματα έναντι στελεχών της *R. rickettsii*. Το καθένα από τα μονοκλωνικά αυτά αντισώματα αναγνωρίζει επίτοπους σε πολλά είδη της ΟΚΠ (*R. rickettsii*, *R. conorii*, *R. akari*, *R. sibirica*, *R. parkeri*, *R. rhipicephali*, *R. montana*, *R. australis*). Ο συνδυασμός των μονοκλωνικών αυτών αντισωμάτων δίνει διαφορετική κατατομή διασταυρούμενων αντιδράσεων που είναι χαρακτηριστική για κάθε είδος. Ο ίδιος ερευνητής παρήγαγε επίσης μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του ΑΠΣ της *R. rickettsii*, το οποίο εμφάνιζε διασταυρούμενες αντιδράσεις με τους ΑΠΣ όλων των ειδών της ΟΚΠ αλλά με κανένα είδος της ΟΤ. Η χρησιμότητα των ειδικών έναντι του ΑΠΣ μονοκλωνικών είναι αναμφισβήτητη σημαντική για τον διαχωρισμό της ομάδας. Η διαγνωστική όμως αξία των υπόλοιπων μονοκλωνικών για τον προσδιορισμό του είδους είναι περιορισμένη, γιατί η κατατομή των διασταυρούμενων αντιδράσεων που δίνουν έχει μελετηθεί σε πέντε μόνο είδη.

Κατά τους Li και Walker (1988) οι επίτοποι τόσο οι κοινοί της ομάδας όσο και οι ειδικοί του είδους εδράζονται πάνω στο ίδιο θερμοευσταθισμένο πολυπεπτιδίο. Το πολυπεπτιδίο αυτό κατανέμεται άνισα σε δύο διαφορετικής ηλεκτροφορητικής κινητικότητας πρωτεΐνες που κατά ευτυχή σύμπτωση είναι συνήθως διαφορετικές στο

θερμοκρασίας), δερματικής αναφυλαξίας (μετά από ενδοδερμική ένεση) και τις αντιδράσεις του Schartzman σε κουνέλι (μετά από ενδοφλέβια χορήγηση ΛΠΣ, έχουμε εμφάνιση αιμορραγίας στο σημείο που έχει ευαισθητοποιηθεί με ενδοδερμική ένεση)(Schramek et al, 1977).

Η χυμική ανοσία του ανθρώπου πρωταρχικά κατευθύνεται κατά του ΛΠΣ (Beati 1991). Είναι το πρώτο αντιγόνο που παρουσιάζεται από τα μακροφάγα στον ΜΚΠ (Teyseire & Raoul 1992). Αντίθετα, η λοιμογόνος δύναμη της ρικέτσιας φαίνεται ότι δεν οφείλεται στον ΛΠΣ.

ΠΡΩΤΕΙΝΕΣ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΣ: Η τεχνική της ηλεκτροφόρησης (SDS-PAGE) μας έδωσε την δυνατότητα διαφοροποίησης πρωτεϊνών διαφορετικού ΜΒ. Υπάρχουν 5-6 κύριες πρωτεΐνες στην ΟΚΠ (Eisemann & Osterman 1976; Pedersen & Walters 1978). Οι κοινές αντιγονικές πρωτεΐνες 120-160 kDa σε όλες τις ρικέτσιες της ΟΚΠ υποδηλώνουν την ύπαρξη κοινού προγόνου (Anacker et al, 1987). Το immunoblot μας έδωσε την δυνατότητα αποκάλυψης των πρωτεϊνών υψηλού μοριακού βάρους ειδικές για το είδος: 135- και 150-kDa για την *R. rickettsii*, ενώ 115- και 135-kDa για τις *R. conorii* και *R. sibirica* (Li et al, 1988).

Στοιχεία γενετικής

Το γένομα των ρικετσιών της ΟΚΠ είναι μόνο χρωμοσωμικό. Δεν έχει παρατηρηθεί η παρουσία πλάσμιδιου. Το μήκος του γενόματος είναι $1-1,5 \times 10^9$ daltons (Weiss & Moulder 1984). Το περιεχόμενο σε G+C του DNA τους είναι 32 με 33% (Weiss & Moulder 1984).

Το ποσοστό υβριδισμού ανάμεσα στην ΟΚΠ και την ΟΤ ποικίλει μεταξύ 36 κα 53% ανάλογα με τα υπό μελέτη είδη (Weiss 1982), ενώ ανάμεσα στα διάφορα είδη της ΟΚΠ είναι της τάξης του 75%. Τέλος, ανάμεσα στα διαφορετικά στελέχη του ίδιου είδους είναι πάντα κοντά στο 100% (Weiss 1982).

Έχει δημοσιευθεί η κλωνοποίηση και η ανίχνευση της αλληλουχίας 5 γονιδίων. Τα δύο από αυτά κωδικοποιούν τα ένζυμα:

-κιτρική συνθετάση (Wood et al, 1987)

-ADP/ATP translocase (Williamson et al, 1989)

Τα υπόλοιπα τρία κωδικοποιούν αντιγονικές πρωτεΐνες επιφάνειας:

-την 17 kDa (Anderson et al, 1987; Anderson & Tzianabos 1989)

-την 120 kDa (Gilmore et al, 1989; Gilmore 1990)

-την 190 kDa ή 155 kDa ανάλογα με την δημοσίευση (Policastro et al, 1990, Anderson 1990).

κάθε είδος. Στην *R. rickettsii* είναι οι πρωτεΐνες 150- και 135-kDa και στις *R. conorii* και *R. sibirica* είναι οι 115- και 135-kDa. Τα παραπάνω δεδομένα υπολογίζουν την διερεύνηση και απομόνωση των ειδικών επιτόπων καθώς επίσης και την παραγωγή αντιδιστοτικών αντισωμάτων.

Η προοπτική παραγωγής νέων μονοκλωνικών αντισωμάτων για τα υπόλοιπα είδη ρικετιών θα καταστήσει δυνατή στο μέλλον μια εύκολη, ειδική και γρήγορη ταυτοποίηση, που θα αντικαταστήσει την μέθοδο του Philip.

Χαρακτηριστικά πρωτεϊνών

Η κατατομή των πρωτεϊνών στις ρικετίαιες μελετήθηκε με την τεχνική της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου παρουσία SDS (SDS-PAGE). Τα αποτελέσματα των πειραμάτων δύσκολα συγκρίνονται μεταξύ τους, δεδομένου ότι τόσο ο τρόπος καλλιέργειας των ρικετιών όσο και οι εφαρμοζόμενες τεχνικές ποικίλλουν.

Η κατατομή των πρωτεϊνών προσδιορίστηκε για πρώτη φορά από τον Obijeski (Obijeski et al, 1974) σε ρικετίαιες που είχαν καλλιεργηθεί σε εμβρυοφόρο σάκο αυγού και αργότερα από τον Eismann σε ραδιοσημασμένες ρικετίαιες από κυτταροκαλλιέργειες (Eismann et al, 1976). Τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών, που επιβεβαιώθηκαν από τον Osterman το 1978 έδειξαν ότι ρικετίαιες της OT (*R. prowazekii* και *R. typhi*) όσο και ρικετίαιες της ΟΚΠ (*R. conorii*, *R. rickettsii* και *R. akari*) εμφανίζουν περισσότερες από 20 πρωτεΐνες (μεταξύ 20 και 30) εκ των οποίων 6-7 είναι μείζονες (85-, 63-, 35-, 27-, 22- και 15-kDa) και οι υπόλοιπες ελάσσονες (Osterman & Eismann 1978). Ο Eismann βρήκε ότι οι πρωτεΐνες μικρού MB εμφανίζουν μεγάλη γενετική ποικιλία στα είδη της OT αλλά και της ΟΚΠ που εξέτασε. Στηριζόμενος στα αποτελέσματα αυτά θεωρεί ότι η σύγκριση της κατατομής των πρωτεϊνών επιτρέπει τον διαχωρισμό των ειδών μόνο εφόσον ηλεκτροφορηθούν στην ίδια πηκτή ακρυλαμίδης. Ο Pedersen το 1978 συγκρίνοντας τις μείζονες πρωτεΐνες 5 ειδών της ΟΚΠ βρήκε ότι η κατατομή τους είναι ίδια για όλα τα είδη εκτός από την *R. akari* στην οποία δεν εμφανίζεται η πρωτεΐνη 25-kDa (Pedersen & Walters 1978). Ο Anacker το 1987 μελέτησε την πρωτεϊνική κατατομή 10 ειδών της ΟΚΠ και έπαισημανε πρωτεΐνες με ίδια ηλεκτροφορητική κινητικότητα κυρίως στα μεγάλα MB (120- έως 160-kDa) καθώς επίσης και αρκετές στα μικρά MB (Anacker et al, 1987). Τελικά οι Beati et al το 1991 συγκρίνουν τις πρωτεΐνες 11 ειδών της ΟΚΠ και βρίσκουν ότι πολλές από τις πρωτεΐνες χαμηλού MB (-50-kDa) είναι ίδιες, ενώ αντίθετα οι πρωτεΐνες υψηλού MB (>50-kDa) είναι διαφορετικές και μπορούν συνεπώς να χρησιμοποιηθούν στην διαφοροποίηση των ειδών (Beati & Finidori et al, 1992). Οι πρωτεΐνες υψηλού MB που χαρακτηρίζουν κάθε είδος είναι συνήθως πάνω από δύο (2-5) και παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα.

<i>R. conorii</i>	<i>R. rickettsii</i>	<i>R. sibirica</i>	<i>R. slovaca</i>	<i>R. parkeri</i>	<i>R. australis</i>	<i>R. akari</i>	TTT	ITT	<i>R. rhipicephali</i>	<i>R. massilia</i>
125	150	150	135	145	145	145	140	148	150	140
115	135	135	125	115	130	140	135	140	140	110
		100	115		106	135	130	135	115	
		306				300	110	120	110	
						90	306	110	100	

TTT: Thai tick typhus rickettsia

ITT: Israeli tick typhus rickettsia

Η αξία της μεθόδου (SDS-PAGE) στην ταυτοποίηση οφείλεται στο ότι από την μία αναζητούνται οι χαρακτηριστικές πρωτεΐνες του κάθε είδους και συγκρίνονται οι

πρωτεΐνες υψηλού ή χαμηλού MB, ενώ από την άλλη αναζητείται η πλήρης ταύτιση όλων των πρωτεϊνών του υπό μελέτη στελέχους με ένα από τα στελέχη αναφοράς. Μειονέκτημα της μεθόδου είναι η απώλεια ή αλλοίωση σημαντικών πρωτεϊνών και επιτόπων κατά την διαδικασία καθαρισμού, αλλά και το ότι για μια επιτυχή σύγκριση απαιτείται η ταυτόχρονη ηλεκτροφόρηση στην ίδια πηκτική διατηρώντας ίδιες τις πειραματικές συνθήκες καθαρισμού των στελεχών. Η μελέτη της κατατομής των πρωτεϊνών δεν υποκαθιστά την μέθοδο του Philip αλλά αποτελεί χρήσιμη συμπληρωματική τεχνική, η ακριβής θέση της οποίας καθορίζεται στον πρωτεινόμενο αλγόριθμο ταυτοποίησης (βλ. σελ. 23).

Ο Peter το 1985 δεν αρκείται στην μελέτη της κατατομής των πρωτεϊνών μετά από ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης παρουσία SDS, αλλά με την τεχνική του Western blot αποκαλύπτει με ειδικούς αντιπορούς κονίκλου τις ανοσογόνες πρωτεΐνες των *R. rickettsii*, *R. conorii*, *R. sibirica*, *R. slovaca* και *R. helvetica* (Peter et al, 1985). Με την μέθοδο αυτή ο Peter βρήκε ότι το κάθε είδος δίνει με καθένα από τους αντιπορούς συνδυασμό πρωτεϊνών που είναι χαρακτηριστικός του είδους και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίηση. Η μέθοδος του δεν επαληθεύτηκε από άλλους ερευνητές αλλά ούτε και ο ίδιος επέκτεινε το σχήμα ταυτοποίησης σε όλα τα είδη της ΟΚΠ. Παρά τους περιορισμούς του προηγούμενου σχήματος ταυτοποίησης, η τεχνική της ανοσοκαθήλωσης (Western blot) χρησιμοποιήθηκε στην ταυτοποίηση με επιτυχή και απλό τρόπο. Ο Vishwanath προκάλεσε ανοσοκαθήλωση της *R. rickettsii*, *R. conorii*, *R. sibirica*, *R. akari*, *R. australis*, *R. prowazekii*, *R. typhi* και *R. canada* με πολυκλωνικούς αντιπορούς ινδοχοίρων που μόλυνε με καθένα από τα παραπάνω στελέχη (Vishwanath 1991). Βρήκε ότι όλες οι ρικετίσιες που μελέτησε έχουν κοινά τα παρακάτω αντιγόνα: 135-, 58-kDa και 43-kDa. Η ανοσοκαθήλωση της 135-kDa είναι πιο έντονη όταν συνδέεται με τον ομόλογο αντιπόρο. Κατά τον Vishwanath διαγνωστική αξία στην ταυτοποίηση έχει πρωτεΐνη υψηλού MB της οποίας η ηλεκτροφορητική κινητικότητα βρίσκεται στην περιοχή των 190-kDa. Συγκεκριμένα η πρωτεΐνη αυτή στην *R. conorii* έχει MB 198-kDa, στην *R. rickettsii* και *R. canada* 190-kDa, στην *R. akari* και *R. australis* 170-kDa και στην *R. sibirica* 165-kDa. Τα αντιγόνα αυτά δεν εμφανίζονται ούτε στην *R. prowazekii* ούτε στην *R. typhi*. Ο Vishwanath βρήκε επίσης ότι όλες αυτές οι πρωτεΐνες, εκτός από εκείνες της *R. australis*, εμφανίζουν παρόμοια αντιγονική ειδικότητα εφόσον αντιδρούν με τον ίδιο μονοκλωνικό πολυκλωνικό ανοσοπόρο αντι-190-kDa και 198-kDa. Θεωρούμε ότι η σημασία της μελέτης αυτής εφόσον επαληθευθούν τα δεδομένα, εκτός από την διαγνωστική τους αξία, έγκειται στο γεγονός ότι μια κοινή ομάδα πρωτεϊνών (190-kDa) διαφέρει από είδος σε είδος επειδή ο αριθμός αμινοξέων έχει υποκατασταθεί, πιθανώς λόγω μεταλλάξεων.

Το 1992 οι Beati et al ανοσοκαθήλωσαν τις πρωτεΐνες των *R. conorii*, *R. sibirica*, *R. slovaca* και *R. rhipicephali* με πολυδύναμους έναντι των πιο πάνω ρικετίσιν ορούς ποντικών (Beati & Finidori et al 1992). Κα'αυτούς οι ειδικές πρωτεΐνες που εμφανίζει η *R. conorii* έχουν MB 106- και 115-kDa, η *R. rhipicephali* 105- και 135-kDa, η *R. sibirica* 100- και 106-kDa, η *R. slovaca* 100- και 110-kDa. Παρόλο που τα αποτελέσματα των Vishwanath και Beati δεν συμπίπτουν σε ότι αφορά τα MB των χαρακτηριστικών στην ανοσοκαθήλωση αντιγόνων, θεωρούμε ότι η τεχνική αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην ταυτοποίηση των ρικετίσιν αρκεί η πραγματοποίηση της να γίνεται με τις ίδιες πειραματικές συνθήκες. Όπως και με την ηλεκτροφόρηση πολυακρυλαμίδης παρουσία SDS (SDS-PAGE) έτσι και με το Western blot ανιχνεύονται οι χαρακτηριστικές για το είδος πρωτεΐνες και αναζητείται η πλήρης ταύτιση των πρωτεϊνών του υπό ταυτοποίησης στελέχους με ένα από τα στελέχη αναφοράς.

Εκτός από την τεχνική του Western Blot μερικοί ερευνητές χρησιμοποίησαν την τεχνική της ραδιοανοσοκαθίζησης (radioimmunoprecipitation, RIPA) για την αναγνώριση

αντιγόνων χρήσεων στην ταυτοποίηση. Η τεχνική αυτή εφαρμόστηκε τόσο με μονοκλωνικά αντισώματα (Anacker et al, 1987) όσο και με πολυδύναμους αντιορούς ινδοχοίρων (Williams et al., 1986). Δυστυχώς όμως οι παραπάνω μελέτες χρησιμοποιήσαν μόνο την *R. rickettsii* για την παραγωγή αντισωμάτων και κανένα άλλο είδος. Παρόλα αυτά ο Williams αναγνώρισε ανάμεσα στα χαμηλά MB την πρωτεΐνη 16,5-kDa, η οποία εκ των υστέρων βρέθηκε σε όλες τις ρικετίαιες. Η πραγματοποίηση συγκριτικών μελετών με την τεχνική αυτή θα μπορούσε να αποκαλύψει την ύπαρξη ανοσοποιητικών πρωτεϊνών που δεν μπορούν να αποκαλυφθούν με την τεχνική του Western blot επειδή καταστρέφονται κατά την θέρμανση. Επομένως με το Western Blot και τη RIPA γίνεται δυνατή η αναγνώριση επιτόπων κοινών της ομάδας και ειδικών του είδους είτε με την χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων ή με μονοδύναμους πολυκλωνικούς αντιορούς ποντικών, ινδοχοίρων και κοκκίλων. Με τις τεχνικές αυτές έχουν αναγνωρισθεί διάφορες πρωτεΐνες. Οι πρωτεΐνες αυτές έχουν MB 190-, 120- και 17-kDa, αν και ο προσδιορισμός του μοριακού τους βάρους ποικίλει ανάλογα με την συγκέντρωση της πολυακρυλαμίδης στην πηκτή (190- ή 170- ή 155-kDa και 120- ή 135- ή 133-kDa). Οι πρωτεΐνες αυτές φέρουν επίτοπους κοινούς της ομάδας και του είδους, η δε αποκάλυψη τους μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίηση σε συνδυασμό με τα οικολογικά και γεωγραφικά χαρακτηριστικά.

Γονοτυπική ταυτοποίηση

Η εφαρμογή των τεχνικών μοριακής βιολογίας σε συνδυασμό με τις σύγχρονες τεχνικές ταξείας απομόνωσης των ρικετιών συνέβαλαν ουσιαστικά στην ταυτοποίηση των ρικετιών.

Πρόσφατα, με την εισαγωγή της τεχνικής της αλυσιδωτής αντίδρασης της DNA πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) (Saiki et al., 1988) οι συνθήκες ταυτοποίησης των διαφόρων βακτηρίων έχει αλλάξει ριζικά (Welsh & McClelland 1992, Holland et al., 1990). Η συγκεκριμένη τεχνική είναι ευαίσθητη και εύρηστη, ενώ παρουσιάζει ενδιαφέρον γιατί απαλλάσσει τον ερευνητή από την χρονοβόρα, επίπονη και επικίνδυνη πολλές φορές απομόνωση των ρικετιών σε κυτταροκαλλιέργεια (Peter 1991). Εφαρμόστηκε τα τελευταία χρόνια μετά την ανάλυση της αλληλουχίας των γονιδίων που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες 17-kDa (Anderson et al., 1987), 120-kDa (Gilmore et al., 1989), 190-kDa (Anderson 1990) αλλά και τη κυτταρική συνθέτασή (Wood et al., 1987). Η χρήση της χαρακτηρίστηκε ως σταθμός στην γονοτυπική ταυτοποίηση των ρικετιών (Drancourt et al., 1991; Regnery et al., 1991; Regnery 1991). Ο Tzianabos το 1989 εφάρμοσε με επιτυχία την νέα τεχνική στο αίμα ασθενών με ΚΠΒΟ και ΜΚΠ (Tzianabos et al., 1989). Στην πρώτη αυτή προσπάθεια χρησιμοποιήθηκαν ειδικοί εναρκτές για το γονίδιο της 17-kDa αντιγονικής πρωτεΐνης, η οποία είναι κοινή στην ΟΚΠ και ΟΤ (Anderson & Tzianabos 1989). Την ίδια χρονιά ο Carl είχε όμοια αποτελέσματα ανιχνεύοντας DNA από ασθενή επιδημικού τύπου (Carl et al., 1990). Το 1990 ο Kelly D.J. χρησιμοποιώντας εναρκτές της 56-kDa ανίχνευσε εκλεκτικά την *R. tsutsugamushi* ανάμεσα σε άλλα στελέχη αναφοράς (Kelly D.J. et al., 1990).

Η καινοτομία του PCR είναι ότι έδωσε την δυνατότητα ανίχνευσης ρικετιών απ'ευθείας από τον ξενιστή. Τα πειραματικά μολυσμένα αρθρόποδα απλά είχαν βράσει μέσα σε διάλυμα πριν την διαδικασία του γονιδιωμικού κολλαπλασιασμού, αποφεύγοντας με τον τρόπο αυτό την διαδικασία απομόνωσης των ρικετιών και εξαγωγής του DNA (Azad et al., 1990; Webb et al., 1990; Grage et al., 1992).

Ο Regnery το 1991 (1991) πολλαπλασίασε με PCR στελέχη αναφοράς των ρικετιών με εναρκτές της κυτταρικής συνθέτασης και του γενώματος της 190-kDa. Μετά από υδρόλυση με τα περιοριστικά ένζυμα *Afu I*, *Rsa I* και *Pst I* βρήκε ότι οι κατατομές των διαφόρων

στελεχών διαφέρουν μεταξύ τους και αποτελούν σημείο αναφοράς για την σημερινή γονοτυπική ταυτοποίηση των ρικετσιών.

Οι παραπάνω μελέτες πραγματοποιήθηκαν σε στελέχη αναφοράς ή σε πειραματικά μολυσμένα αρθρώποδα. Μέχρι στιγμής δεν έχει δημοσιευθεί κανένα πρωτόκολλο ανίχνευσης και ταυτοποίησης ρικετσιών που να αξιοποιεί τα σημαντικά πλεονεκτήματα του PCR σε φυσικά μολυσμένα αρθρώποδα.

Πολύ πρόσφατα, η ηλεκτροφόρηση πηκτής με ώση πεδίου (Pulsed Field Gel Electrophoresis, PFGE) έδωσε νέα ώθηση στις ελπίδες για ειδική ταυτοποίηση των ρικετσιών επιτρέποντας την ανάλυση του συνόλου του γενόματος (Chu et al, 1986). Για τα ενδοκυττάρια βακτήρια, η ανάλυση της κατατομής μετά από την επίδραση περιοριστικών ενζύμων και τον διαχωρισμό των κλασμάτων με ώση πεδίου (PFGE) έχει ήδη εφαρμοστεί στην *C. burnetii* (Heinzen et al, 1990), στο *Mycoplasma* (Ladefoged & Christiansen 1992), στα *Chlamydia* (Birkenlund & Stephens 1992), την *Listeria monocytogenes* (Brosch et al, 1991), τα *Porochlamydia* και *Rickettsiella* (Frutos et al, 1989) και την *Brucella* (Allardet-Servan et al, 1991). Η Roux αρκετά πρόσφατα εφάρμοσε την ίδια τεχνική στην ταξινόμηση των ρικετσιών της ΟΚΠ (Roux & Raoult 1993), προσδιορίζοντας όμως και μερικές προκαταρκτικές κατατομές υδρόλυσης με περιοριστικά ένζυμα. Πιθανόν οι κατατομές αυτές να αποτελέσουν σημείο αναφοράς και για την ταυτοποίηση των ρικετσιών.

Ανακεφαλαιώνοντας, η ταυτοποίηση των ρικετσιών είναι κυρίως ορολογική. Μέθοδος αναφοράς είναι η μέθοδος του Philip. Επειδή η τεχνική αυτή είναι χρονοβόρα, στην πράξη χρησιμοποιείται κατ'αρχάς η επιλεκτική μέθοδος του Philip ανάλογα με τα οικολογικά ή γεωγραφικά χαρακτηριστικά του υπό ταυτοποίηση στελέχους. Εκτός από την μέθοδο του Philip, η ταυτοποίηση των ρικετσιών είναι εφικτή με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακυρυλαμίδης (SDS-PAGE), Western Blot και RIPA υπό την προϋπόθεση ότι οι τεχνικές αυτές πραγματοποιούνται κάτω από τις ίδιες πειραματικές συνθήκες. Το PCR προσέφερε αρκετές λύσεις στα προβλήματα των προηγούμενων τεχνικών. Είναι σχετικά απλή και ελαχιστοποιεί τις υποκειμενικές ερμηνείες των αποτελεσμάτων. Με την σειρά της το PFGE αυξάνει την ειδικότητα των μεθόδων ταυτοποίησης. Η μεγάλη όμως κατανάλωση χρόνου που απαιτεί καθιστούν απαγορευτική την χρήση της στην καθημερινή ταυτοποίηση των ρικετσιών.

Στην επόμενη σελίδα ακολουθεί ο προτεινόμενος αλγόριθμος ταυτοποίησης.

Κατανοή

Εξέλιξη

Υπο την μορφήν επιλέγει περ τριμας

PCR-HELP
Πολυπλοκότητα με ενεργούς
της κίρκους συνθήκης
να υφίσταται με Αβ1

PCR-HELP
Πολυπλοκότητα με ενεργούς
της 190-κω να υφίσταται
με Real και PstI

Η κατανοή του επιλέγει
αποταπει σε μη αναμένοντα
για την κίρκου επιλέγει

Κατανοή και επιλέγει
οπορτισμένη με αποταπει
ενορροή

Επιλέγει των αποταπει
του PCR-HELP με την
επιλέγει οπορτισμένη

Ταυτοποίηση επιλέγει

Τέλος

Μη αναμένοντα περ τριμας

Τέλος

Γνωστή κατανοή υφίσταται
αποταπειμονα
για την κίρκου επιλέγει

Ταυτοποίηση επιλέγει

Τέλος

Αγνωστή κατανοή υφίσταται

Κατανοή οπορτισμένη
με τη μέθοδο του Phlo
και αποταπει της κατανοής
με SIS-PAGE και WB

Επιλέγει των αποταπει
του PCR-HELP με τη μέθοδο
του Phlo και SIS-PAGE
και το WB

Ταυτοποίηση νέου επιλέγει

Τέλος

+

+

+

+

+

+

+

+

+

ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

Οικολογία

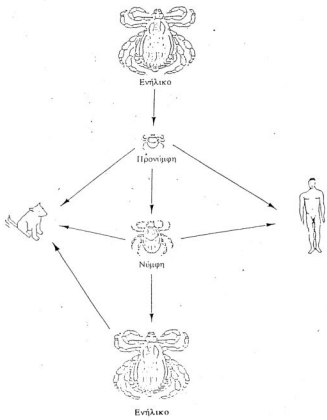
Οι ρικετίαιες της ΟΚΠ μεταδίδονται από τους κρότωνα (κοινά τσιμπούρια), τα οποία χρησιμεύουν και σαν φορείς και σαν ενδιάμεσοι ξενιστές του παρασίτου (Rehacek 1989). Εντοπίζονται κυρίως στα κύτταρα που επενδύουν τον πεπτικό σωλήνα των κροτώνων. Η μετάδοση γίνεται από γενεά σε γενεά διωθητικά (Rehacek 1989). Η διατήρηση των ρικετσιών στους κρότωνα εξαρτάται από την θερμοκρασία του περιβάλλοντος και μπορεί να διαρκέσει πολλούς μήνες. Ο άνθρωπος μολύνεται είτε από δάγμα κρότωνα ή όταν συνθλίβει κρότωνα στη μύτη ή στα μάτια. Η μόλυνση μπορεί επίσης να οφείλεται στην εισπνοή των ακαθαρσιών του κρότωνα.

Στις Μεσογειακές χώρες, η μετάδοση της *R. conorii* (βλ. τα σχήματα των σελίδων 25 και 26) σχετίζεται άμεσα με τον καφέ κρότωνα του σκύλου *Rhipicephalus sanguineus*, και μάλιστα όταν αυτός βρίσκεται στα πρώτα στάδια του βιολογικού του κύκλου (της προνύμφης και νύμφης) (Gilot et al, 1990; Herrero-Herrero et al, 1989). Όπως φαίνεται από τον πίνακα της σελ. 27, η μετάδοση της *R. conorii* σε άλλα σημεία της γης γίνεται με διάφορα είδη κροτώνων (*Hyalomma*, *Amblyomma*, *Haemophysalis*, *I. granulatus*). Ο ξενιστής διαφοροποιείται ανάλογα με το είδος της ρικετίαιας αλλά και την γεωγραφική του προέλευση.

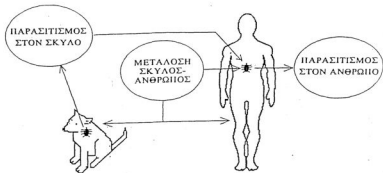
Ο ρόλος του σκύλου ως παρακαταθήκη δεν είναι σημαντικός. Η διάρκεια της ρικετσιαμίας είναι μικρή, ως εκ τούτου η πιθανότητα μόλυνσης του κρότωνα ελαχιστοποιείται. Παρόλα αυτά, σε ενδημικές περιοχές, το ποσοστό των οροθετικών σκύλων αποτελεί άμεσο δείκτη της διασποράς της νόσου στους ανθρώπους.

Η επιδημιολογία των ρικετσιών της ΟΚΠ έχει σχέση με την δραστηριότητα των μολυσμένων κροτώνων και με την γεωγραφική τους κατανομή, η οποία προσδιορίζεται κυρίως από περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως είναι το κλίμα, το υψόμετρο και η χλωρίδα.

Καθίσταται λοιπόν αναγκαία η περιγραφή της ταξινόμησης, του βιολογικού κύκλου και της συμπεριφοράς των κροτώνων.



Κύκλος μετάδοσης του Μεσογειακού Κηλιδοβλατιδώδους Πυρετού



Συνθήκες προσκόλλησης του *Rhipicephalus sanguineus* στον άνθρωπο
 Αναγκαίες συνθήκες μόλυνσης του ανθρώπου από *Rickettsia conorii*



Είδος	Φορέας	Γεωγραφική κατανομή	Βιβλιογραφία
<i>R. australis</i>	<i>Ixodes holocyclus</i> <i>I. tasmani</i> (?)	Αυστραλία	Walker 1989 Stenos 1992
<i>R. conorii</i>	<i>Rhipicephalus sanguineus</i> <i>Hyalomma</i> <i>Amblyomma</i> <i>Haemophysalis</i> <i>I. granulatus</i>	Μεσόγειος, Αφρική Αφρική Αφρική Αφρική, Μαλαισία, Ινδία Μαλαισία	Tringali 1986, Dior 1990, Rehacek 1989 Walker 1989 Beati 1993
<i>R. japonica</i>	Άγνωστο	Ιαπωνία	Beati 1993
<i>R. rickettsii</i>	<i>Dermacentor andersoni</i> <i>D. variabilis</i> <i>D. parvum</i> <i>Rhipicephalus</i> <i>Amblyomma</i>	ΗΠΑ	Beati 1993, Philip 1981 Walker 1989
<i>R. sibirica</i>	<i>D. marginatus</i> <i>D. silvarum</i> <i>D. nuttalli</i> <i>Hyalomma</i> <i>Haemophysalis</i> <i>Rhipicephalus</i>	Ρωσία, Ουκρανία, Λιθουανία πρώην Ε.Σ.Σ.Δ. πρώην Ε.Σ.Σ.Δ., Αρμενία Κίνα	Walker 1989 Rehacek 1989 Beati 1993
<i>R. bellii</i>	<i>D. variabilis</i>	ΗΠΑ	Walker 1989
<i>R. akari</i>	<i>Allodermanyssus sanguineus</i> <i>Liponyssus sanguineus</i>	Ουκρανία ΗΠΑ	Walker 1989 Beati 1993
<i>R. montana</i>	<i>D. andersoni</i> <i>D. variabilis</i>	ΗΠΑ	Bell 1963, Philip 1981, Walker 1989
<i>R. rhipicephali</i>	<i>Rh. sanguineus</i> <i>D. andersoni</i> <i>Rh. lunulatus</i>	Γαλλία, ΗΠΑ Αφρική	Beati 1993, Walker 1989 Philip 1981
<i>R. slovacca</i>	<i>D. marginatus</i>	Τσεχοσλοβακία Γαλλία	Rehacek 1989 Beati 1993
<i>R. helvetica</i>	<i>I. ricinus</i>	Ελβετία	Burgdorfer 1979 Rehacek 1989
<i>R. parkeri</i>	<i>Amblyomma maculatum</i>	ΗΠΑ	Walker 1989

Κρότωναες

Ταξινόμηση

Οι κρότωναες ανήκουν στα Αρθρόποδα, κλάση των Αραχνοειδών (Arachnida), ομάδα των Ακάρεων, τάξη *Metastigmata* ή Κροτόνων. Ταξινομούνται σε 3 οικογένειες: τα *Ixodidae* (σκληροί), τα *Argasidae* (μαλακοί) και τα *Nuttalliellidae*. Οι ρικέτωσις μεταδίδονται μόνο από τους κρότωναες της οικογένειας των *Ixodidae*, οι οποίοι χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη άκαμπτου χητινώδη θυρεού (scutum). Έχουν αναφερθεί παγκοσμίως περίπου 800 είδη *Ixodidae*, από τα οποία 10% εμπλέκονται στην μετάδοση διαφόρων ασθευνιών του ανθρώπου και άλλων σπονδυλωτών (εξανθηματικοί πυρετοί, μπορρελίωση, τουλαραμία, μπαμπεσίωση, ιογενείς μηνιγγο-εγκεφαλίτιδες) (Tissot-Duroni et al., 1993).

Τα σημαντικότερα κριτήρια διαφοροποίησης των *Ixodidae* είναι η μορφολογία της προκτικής ρωγμής, η παρουσία ή απουσία οφθαλμών, η μορφολογία της ψευδοκεφαλής και ιδιαίτερα της προβοςκίδας, η ανάπτυξη των ισχίων και η διακόσμηση του θυρεού (βλ. σχήματα επόμενης σελ.).

Τα κυριότερα γένη των *Ixodidae* (χάρτης σελ. 30), που εμπλέκονται στη μετάδοση των ρικετωσίων είναι τα ακόλουθα:

- Το γένος *Ixodes* που περιλαμβάνει 225 είδη με κοσμοπολίτικη εξάπλωση και συναντάται σε όλα τα σπονδυλωτά.

- Το γένος *Amblyomma* που βρίσκεται στις τροπικές ζώνες και παρασιτεί τα θηλαστικά και τα ερπετά.

- Το γένος *Hyalomma* που περιλαμβάνει 26 είδη, βρίσκεται στις τροπικές ζώνες του παλιού κόσμου (Ευρώπη και Αφρική) και παρασιτεί τα οπλοφόρα.

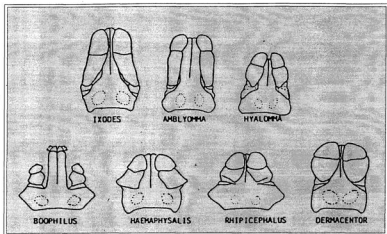
- Το γένος *Rhipicephalus* που περιλαμβάνει 65 είδη, βρίσκεται στην Ευρώπη και Αφρική και παρασιτεί τα θηλαστικά.

- Το γένος *Boophilus* που περιλαμβάνει 5 είδη, συναντάται στις θερμές περιοχές του κόσμου και παρασιτεί τα οπλοφόρα. Το γένος αυτό είναι κύριος φορέας του γένους *Babesia*.

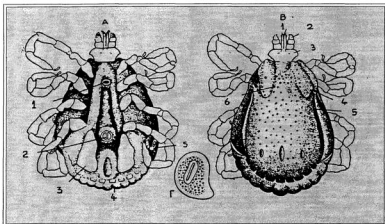
- Το γένος *Dermacentor* που περιλαμβάνει 26 είδη, υπάρχει στην Ευρασία, την Β. Αφρική, την Βόρεια και Κεντρική Αμερική και παρασιτεί τα οπλοφόρα.

- Το γένος *Haemaphysalis* που περιλαμβάνει 150 είδη με κοσμοπολίτικη εξάπλωση και παρασιτεί τα θηλαστικά και τα πτηνά.

- Το γένος *Aroonoma* που περιλαμβάνει 21 είδη και βρίσκεται στα ερπετά της τροπικής ζώνης.



Σχήμα. Γενική σχηματική μορφολογία κροτώνων του γένους Ixodidae

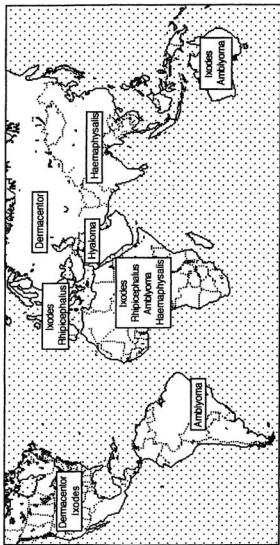


Κρότωνας *Rhipicephalus sanguineus*.

A. Κοιλιακή επιράνεια. 1 γεννητικός πόρος, 2 πρωκός, 3 παραπρωκτικό πέταλο, 4 δαντελωτή περιφέρεια, 5 αναπνευστικό στήγμα.

B. Ραχιαία επιράνεια. 1 ιυπόστομα, 2 προσοκτριδές, 3 βόση ψευδοκεφαλής, 4 οφθαλμός, 5 πλάγια αυλάκια.

Γ. Αναπνευστικό στήγμα.



Σχήμα. Γεωγραφική κατανομή των σκληρότερον αναγεννητών των ζουράνων

Κύκλος ανάπτυξης

Υπάρχουν τέσσερα στάδια στον βιολογικό κύκλο του κρότωνα: αυγό, προνύμφη, νύμφη και ενήλικο. Η μετάβαση από το ένα στάδιο στο άλλο, εκτός του πρώτου σταδίου (αυγό) απαιτεί γέυμα αίματος. Το τελευταίο επιτυγχάνεται με την εισαγωγή της ψευδοκεφαλής του στο δέρμα του ξενιστή, διαδικασία που συνήθως δεν προκαλεί ενόχληση.

Αυγά

Το θηλυκό εναποθέτει τα αυγά σε καταφύγιο του εδάφους (σχισημό εδάφους, υπόγεια φωλιά ζώου κλπ). Η επώαση διαρκεί 20 έως 30 ημέρες ανάλογα με το είδος του κρότωνα, την θερμοκρασία και την υγρασία. Στην εύκρατη ζώνη, η επώαση αναστέλλεται τον χειμώνα.

Προνύμφη

Η εκκόλαση γίνεται 2 έως 4 εβδομάδες μετά την ωοτοκία. Οι μετακινήσεις της είναι μικρές. Το αιματούχο γέυμα διαρκεί 3 με 5 ημ. Η συνολική ποσότητα του γεύματος είναι 100 έως 200 φορές μεγαλύτερη από το βάρος της νεαρής προνύμφης. Όταν τελειώσει το γέυμα, η προνύμφη πέφτει στο έδαφος, όπου ψάχνει να βρει καταφύγιο. Μετά 2-8 εβδομάδες κάνει την έκδυση και μεταμορφώνεται σε νύμφη.

Νύμφη

Η νύμφη επιδεικνύει την ίδια συμπεριφορά με την προνύμφη, τις ίδιες μετακινήσεις και την ίδια αναζήτηση για ξενιστή. Το γέυμα διαρκεί 3 έως 5 ημέρες. Οι νύμφες βαραίνουν κατά 20 έως 80 φορές. Η έκδυση πραγματοποιείται στο έδαφος, αρκετούς μήνες μετά το γέυμα.

Ενήλικας

Το ζευγάρι γίνεται στο έδαφος ή πάνω στον ξενιστή, ανάλογα με το είδος. Το γέυμα του θηλυκού διαρκεί 5-10 ημέρες, αρχίζει πριν γονιμοποιηθεί και ολοκληρώνεται μετά την γονιμοποίηση του. Ακολούθως, αποχωρίζεται από τον ξενιστή και πέφτει στο έδαφος. Η ωοτοκία αρχίζει 3-4 εβδομάδες αργότερα και διαρκεί 10-30 ημέρες. Ένα θηλυκό γεννά 1000-20000 αυγά, ανάλογα με το είδος και το αίμα που κατανάλωσε. Η γέννα ολοκληρώνεται και το θηλυκό πεθαίνει. Τα αρσενικά τρέφονται πάρα πολύ λίγο.

Ξενιστής

Οι κρότωνες παραμένουν ακίνητοι στην βλάστηση σε αναμονή παρασιτικού ξενιστή. Η ευκολία εύρεσης του ξενιστή εξαρτάται από το είδος, το μέγεθος του βιοτόπου και ειδικά τον αριθμό των θηλαστικών. Η επιλογή του ξενιστή εξαρτάται από το είδος και την οικολογία του κρότωνα (κρότωνες που ζούν σε ανοιχτό βιότοπο έρχονται σε επαφή με πιο μεγάλη ποικιλία ξενιστών).

Γεωγραφική κατανομή

Οι ρικέτσιες της ομάδας των κηλιδωδών πυρετών μπορούν να διαχωρισθούν σε παθογόνες ή μη ανάλογα με το αν προκαλούν ή όχι λοίμωξη στον άνθρωπο (χάρτης επόμενης σελίδας).

Παθογόνες ρικέτσιες

Παθογόνες ρικέτσιες για τον άνθρωπο έχουν αναφερθεί τα ακόλουθα 6 είδη: *R. conorii*, *R. sibirica*, *R. akari*, *R. rickettsii*, *R. australis*, *R. japonica*.

- Η *R. conorii* είναι το αίτιο των ευρωπαϊκών και αφρικανικών κροτανογενών ρικετσιώσεων. Περιλαμβάνει τον ΜΚΠ, τον πυρετό της Κένυας (Kenyan tick typhus), της Ινδίας (Indian tick typhus) και της Ν. Αφρικής - South African tick typhus - ή "*R. africa*" (Kelly et al., 1992). Η *R. conorii* έχει βρεθεί στην δυτική Ευρώπη (De Giulluly et al., 1984; Lambert et al., 1984), στην κεντρική Ευρώπη (Szaszewski et al., 1984; Rehacek & Tarasevich 1988), στην βόρεια (Conor & Bruch 1910), κεντρική και νότιο Αφρική (Walker & Gear 1985; Kelly et al., 1991), στην Ινδία (Stephen et al., 1980), στο Πακιστάν (Robertson & Wissemann 1973), στην Κίνα (Fan et al., 1987) και σε όλη την Νοτιοανατολική Ασία (Rehacek & Tarasevich 1988). Στελέχη της *R. conorii* είναι υπεύθυνα για τον εξανθηματικό πυρετό που περιγράφηκε στο Ισραήλ (Yagupsky et al., 1990; Manor et al., 1992). Στην ομάδα των ρικετσιώσεων που οφείλονται στην *R. conorii* αναφέρεται και το αίτιο του πυρετού του Astrakhan, στα παράλια της Κασπίας (Drancourt et al., 1992; Tarasevich et al., 1991). Ο αιτιολογικός όμως παράγοντας της ρικετσιώσης αυτής, όπως φαίνεται από πρόσφατες μελέτες, δεν είναι η *R. conorii* αλλά ένα νέο είδος (Ereemeeva et al., 1993).

- Η *R. sibirica*, που είναι ο αιτιολογικός παράγοντας του τύπου της Σιβηρίας, συναντάται στην πρόην ΕΕΣΣΔ, Μογγολία, Κίνα (Fan et al., 1987; Wang & Walker 1987) καθώς επίσης και στην Τσεχία και Σλοβακία (Rehacek et al., 1975).

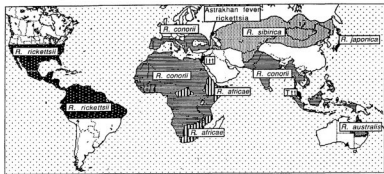
- Η *R. akari*, που είναι παθογόνο αίτιο της ευλογιάς από ρικέτσιες (rickettsialprox), έχει παγκόσμια εξάπλωση. Πρόσφατα απομονώθηκε από ασθενή στην Αδριατική Ακτή της Κροατίας (Novakovic et al., 1992b).

- Η *R. rickettsii*, αίτιο του ΚΠΒΟ, βρίσκεται σε όλη την αμερικανική ήπειρο (Wilfert et al., 1984).

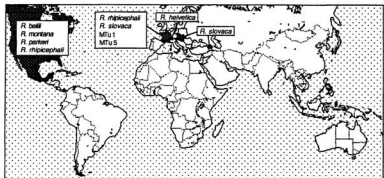
- Η *R. australis* είναι το αίτιο του πυρετού της Queensland, περιοχή της ΒΑ Αυστραλίας (Sexton et al., 1990; Sexton et al., 1991). Πρόσφατα απομονώθηκε από άνθρωπο στα νησιά Flinders που βρίσκονται στη Ν. Αυστραλία. Πιθανά το νέο στέλεχος να διαφοροποιείται ορολογικά και γενετικά από την *R. australis* (Stenos et al., 1992).

- Η *R. japonica* είναι υπεύθυνη για τον ανατολικό κηλιδωδή πυρετό. Περιγράφηκε στα τρία μεγάλα νησιά του ιαπωνικού αρχιπελάγους (Okada et al., 1990; Uchida et al., 1989; Uchida et al., 1992). Ο ξενιστής είναι άγνωστος.

Σχήμα. Γεωγραφική κατανομή των παθογόνων ρικετσιών



Σχήμα. Γεωγραφική κατανομή των μη παθογόνων ρικετσιών



Μη παθογόνες ρικέτσιες

Τα υπόλοιπα είδη ρικετσιών της ΟΚΠ δεν έχουν απομονωθεί μέχρι σήμερα από παθολογικό υλικό ανθρώπου γιατί θεωρούνται μη παθογόνα. Τα είδη αυτά είναι: *R. bellii*, *R. montana*, *R. parkeri*, *R. rhipicephali*, *R. helvetica* και *R. slovacica* (χάρτης προηγούμενης σελ.). Η μη ανεύρεσή τους σε κλινικές καταστάσεις που προσιδιάζουν με την συμπτωματολογία των ρικετσιώσεων, δεν αποκλείει την περίπτωση οι ρικέτσιες αυτές να είναι η αιτία ήπιας ή αμβλυχράς συμπτωματολογίας. Γι'αυτό θεωρούμε ότι το θέμα παραμένει ανοικτό και ότι η διεκρίνησή του καθίσταται ευχερέστερη με το PCR και τις τεχνικές ταχείας καλλιέργειας. Με την χρησιμοποίηση των τεχνικών αυτών στην ανίχνευση και απομόνωση ρικετσιών από τους κρότωνες είναι δυνατόν να προσδιορισθούν σε ένα πρώτο χρόνο οι περιοχές κυκλοφορίας των λεγόμενων "μη παθογόνων" ρικετσιών και στην συνέχεια η συστηματική αναζήτησή τους σε κατοίκους που παρουσιάζουν πυρετό.

Ρικέτσιες της ΟΚΠ στην Μεσογειακή λεκάνη

Ελλάδα

Ο ΜΚΠ είναι γνωστός στην Ελλάδα από το 1929, όταν οι κκ Παΐδαρος, Καραγιαννόπουλος και Βαλσαμάκη παρατήρησαν δύο ανάλογα περιστατικά στον Βόλο (Petzetakis 1931). Οι Pateraki et al. βρήκαν αντισώματα έναντι της *R. conorii* στο 17% των εργατών σφαγείων, στο 14% άλλων εργατών, στο 42% των σφαγέων, στο 15% των βυρσοδεψών, στο 41% των λιμενεργατών και στο 17,5% των δημοσίων υπαλλήλων. Αξίζει να σημειωθεί ότι το 42% των θετικών ορών περιείχαν αντισώματα ταυτόχρονα των *R. conorii* και *R. typhi* το 16% των *R. conorii* και το 10% των *R. typhi* και *C. burnetii* ασθενείς με καρδιαγγειακά προβλήματα, πεπτικά έλκη και διαβήτη είχαν αντίστοιχα 66, 22 και 71% αντισώματα έναντι της *R. conorii*. Η συχνότητα στα βοοειδή ήταν 50%, στις αίγες 65% και στα πρόβατα 69% (Pateraki et al., 1970). Η Δούκα-Σεγδίτσα το 1972 ανίχνευσε με την μικροσυγκόλληση κατά Giroud αντισώματα έναντι της *R. conorii* στο 16,7% του εξεταζόμενου υγείου πληθυσμού (Douka-Segditsa et al., 1972). Αργότερα, οι Ψιστάκης και συν ανέφεραν το 4,9% ως συχνότητα της *R. conorii* στην Κρήτη (Psistakis et al., 1983).

Βουλγαρία

Το νότιο τμήμα της χώρας και οι ακτές της Μαύρης Θάλασσας έχουν χαρακτηριστεί ως ενδημικές. Από το 1948 μέχρι το 1956, 188 περιστατικά είχαν αναφερθεί σε 82 πόλεις και χωριά. Η επίπτωση της ασθένειας συσχετίζεται με την δραστηριότητα του *R. sanguineus*. Ο σκύλος είναι ο σημαντικότερος ξενιστής ρικετσιών στην χώρα. Πρόσφατα όμως μόνο σποραδικά περιστατικά έχουν καταγραφεί (Tarasevich & Kazar 1988).

Γαλλία

Μια φυσική εστία θεωρείται ότι υπάρχει στην Ν. Γαλλία (Bourgeade et al., 1979; Raoult et al., 1983). Αντισώματα έναντι της *R. conorii* έχουν ανιχνευθεί στους ανθρώπους και τα ζώα (αιγοπρόβατα, βοοειδή) στις ΝΑ περιοχές της πάνω από 600 μ υψόμετρο (Boucaud-Maitre et al., 1988). Στην Ν. Γαλλία 30% των σκύλων έχουν αντισώματα έναντι της *R. conorii*. Έχει υποστηριχθεί ότι η *R. conorii* κυκλοφορεί στην Γαλλία όχι μόνο ανάμεσα στον σκύλο και τον κρότωνα *R. sanguineus*, αλλά και δια μέσου άλλων ειδών κροτώνων

όπως *Ixodes ricinus*, *I. hexagonus*, *Dermacentor marginatus*, *D. reticulatus* Επειδή έχουν ανιχνευθεί αντισώματα έναντι της *R. conorii* και σε σκαντζόχοιρους πιθανολογείται πως ο κρότωνας *I. hexagonus* και ο ψύλλος *Archaeopsylla erinacei* συμμετέχουν στον επιδημιολογικό κύκλο της *R. conorii* (Giroud et al., 1959). Το 1952, άμεσα μετά από την προσβολή όλων σχεδόν των άγριων κουνελιών από μυξομάτωση παρατηρήθηκε αύξηση του κηλιδώδους πυρετού. Θεωρήθηκε πως ο ψύλλος του κουνελιού *Spiropsyllus cuniculi* είναι φορέας της *R. conorii* (LeGac 1974).

Στους ανθρώπους τα περιστατικά είναι γνωστά από τις αρχές του αιώνα (Olmer et al., 1925). Το 1985 οι Raoult et al ανέφεραν συχνότητα της τάξης του 12% στην Ν. Κορσική με οριακό τίτλο 1/32, 4,8% με 1/64 και 2,5% με 1/128 χρησιμοποιώντας ΑΦ (Raoult, Nicolas et al., 1985). Η συχνότητα αποτιμήθηκε στο 18% στη Ν. Γαλλία (Raoult et al., 1987).

Ιταλία

Ο ΜΚΠ είναι γνωστός στην Ιταλία από το 1920. Τα τελευταία χρόνια η ασθένεια, που είναι ενδημική σε ορισμένες περιοχές, παρουσίασε μια αύξηση (Mansueto et al., 1986). Από το 1972 μέχρι το 1977 αναφέρθηκαν 389 περιστατικά, ενώ το 1979 863 περιστατικά. Αρκετές επιδημίες έχουν αναφερθεί στην περιοχή της Ρώμης, στην Brescia, Καλαβρία, Σικελία, στην Σαρδηνία, το Lazio και την Αιγυρία. Ορολογικές μελέτες σε ασυμπτωματικό πληθυσμό της Σικελίας αποκάλυψαν πλατιά εξάπλωση του ΜΚΠ (Mansueto et al., 1984). Συνολικά, 10,6% των ορών βρέθηκαν θετικοί, με υψηλά ποσοστά στην Mussomeli (20%) και Ustica (18,4%) (Mansueto et al., 1984). Η επίπτωση των περιστατικών σχετίστηκε άμεσα με την αγροτική ζωή και την ύπαρξη σκύλων (Tringali et al., 1986). Η μόλυνση πιθανώς προέρχεται από τον κρότωνα του σκύλου *Rh. sanguineus* χωρίς να αποκλείονται και οι *Rh. bursa*, *Hyaloma marginatus*, *H. lusitanicum*, *Haemophysalis punctata* και *I. ricinus*.

Πορτογαλία

Η Πορτογαλία είναι ενδημική χώρα για την *R. conorii*. Από το 1972 μέχρι το 1977 αναφέρθηκαν 400 περιστατικά. Μερικά από αυτά παρουσίασαν σοβαρή κλινική εικόνα, υπόταση, οίδημα, αγγειίτιδα κλπ. Η Bacellar ανέφερε 7,6% ως μέση συχνότητα (4,8-13,7), χωρίς όμως να προσδιορίζει τα χρησιμοποιούμενα αντιδραστήρια και τον ελάχιστο θετικό τίτλο (Bacellar et al., 1991).

Ρουμανία

Η πρώτη επιδημία (34 περιστατικά) αναφέρθηκε το 1931 στην Κωνσταντία, ακολουθούμενη από αυτή του Βουκουρεστίου το 1948-1949. Αργότερα ο Cracea με την βοήθεια της σύνδεσης συμπληρώματος τεκμηρίωσε και ορολογικά 11 περιστατικά στην περιοχή Κωνσταντία και Βουκουρεστίου. Ο σκύλος και ο κρότωνας του *Rh. sanguineus* είναι μάλλον υπεύθυνοι για την εξάπλωση της νόσου (Cracea et al., 1987).

Ισπανία

Ορισμένες περιοχές τη Ισπανίας έχουν υψηλά ποσοστά αντισωμάτων έναντι της *R. conorii* όπως η Σεβίλλη, Badajoz, Huelva, Cadiz και Μαδρίτη. Αυξημένη επίπτωση (Mansueto et al., 1986) παρατηρήθηκε σε αστικές περιοχές, οφειλόμενη πιθανά στην

αύξηση κατοικίδιων ζώων (Segura-Porta & Font-Creus 1982). Η υψηλότερη συχνότητα (73.5%) βρέθηκε από τους Ruiz στην Σαλαμάνκα, με ελάχιστο θετικό τίτλο μεγαλύτερο ή ίσο 1/40 (Ruiz et al, 1990).

Το 58.6% των σκύλων βρέθηκε με αντισώματα έναντι της *R. conorii* στην περιοχή της κεντρικής Ισπανίας (Herrero et al, 1992), και 93% στην Σαλαμάνκα (Herrero et al, 1989).

Τουρκία

Ο ΚΠ υφίσταται στην χώρα από το 1958 αλλά τα δεδομένα είναι λίγα.

Πρώην Γιουγκοσλαβία

Η ύπαρξη του ΜΚΠ αναφέρθηκε το 1939 στην Δαλματία. Το 1981, ο Punda περιέγραψε 8 περιστατικά (Punda et al, 1984), ενώ στην (δία περιοχή ο Dzelalija ανίχνευσε αντισώματα έναντι της *R. conorii* το 40% του δείγματος με την βοήθεια ΑΦ και ορισκό τίτλο 1/10 (Dzelalija et al, 1991). Τελευταία απομονώθηκε και *R. akari* από ασθενή στην Κροατία (Novakovic et al, 1992b).

Ισραήλ

Οι ρικέτσιες της ΟΚΠ υπάρχουν στο Ισραήλ, εδώ και τουλάχιστον 40 χρόνια. Κατά την διάρκεια αυτή ο ΚΠ έχει εμφανισθεί σε διάφορες περιοχές. Τα πρώτα περιστατικά περιγράφηκαν από τον Valero το 1949. Ρικέτσιες έχουν απομονωθεί από αίμα ανθρώπου και τον κρότωνα *R. sanguineus* (Goldwasser et al, 1974).

Από τα περιστατικά μιας επιδημίας στην περιοχή Sharon, διαπιστώθηκε ασθένεια που χαρακτηρίστηκε από πυρετό, ρίγη, κεφαλαλγία και κηλιδωβλατιδώδες εξάνθημα το οποίο άρχιζε από τις παλάμες και το πέλμα και εξαπλωνόταν με κεντρική φορά (Gutman et al, 1973). Αύξηση των περιστατικών σημειώθηκε μέχρι το 1977 (Mansueto et al, 1986).

Η νόσος, που προκαλείται από υπότυπο της *R. conorii* (Israeli tick typhus - "*R. israeli*") (Manor et al, 1992), έχει διαφορετική συμπτωματολογία από αυτή του ΜΚΠ καθώς σπάνια εμφανίζει εσχάρα "tache noire" στην περιοχή του νήγματος από τον κρότωνα (Gross & Goldwasser 1984; Shaked et al, 1988). Οι περισσότεροι ασθενείς δεν ανέφεραν νήγμα κρότωνα. Το 1981 στην περιοχή της ερήμου Negev περιγράφηκαν πάνω από 50 περιστατικά με ΚΠ σε γενικό πληθυσμό 250.000 ανθρώπων, ενώ τα τελευταία 3 χρόνια τα συνολικά περιστατικά δεν υπερέβαιναν τα 42 (Gross & Goldwasser 1984). Ορολογική μελέτη (ΑΦ, ολικές ανοσοσφαιρίνες, cut off 1/40) κατοίκων της περιοχής, όπως βεδουίνους, εβραίους της Βηθεσά, αγρότες αλλά και αστούς, αποκάλυψε 18.3% των συμμετεζόντων με αντισώματα έναντι των ρικετσιών της ΟΚΠ. Ειδικότερα για τα παιδιά το ποσοστό ήταν 3.8% (Yagursky et al, 1990). Οι Βεδουίνους είχαν πολύ υψηλότερα ποσοστά σε αντίθεση με τους Ιουδαίους της Βηθεσά. Το γεγονός αυτό εξηγείται από τον τρόπο ζωής των Βεδουίνων (επαφή με οικιακά ζώα, μικρά τρακτικά και κρότωνες (Gross et al, 1983).

Αίγυπτος

Ο Βοτρός χρησιμοποιώντας ΑΦ ανίχνευσε συνολικές ανοσοσφαιρίνες στο 19% του εξεταζόμενου πληθυσμού θεωρώντας ως ελάχιστο θετικό τίτλο το 1/40 (Botros et al, 1989).

Με την ίδια μέθοδο ο Soliman ανίχνευσε αντισώματα έναντι της *R. conorii* στο 4% των ποντικών *Rattus rattus* που συλλέχθηκαν στο Ασσοούν (Soliman et al., 1989).

Τυνησία

Στην χώρα όπου πρωτοανακαλύφθηκε ο ΜΚΠ (Conor & Hayat 1910), πρόσφατες μελέτες με ΑΦ έδειξαν ότι το 20% του γενικού πληθυσμού έχει αντισώματα έναντι της *R. conorii* με cut off 1/20, ενώ 12.7% με 1/40 (Κεννου 1984).

Εποχιακή κατανομή

Ο ΜΚΠ είναι εποχιακή ασθένεια (Raoult & Weiller et al., 1986), καθώς εξαρτάται από την δραστηριότητα των κροτώνων. Το δε καλοκαίρι μπορεί να χαρακτηριστεί ως περίοδος έξαρσης (Gross & Goldwasser 1984). Το 90% των περιστατικών εμφανίζονται από τον Μάιο μέχρι τον Σεπτέμβριο και 1% από Νοέμβριο μέχρι Μάρτη (Raoult et al., 1983; Raoult & Lereu et al., 1985), ενώ 99% των περιστατικών εμφανίζονται στο διάστημα Μαρτίου-Οκτωβρίου (Raoult et al., 1983). Τα περισσότερα περιστατικά εμφανίζονται τον Αύγουστο (Raoult 1988; Segura et al., 1989; Gross & Goldwasser 1984). Οι κλιματολογικές συνθήκες μπορούν να διαφοροποιήσουν την περίοδο έξαρσης της ασθένειας (πιο νωρίς ή πιο αργά). Η επίπτωση συσχετίζεται θετικά με την μέση θερμοκρασία της άνοιξης και του καλοκαιριού του προηγούμενου έτους, ενώ αρνητικά με τον αριθμό των παγερών ημερών (Raoult et al., 1992; Esprejo et al., 1986).

Ηλικία και φύλο

Οι άρρενες προσβάλλονται πιο συχνά από την νόσο (Raoult & Weiller et al., 1986; Font-Creus et al., 1985; Sexton et al., 1992). Όλες οι ηλικίες παρουσιάζουν το ίδιο ποσοστό νόσησης (Raoult 1988). Τα παιδιά συχνά έχουν αντισώματα έναντι της *R. conorii* αλλά σπάνια εισάγονται στο νοσοκομείο (Raoult & Weiller et al., 1986).

ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ

Η κλινική εικόνα των ρικετσιώσεων της ΟΚΠ ποικίλει. Τρεις έως δεκαέξι ημέρες μετά το δήγμα του κρότωνα εμφανίζεται συνήθως μία ψευδογριππώδης συνδρομή (**προεξανθηματική φάση**). Η διάρκεια της προεξανθηματικής φάσης ποικίλει από 1-7 ημ και η διάγνωση του ΜΚΠ συνήθως διαφεύγει, εκτός εάν εντοπισθεί η χαρακτηριστική εσχάρα ενοφθαλμισμού ή "**l'ache noire**" που δημιουργείται στο σημείο του δήγματος (Raoult & Gallais et al., 1983; Font-Creus et al., 1985). Η αποκάλυψη της αποτελεί σημαντικό διαγνωστικό στοιχείο (50-75% των περιστατικών). Στο σημείο του δήγματος εμφανίζεται διαδοχικός ερυθρότητα, βλατίδα, εφελκίδα και εσχάρα. Η συνήθης εντόπιση της "**l'ache noire**" είναι η βουβωνική χώρα, η μασχάλη και η κεφαλή, ενώ στα παιδιά επικρατούσες περιοχές είναι το τριχωτό της κεφαλής και ο λαιμός. Το τσίμπημα του κρότωνα είναι ανώδυνο στους ενήλικες.

Ο πυρετός εμφανίζεται μεταξύ της 5ης και 10ης ημέρας και συνοδεύεται από γενικά συμπτώματα όπως κεφαλαλγία, ρίγη, αρθραλγία, μυαλγία, βραδυκαρδία και γενική αδυναμία (Segura et al., 1989; Morovic et al., 1991).

Δύο έως τέσσερις ημέρες μετά την έναρξη του πυρετού εμφανίζεται κηλιδοβλατιδώδες εξάνθημα (**εξανθηματική φάση**). Εντοπίζεται αρχικά στα άκρα και ακολουθεί κεντρομόλος επέκταση. Είναι χαρακτηριστική η εμφάνισή του στις παλάμες και τα πέλματα. Έχουν περιγραφεί μορφές της νόσου χωρίς εξάνθημα, στις οποίες ο αιτιολογικός παράγοντας απομονώθηκε με αιμοκαλλιέργεια (Brouqui et al., 1992). Η απουσία εξανθήματος μπορεί να οφείλεται στην άμεση θραπεία (Esprejo et al., 1992; Sexton & Corey 1992). Το δερματικό εξάνθημα είναι δυνατόν να εξελιχθεί από κηλιδοβλατιδώδες σε αιμορραγικό, που αποτελεί κακό προγνωστικό σημείο.

Η νόσος διαδράμει συνήθως ήπια, με προσεζάρχοντα τον πυρετό και το γενικευμένο εξάνθημα. Στις βαριές μορφές της νόσου (Raoult & Gallais et al., 1983; Raoult & Zuchelli et al., 1986)(6%) εκτός από το αιμορραγικό εξάνθημα παρατηρούνται και προσβολές άλλων συστημάτων όπως το κεντρικό νευρικό σύστημα (απάλεια συνείδησης, κόμα, σπασμούς)(Bonduelle & Lörmeau 1971; Gear et al., 1990), τους πνεύμονες (adult respiratory distress syndrome, ARDS) (Giroud 1953), την καρδιά (μυοκαρδίτιδα, περικαρδίτιδα (Drancourt & Brouqui et al., 1991), τους οφθαλμούς (Bonnet et al., 1969; Bierent 1966; Bierent 1971; Giroud et al., 1962), το ήπαρ (ικτερο)(Guardia et al., 1974; Moncharmont et al., 1981; Font-Creus et al., 1985), και τα νεφρά. Η ενεργοποίηση του μηχανισμού πήξης οδηγεί μερικές φορές σε διάχυτη ενδογγειακή πήξη (Vicente et al., 1986). Η νόσος εμφανίζεται σε βαριά μορφή συχνότερα σε ομάδες πληθυσμού μεγάλης ηλικίας, άρρηνες, μαύρης φυλής, με έλλειψη G-6-PD και χρόνιους αλκοολικούς (Walker 1990; Segura et al., 1989; Sexton & Corey 1992; Piras et al., 1983; Whelton et al., 1968; Raoult & Zuchelli et al., 1986).

Χωρίς αντιβίωση η ίαση επέρχεται σε 10-14 ημ, ενώ στις κακοήθεις μορφές η νόσος διαρκεί περισσότερες ημέρες. Η χορήγηση κατάλληλου αντιβιοτικού μειώνει την εξέλιξη της νόσου σε 2-3ημ.

Το ποσοστό θνησιμότητας του ΜΚΠ είναι χαμηλό (2.5%) (Raoult & Weiller et al., 1986). Στις κακοήθεις όμως μορφές η θνησιμότητα κυμαίνεται ανάμεσα στο 30-50% (Raoult 1991). Ο Κηλιδώδης Πυρετός Βραχωδών Ορέων εμφανίζει το υψηλότερο ποσοστό (7%) (Hattwick et al., 1976).

Η διαφορική διάγνωση της νόσου γίνεται με τις άλλες εμπύρετες εξανθηματικές νόσους: ιλαρά, ερυθρά, λοιμώδης μονοπύρηνωση, τυφοειδής πυρετός, μηνιγγοκοκκική σηψαιμία, αρμπουώσεις, δευτεροπαθής σύφιλη και λεπτοσπείρωση.

ΑΝΟΣΟΒΙΟΛΟΓΙΑ

Κυτταρική Ανοσία

Η ανοσία των ρικετσιών είναι κατά κύριο λόγο κυτταρική. Παρόλο που ο ανοσολογικός μηχανισμός όλων των ειδών της ΟΚΠ δεν έχει επαρκώς μελετηθεί, η σημασία της κυτταρικής ανοσίας στην προφύλαξη έχει επιστημανθεί από ορισμένους ερευνητές. Ποντίκια με συγγενή έλλειψη (nu/nu) T-λεμφοκυττάρων όταν μολυνθούν με *R. conorii* και *R. akari* πεθαίνουν από καλπάζουσα λοίμωξη (Kenyon & Pedersen 1980). Η αντίσταση στη λοίμωξη με *R. conorii* μεταβιβάζεται παθητικά σε άνοσα ποντίκια με T λεμφοκύτταρα (Kokorin et al., 1982). Σε ινδικά χοιρίδια οι σχετικά λιγότερο παθογόνες *R. conorii* και *R. montana* επάγουν προστατευτική ανοσία έναντι της περισσότερο παθογόνου για τα ζώα αυτά *R. rickettsii*. Αντίθετα, σε ποντίκια (C3H/HeJ) που είναι εξαιρετικά ευαίσθητα σε κεραυνόβολες λοιώξεις με *R. conorii* και λιγότερο με *R. rickettsii*, η προστατευτική ανοσία έναντι των ρικετσιών της ΟΚΠ επάγεται μετά από λοίμωξη με *R. rickettsii* (Eisemann et al., 1984). Οι μελέτες αυτές δείχνουν ότι σε πειραματόζωα που ανάρρωσαν από λοίμωξη με είδη της ΟΚΠ εγκαθίσταται ανοσία, που τα προστατεύει όχι μόνο από μεταγενέστερη λοίμωξη με το ομόλογο στέλεχος, αλλά και από λοίμωξη από άλλα είδη της ΟΚΠ. In vitro λειτουργικές δοκιμασίες των λεμφοκυττάρων έδειξαν ότι η λεμφοβλαστική μετατροπή επιτυγχάνεται μετά από διεγερση με πρωτεϊνικά αντιγόνα ρικετσιών της ΟΤ και ΟΚΠ. Οι Jergels et al έδειξαν ότι λεμφοκύτταρα από ανοσοποιημένα με *R. conorii* ποντίκια αναγνωρίζουν την *R. rickettsii*, την *R. sibirica*, *R. australis* και την *R. conorii*, όχι όμως την *R. akari* (Jergels et al., 1986). Όπως ήδη έχει αναφερθεί η τελευταία ρικέτσια έχει ένα λιγότερο αντιγόνο (Anacker et al., 1987). Οι McDonald et al (1987) επίσης έδειξαν ότι η πρωτεΐνη 190-kDa που εκφράζεται από ανασυνδυασμένο DNA, προστατεύει τα πειραματόζωα από λοίμωξη *R. rickettsii*. Ο προσδιορισμός των πρωτεϊνών, που επάγουν την κυτταρική ανοσία, αλλά και ακριβέστερα ο προσδιορισμός των αλληλουχιών των αμινοξέων, που αναγνωρίζονται από τα λεμφοκύτταρα T, επιβάλλουν την ανάπτυξη κλώνων λεμφοκυττάρων T και ενδεχομένως συνθετικών πεπτιδίων όπως στην περίπτωση της ΟΤ (Churilla et al., 1991).

Διεγερμένα με λεμφοκίνες κυτταροτοξικά λεμφοκύτταρα T προκαλούν λύση των κυττάρων που έχουν μολυνθεί με ρικέτσες. Διεγερμένα μακροφάγα αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των ρικετσιών σε μολυσμένα κύτταρα. Η αναστολή αυτή οφείλεται στην έκκριση από τα μακροφάγα TNF και IL-1 (Manor & Saron 1990). Οι λεμφοκίνες που διεγείρουν τα λεμφοκύτταρα έναντι των ρικετσιών είναι η INF- γ και η IL-2 (Turco & Winkler 1983; Turco & Winkler 1991; Wiseman & Waddell 1983).

Χυμική ανοσία

Τα αντισώματα παίζουν ρόλο στην είσοδο των ρικετσιών στα μακροφάγα. Ο Keysary et al έδειξαν ότι επεξεργασμένες με ανοσοορό ρικέτσες μπαίνουν στα μακροφάγα, αφού προηγουμένα συνδεθούν με τους Fc υποδοχείς (Keysary et al., 1989). Η συμβολή όμως των αντισωμάτων στην εξάλειψη τόσο των ενδοκυττάρων όσο και των εξωκυττάρων ρικετσιών δεν έχει διασαφηνισθεί (Keysary et al., 1989; Williams et al., 1986).

Η κινητική των αντισωμάτων, αν και έχει προσδιοριστεί με ποικίλες τεχνικές (ΣΣ, ΑΦ, έμμεση αμοσυγκόλληση, μικροσυγκόλληση, Western blot) τόσο σε πειραματόζωα όσο και σε αρρώστους που έπασχαν από ΜΚΠ, εμφανίζει πάντα την ίδια περίπου καμπύλη. Στα πειραματόζωα η πορεία εμφάνισης των αντισωμάτων έχει προσδιοριστεί με τη

μικροαίμοσυγκόλληση (ΜΑ) και τη σύνδεση συμπληρώματος (ΣΣ)(Williams et al., 1986; Kocianova et al., 1991). Τα αντισώματα ανιχνεύονται 3 ημ μετά την πειραματική λοίμωξη και ο τίτλος αυξάνεται μεταξύ 7ης και 32ης ημ (Williams et al., 1986).

Στον άνθρωπο η κινητική των αντισωμάτων έχει προσδιοριστεί με τις τεχνικές της ΜΑ και του ΑΦ, η δε πορεία εμφάνισης των αντισωμάτων έναντι του ΛΠΣ και των πρωτεϊνών 115-kDa, 135-kDa με την τεχνική του Western blot. Η κινητική των IgG, IgM και IgA ανοσοσφαιρινών των θητικών στον ΑΦ οράν και των οράν που αναγνωρίζουν τις πρωτεΐνες 115-, 135-kDa και τον ΛΠΣ είναι παρόμοιες. Το ποσοστό όμως των οράν που εμφανίζει αντισώματα έναντι του ΛΠΣ στο Western blot είναι λίγο μεγαλύτερο από εκείνο που είναι θετικό στον ΑΦ ή που εμφανίζει αντισώματα έναντι της πρωτεΐνης 115-kDa. Τα IgM όσο και τα IgA έναντι της 135-kDa ανιχνεύονται σε ποσοστό που είναι μικρότερο του 20% και διαρκούν πολύ λίγο. Αντίθετα, τα IgG έναντι της πρωτεΐνης αυτής εμφανίζονται στο 65% των οράν και ο μεγαλύτερος τους τίτλος ανιχνεύεται την 5η ημ. IgG αντισώματα έναντι της 60-kDa έχουν βρεθεί μόνο σε κακοήθεις μορφές ΜΚΠ. Τα αντισώματα αυτά θεωρούνται από την Teysseire δείκτες κακοήθους μορφής. Τα IgM αντισώματα που καταυθύνονται κυρίως έναντι του ΛΠΣ δεν είναι ανιχνεύσιμα μετά από 3-12 μήνες (Beati & Teysseire et al., 1992). Τα IgM μπορούν όμως να ανιχνευθούν και πολύ αργότερα και σε τίτλους αρκετά υψηλούς. Η ύπαρξή τους οφείλεται είτε σε ασυμπτωματική επαναλοίμωξη είτε σε διασταυρούμενες αντιδράσεις. Με τη βοήθεια του ΑΦ τα IgG αντισώματα ανιχνεύονται 3 και 4 χρόνια αργότερα σε τίτλους 1/40 και 1/60 ή και κατ'εξάιρεση υψηλότερους (Mansueti et al., 1985). Σε αποδράμουςες λοιμώξεις (περισσότερο από 6 μήνες), ο ΑΦ παραμένει θετικός, ενώ η ΙΗΑ και το latex είναι αρνητικές.

Διασταυρούμενες αντιδράσεις εμφανίζονται στις παρακάτω περιπτώσεις:

1) Μεταξύ ρικετσιών της ΟΚΠ και ΟΤ

Με τον ΑΦ, το ΙΗΑ και το latex εμφανίζονται σημαντικές διασταυρούμενες αντιδράσεις μεταξύ *R. conorii* και *R. rickettsii* και λιγότερο εξεσημασμένες με την *R. typhi*. Σε ορούς αρρώστων με ενδημικό τύφο, ο Ormsbee (Ormsbee et al., 1978) βρήκε IgG και IgM αντισώματα έναντι της *R. prowazekii*, *R. typhi*, *R. canada* αλλά και IgG (λιγότερο IgM) αντισώματα έναντι των ρικετσιών της ΟΚΠ. Αντίθετα σε ορούς αρρώστων με ΜΚΠ βρήκε IgG και IgM έναντι της *R. rickettsii*, *R. conorii*, *R. akari* και των ρικετσιών της ΟΤ. Ο Raoult έδειξε ότι στο WB με ορούς ασθενών με ΜΚΠ η *R. conorii* και η *R. rickettsii* εμφανίζουν σημαντικές διασταυρούμενες αντιδράσεις με τον ΛΠΣ και τις πρωτεΐνες (Raoult & Dasch 1989a). Οι διασταυρούμενες αυτές αντιδράσεις αφορούν τόσο την IgM όσο και τα IgG αντισώματα. Είδη της ΟΚΠ γενετικά πιο απομακρυσμένα, όπως είναι η *R. australis* και η *R. akari* δίνουν διασταυρούμενες αντιδράσεις με τον ΛΠΣ (IgM και IgG) και σπανιότερα με τις πρωτεΐνες ή και καθόλου στην περίπτωση της *R. bellii*. Με την *R. typhi* οι διασταυρούμενες αντιδράσεις είναι εξαιρετικά σπάνιες με τις πρωτεΐνες αλλά σχετικά πιο συχνές με τον ΛΠΣ, κυρίως με τις IgM και λιγότερο με τις IgG. Η κατανομή όμως του ΛΠΣ (που αντιστοιχεί περίπου στα 50-kDa) της ΟΤ στο WB εμφανίζει διαφορετική διασπορά από εκείνη που εμφανίζουν τα είδη της ΟΚΠ (Vishwanath 1991; Raoult & Dasch 1989a).

Μονοκλωνικά αντισώματα έναντι του ΛΠΣ της *R. rickettsii* εμφανίζουν διασταυρούμενες αντιδράσεις με όλα τα είδη ρικετσιών της ΟΚΠ και καμία με τα είδη της ΟΤ (Anacker et al., 1987). Πιθανολογείται ότι η χημική σύσταση του ΛΠΣ της ΟΤ διαφέρει από εκείνη της ΟΚΠ. Παρόλα αυτά όμως οι ΑΠΣ των δύο αυτών ομάδων περιλαμβάνουν προσδιοριστικές ομάδες που δίνουν διασταυρούμενες αντιδράσεις ανάμεσα στα είδη των 2 ομάδων. Οι διασταυρούμενες αντιδράσεις που οφείλονται στις SPA

αφορούν τα είδη της ΟΚΠ και σπανιότερα (σε μόνο 2% των περιπτώσεων) την *R. typhi* (Raoult & Dasch 1989a). Όπως ήδη αναφέρθηκε έρευνες με μονοκλωνικά αντισώματα και υπεράνοσους ορούς ζώων έδειξαν ότι οι SPA εμφανίζουν επίτοπος ταυτόχρονα κοινούς της ομάδας, ειδικούς του είδους και σε ορισμένες περιπτώσεις ειδικούς του στελέχους. Οι ειδικοί του είδους επίτοποι στην περίπτωση της *R. conorii* βρίσκονται στις πρωτεΐνες 115- και 135-kDa. Επειδή στις ίδιες αυτές πρωτεΐνες βρίσκονται επίσης και ειδικοί επίτοποι της *R. sibirica*, η αντίγνωση με το WB των ειδικών αντισωμάτων που αναγνωρίζουν τις πρωτεΐνες αυτές θέτει την διάγνωση λοίμωξης με *R. conorii* μόνο όταν είναι γνωστό ότι η *R. sibirica* δεν κυκλοφορεί στην περιοχή. Επομένως η ανεύρεση αντισωμάτων έναντι των 115- και 135-kDa θέτει την διάγνωση λοίμωξης με *R. conorii* μόνο όταν είναι γνωστές οι κυκλοφορούσες στην περιοχή ρικετίες.

2) Διασταυρούμενες αντιδράσεις ρικετιών με τον *Proteus*

Η *R. typhi* και ο *P. vulgaris* OX19 εμφανίζουν κοινό αντιγόνο. Στον ενδημικό τύφο το κοινό αυτό αντιγόνο δίδει γένεση σε αντισώματα που συγκολλούν in vitro τον *Proteus* Ζώα που ανοσοποιούνται με τον *P. vulgaris* OX19 αναπτύσσουν επίσης συγκολλητίνες έναντι των ρικετιών. Γι' αυτό οι αντιδράσεις αυτές είχαν χρησιμοποιηθεί στην ορολογική διάγνωση και την ταυτοποίηση των ρικετιών (Weil and Felix 1916). Το κοινό αυτό αντιγόνο είναι υδατοδιαλυτό και από χημική άποψη είναι πολυσακχαρίτης. Πρόσφατα καταδείχθηκε ότι το υπόστρωμα των διασταυρούμενων αυτών αντιδράσεων ήταν ο ΛΠΣ των ορότυπων OX19, 2 και K του *Proteus vulgaris*.

3) Διασταυρούμενες αντιδράσεις με *Legionella*

Οροεπιδημιολογικές μελέτες των λεγιονελλώσεων στο Ισραήλ έδειξαν ότι οροί που είχαν αντισώματα έναντι της *L. bozemanii* αντιδρούσαν επίσης με την *R. typhi*. Ο Sompolinsky έδειξε με το Western blot, ότι οι διασταυρούμενες αυτές αντιδράσεις οφείλονταν στον ΛΠΣ (Sompolinsky et al, 1986).

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ

Η πρόσφατη ανάπτυξη νέων ορολογικών τεχνικών και ιδιαίτερα ταχέων τεχνικών άμεσης ανίχνευσης των ρικετσιών, η βελτίωση των τεχνικών παραγωγής των αντιγόνων και η παραγωγή μονοκλωνικών αντισωμάτων συνέβαλαν όχι μόνο στην ταχύτερη και έγκαιρη διάγνωση αλλά και στην αύξηση της ειδικότητας και της ευαισθησίας των διαγνωστικών μέσων. Η εφαρμογή αρκετών τεχνικών δεν αποτελεί πλέον αποκλειστικό πρόνομο μόνο ειδικών εργαστηρίων, αλλά παρέχει την δυνατότητα εκτέλεσής τους και από τις τριτοβάθμιες τουλάχιστον νοσηλευτικές μονάδες.

Οι εργαστηριακές τεχνικές διάγνωσης των ρικετσιών χωρίζονται σε άμεσες και έμμεσες.

Άμεση διάγνωση

Η βελτίωση των τεχνικών διάγνωσης ευόησε κατά κύριο λόγο την άμεση εργαστηριακή διάγνωση των ρικετσιώσεων. Η ανίχνευση και απομόνωση των ρικετσιών δεν αποτελεί πλέον διαδικασία που απαιτεί την παρέλευση εβδομάδων, αλλά μπορεί να ολοκληρωθεί μέσα σε μερικές ώρες. Χάρη στις τεχνικές αυτές η άμεση διάγνωση των ρικετσιώσεων είναι σήμερα ταχύτερη από εκείνη των άλλων βακτηριακών λοιμώξεων. Η ευαισθησία και η ειδικότητα των τεχνικών άμεσης ανίχνευσης των ρικετσιώσεων βελτιώθηκε κυρίως με την χρησιμοποίηση νέων φθορίζοντων αντισωμάτων, την καλλιέργεια μολυσμένων μονοκυττάρων και ενδοθηλιακών κυττάρων και από άλλες τεχνικές που θα αναπτυχθούν εκτενέστερα πιο κάτω, αφού προηγουμένα περιγραφούν σύντομα οι κλασικές τεχνικές.

Απομόνωση ρικετσιώσεων

Η απομόνωση των ρικετσιών γίνεται από το αίμα ή βιοψικά υλικά. Η μεταφορά των παθολογικών υλικών πρέπει να είναι ταχεία και η λήψη τους πρέπει να γίνεται πριν από την χορήγηση αντιβιοτικών. Ο ενοφθαλμισμός των παθολογικών υλικών γίνεται:

1) με ενδοπεριτοναϊκό ενοφθαλμισμό του παθολογικού υλικού σε ποντίκι ή αρουαίο (Burgdorfer et al., 1979).

Μετά τον ενοφθαλμισμό του παθολογικού υλικού στην περιτοναϊκή κοιλότητα των πειραματοζώων παρακολουθούμε την θερμική καμπύλη. Εφόσον δεν υπάρχουν κλινικές εκδηλώσεις, εκτελούνται εξετάσεις σε ορούς που έχουν ληφθεί την ημέρα του ενοφθαλμισμού και 3 εβδομάδες αργότερα. Όπως αναφέρθηκε στο κεφάλαιο της ταυτοποίησης, τα πειραματόζωα χρησίμευαν παλαιότερα στο διαχωρισμό των ειδών με αιμοβαϊές δοκιμασίες διασταυρούμενης προστασίας και με δοκιμασίες εξουδετέρωσης των τοξινών. Η μέθοδος αυτή δεν χρησιμοποιείται πλέον.

2) σε εμβρυοφόρα αυγά κοτόπουλου (Cox 1942)

Αυτά χρησιμοποιούνται για την απομόνωση αλλά και την παραγωγή ενός στελέχους. Ο ενοφθαλμισμός του δείγματος γίνεται στην μεμβράνη του εμβρυοφόρου σάκου. Η ιδανική θερμοκρασία ανάπτυξης είναι 33,5°C (Stoenner et al., 1961). Το αυγό πεθαίνει σε 5-7 ημ, ενώ ο πολλαπλασιασμός των ρικετσιών διαρκεί 48 ακόμη ώρες. Η ανίχνευση και

αναγνώριση των μικροοργανισμών γίνεται με χρώση Gimenez ή ανοσοφθορισμό (Raoult 1988).

3) σε κυτταροκαλλιέργειες

Οι κυτταρικές σειρές, όπως προηγούμενα αναφέρθηκε, εμφανίζουν διαφορετική ευαισθησία στα διάφορα είδη ρικετσιών. Επειδή το υπό απομόνωση στέλεχος είναι άγνωστο, ο ενοφθαλμισμός του παθολογικού υλικού πρέπει να γίνεται σε περισσότερες της μιας κυτταρικές σειρές (Johnson & Pedersen 1978). Η χρησιμοποίηση τριών τουλάχιστον κυτταρικών σειρών (L929, Vero και He1) εξασφαλίζει τις καλύτερες δυνατές συνθήκες για την απομόνωση των ρικετσιών. Με τις συνθήκες αυτές η κυτταροκαλλιέργεια αυξάνει τις πιθανότητες απομόνωσης αλλά είναι χρονοβόρα γιατί η καλλιέργεια των ρικετσιών απαιτεί τουλάχιστον 10 ημέρες (Karlowitz et al, 1983).

4) με την ταχεία καλλιέργεια ρικετσιών από τα κυκλοφορούντα μονοκύτταρα αίματος (shell-vial)

Η απομόνωση ρικετσιών από τα κυκλοφορούντα μονοκύτταρα αποτέλεσε ένα σημαντικό βήμα δεδομένου ότι με την τεχνική αυτή οι ρικετσιώσεις συνήθως ανιχνεύονται μετά από 48 ώρες (Marrero & Raoult 1989). Η ταχεία καλλιέργεια των ρικετσιών εφαρμόστηκε για πρώτη φορά από τους Marrero και Raoult και αποτελεί τροποποίηση της μεθόδου απομόνωσης του μεγαλοκυτταροϊού (CMV) (Paya et al, 1987). Ο ενοφθαλμισμός του πλάσματος με την λευκοκυτταρική στιβάδα πραγματοποιείται σε κυλινδρικά σεληνάρια (shell-vial), στο έλασμα των οποίων έχουν αναπτυχθεί μονόστιβοι ινοβλάστες He1. Μετά από φυγοκέντρηση των shell-vial απορρίπτεται η υγρή φάση της καλλιέργειας και τα shell-vial επωάζονται σε ατμόσφαιρα διοξειδίου στους 37°C αφού προηγούμενα πραγματοποιηθούν πλύσεις και προσθήκη νέου θρεπτικού υλικού. Τα ελάσματα εξετάζονται με ΑΦ μετά από 48, 72, 96 ή 120 ώρες αφού προηγούμενα μονιμοποιηθούν σε ακετόνη. Οι θετικές καλλιέργειες μετά από θρυψινοποίηση ενοφθαλμίζονται σε κανονικές κυτταρικές σειρές για να τυποποιηθούν. Η ευαισθησία της μεθόδου είναι πολύ μεγαλύτερη από εκείνη των κλασσικών μεθόδων καλλιέργειας. Οι Marrero και Raoult βρήκαν θετικούς 11 από τους 13 αρρώστους με ΜΚΠ, ενώ η καλλιέργεια σε εμβρυοφόρα αυτά όρνιθας ήταν θετική σε 3 μόνο περιπτώσεις (Marrero and Raoult 1989). Η αυξημένη ευαισθησία της μεθόδου οφείλεται στην φυγοκέντρηση που ευνοεί την είσοδο των ρικετσιών στα κύτταρα (Wike & Burgdorfer 1972; Weiss & Dressler 1960).

Ανίχνευση ρικετσιών

Η άμεση ανίχνευση των ρικετσιών επιτρέπει την έγκαιρη διάγνωση των ρικετσιώσεων και είναι ιδιαίτερα χρήσιμη στις βαριές και άτυπες μορφές της νόσου. Η άμεση ανίχνευση χρονολογείται από τότε που ανακαλύφθηκαν οι ρικετίες αλλά εφαρμόστηκε με μεγαλύτερη επιτυχία σε νεκρυνικά βιοψικά υλικά παρά σε κλινικά παρασκευάσματα. Η πρόσφατη επιτυχής εφαρμογή τους σε κλινικό υλικό οφείλεται στην βελτίωση των τεχνικών.

1) Ανίχνευση ρικετσιών με Ανοσοφθορισμό (ΑΦ) σε βιοψία δέρματος (Hebert et al., 1980; Raoult & DeMicco et al., 1984; Demicco et al., 1986)

Η μέθοδος αυτή εφαρμόστηκε κατ'αρχάς στις ΗΠΑ και πιο πρόσφατα στην Ευρώπη (DeMicco et al., 1986; Raoult & Pastor et al, 1983).

Εκτελείται σε κατεψυγμένες τομές ιστών και σε μπλόκ παραφίνης. Σε κατεψυγμένες τομές βιοψικού υλικού ο χρόνος ανάγνωσης του αποτελέσματος περιορίζεται στις 48 ώρες και επιτρέπει την ακριβή διάγνωση. Η τεχνική είναι ευαίσθητη και ειδική, η εκτέλεση της όμως προϋποθέτει την ύπαρξη σχετικής εμπειρίας. Η αγγειίτιδα των εξανθηματικών στοιχείων του ΜΚΠ είναι εντοπισμένη. Γι' αυτό επιβάλλεται η εξέταση συνεχόμενων τομών και η λήψη του βιοψικού υλικού από το κέντρο του δερματικού στοιχείου. Η εφαρμογή του ΑΦ είναι περισσότερο επιτυχής στην εσχάρα ενοφθαλμισμού ("tâche noire").

2) Ανίχνευση ρικετσιών σε κυκλοφορούντα ενδοθηλιακά κύτταρα

Ιστολογικά και νεκρωτικά υλικά αρρώστων με ΜΚΠ και *in vitro* πειραματική μόλυνση με ρικέτσιες ενδοθηλιακών κυττάρων ανθρώπου έδειξαν ότι τα παραπάνω κύτταρα αποτελούν το πρωταρχικό στόχο των ρικετσιών της ΟΚΠ (Silverman & Bond 1984). Προκαταρκτικά αποτελέσματα των Drancourt et al (Drancourt & George et al, 1992) έδειξαν ότι η συγκεκριμένη μέθοδος ανίχνευσης αποτελεί εξέταση που εμφανίζει υψηλή ειδικότητα και ικανοποιητική (75%) ευαισθησία. Ο διαχωρισμός των ενδοθηλιακών κυττάρων από τα υπόλοιπα στοιχεία του αίματος επιτυγχάνεται με μαγνητικά σφαιρίδια επικαλυμμένα με μονοκλωνικά αντισώματα έναντι των ενδοθηλιακών κυττάρων. Στη συνέχεια τα διαχωρισθέντα κύτταρα εξετάζονται με ΑΦ.

3) Η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης της DNA πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR).

Η μέθοδος αυτή, η οποία αναπτύσσεται λεπτομερώς στην σελ. 68, έχει εφαρμοσθεί στην ανίχνευση αρκετών μικροοργανισμών (Telenti et al, 1990, Shibata et al, 1988, Demmler et al, 1988, Weiss et al, 1991, Aurelius et al, 1991). Ο Tzianabos το 1989 εφάρμοσε με επιτυχία την νέα τεχνική στο αίμα ασθενών με ΚΠΒΟ και ΜΚΠ (Tzianabos et al, 1989). Στην πρώτη αυτή προσπάθεια χρησιμοποιήθηκαν ειδικοί εναρτές για το γονίδιο της 17-kDa αντιγονικής πρωτεΐνης, η οποία είναι κοινή στην ΟΚΠ και OT (Anderson & Tzianabos 1989). Την ίδια χρονιά ο Carl είχε όμοια αποτελέσματα εξαγοντας DNA από ασθενή επιδημικού τύπου (Carl et al, 1990). Το 1990 ο Kelly χρησιμοποιώντας εναρτές της 56-kDa ανίχνευσε εκλεκτικά την *R. tsutsugamushi* ανάμεσα σε άλλα στελέχη αναφοράς (Kelly & Marana et al, 1990).

Έμμεση διάγνωση

Η έμμεση διάγνωση των ρικετσιώσεων γενικά βασίζεται στην ανίχνευση αντισωμάτων με ορολογικές μεθόδους και έχουν χρησιμοποιηθεί μέχρι σήμερα σχεδόν όλες οι υπάρχουσες και διαθέσιμες τεχνικές. Παρόλα αυτά καμιά από αυτές δεν προσφέρει την δυνατότητα διάγνωσης στα πρώτα στάδια της λοίμωξης ώστε να καθοδηγήσει έγκαιρα την θεραπευτική αγωγή. Η επιλογή της τεχνικής δεν συνιστά τον μοναδικό παράγοντα επιτυχίας της ορολογικής διάγνωσης. Η ποσότητα και η ποιότητα των παρασκευαζόμενων αντιγόνων αποτελεί μια εξίσου σημαντική παράμετρο. Οι ορολογικές δοκιμασίες μπορούν να ταξινομηθούν στις ακόλουθες 3 μεγάλες ομάδες με βάση τα αντιγόνα που χρησιμοποιούν: σε εκείνες που χρησιμοποιούν *ακέραιες ρικέτσιες*, σε εκείνες που χρησιμοποιούν *προιόντα εκχύλισης* και εκείνες που χρησιμοποιούν *κυτταρικά κλάσματα του μικροβιακού κυττάρου*.

Οι δοκιμασίες που εκτελούνται με *ακέραιες ρικέτσιες* είναι η Weil-Felix, ο ΑΦ και η μικροσυγκόλληση (ΜΑ) και ανιχνεύουν αντισώματα που κατευθύνονται σε αντιγόνα που

βρίσκονται πάνω στην επιφάνεια των κυττάρων. Τα πιο ανοσογόνα από τα αντιγόνα αυτά είναι ο ΑΠΣ, και ενδεχομένως οι πρωτεΐνες 120- έως 190-kDa.

Οι ορολογικές δοκιμασίες που χρησιμοποιούν αντιγονικά *εκχυλίματα* είναι η σύνδεση συμπληρώματος (ΣΣ), η παθητική αιμοσυγκόλληση (ΙΗΑ) και το latex. Τα αντιγόνα που χρησιμοποιούνται στις τρεις αυτές δοκιμασίες παρασκευάζονται με τον ίδιο περίπου τρόπο. Ανάλυση των εκχυλισμάτων έχει γίνει μόνο στην περίπτωση του αντιγόνου που ευαισθητοποιεί τα ερυθρά στη ΙΗΑ. Η μελέτη αυτή έδειξε ότι πρόκειται για υδατάνθρακες χωρίς να έχει προσδιοριστεί η ακριβής χημική σύνθεση (Osterman & Eisemann 1978). Ο Plotz, ως αναφέρεται στο κεφάλαιο όπου ασχολείται με την ταυτοποίηση των ρικετσιών, έδειξε ότι το αντιγόνο της ΣΣ είναι ειδικό της ομάδας (βλ. σελ. 17). Πιο πρόσφατες επίσης έρευνες έδειξαν ότι οι ΑΠΣ των ρικετσιών είναι ειδικά αντιγόνα της ομάδας (Anacker et al., 1987). Η συσχέτιση των αποτελεσμάτων αυτών δείχνει ότι κατά πάσα πιθανότητα τα αντιγόνα που χρησιμοποιούνται στην ΣΣ, ΙΗΑ και latex είναι ΑΠΣ.

Οι δοκιμασίες που χρησιμοποιούν *κλάσματα ρικετσιών* είναι το Western blot, το line blot και η Elisa. Τα αντιγόνα αυτά παρασκευάζονται με ωσμωτική πίεση και με την χρήση γαλλικού τύπου συμπιεστή "French pressure cell" (Raoult & Dasch 1989b).

Η σύντομη αυτή ανασκόπηση δείχνει ότι τα αντιγόνα που χρησιμοποιούνται στις ορολογικές δοκιμασίες δεν έχουν επαρκώς μελετηθεί και ότι η χημική τους σύνθεση αποτελεί αντικείμενο έρευνας.

Όλες οι δοκιμασίες που έχουν χρησιμοποιηθεί στην ορολογική διάγνωση των ρικετσιών εμφανίζουν πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα, η γνώση των οποίων είναι σημαντικό στοιχείο για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

Η αντίδραση Weil-Felix (Weil and Felix 1916)

Η **αντίδραση Weil-Felix** δεν είναι ευαίσθητη ούτε όμως και ειδική (Hechemy et al., 1979; Kaplan & Schonberger 1986; Raoult & Rousseau et al., 1984). Τα αντιζώμια αντισώματα είναι κυρίως IgM ανοσοσφαιρίνες που παράγονται στη διάρκεια βραχείας περιόδου μετά την έναρξη της λοίμωξης. Η αντίδραση αυτή έχει μόνο ιστορική αξία και δεν πρέπει να χρησιμοποιείται στην διάγνωση των ρικετσιών.

Η σύνδεση συμπληρώματος

Η δοκιμασία **σύνδεση συμπληρώματος** (ΣΣ) τις 3 πρώτες εβδομάδες μετά την έναρξη της λοίμωξης εμφανίζει πολύ μικρή ευαισθησία (Newhouse et al., 1979), η εφαρμογή της είναι επίπονη, απαιτεί μεγάλη ποσότητα αντιγόνου και δεν μπορεί να εκτελεσθεί σε ορούς που είναι αντισυμπληρωματικοί. Όπως αναφέρθηκε πιο πάνω, τα αντιγόνα που χρησιμοποιούνται στην ΣΣ είναι ειδικά της ομάδας (Edlinger 1979, Kaplan & Schonberger 1986).

Η μικροσυγκόλληση (Fiset 1969)

Η δοκιμασία της **μικροσυγκόλλησης** απαιτεί μεγάλες ποσότητες αντιγόνου, δεν είναι ευαίσθητη, ενώ εμφανίζει διασταυρούμενες αντιδράσεις με τον επιδημικό και ενδημικό τύπο (Newhouse et al., 1979).

Η συγκόλληση με latex (Hechemy 1986)

Η δοκιμασία αυτή είναι ευαίσθητη αλλά ανιχνεύει κατά πρότμηση IgM αντισώματα. Η ευαισθητοποίηση των σωματιδίων latex γίνεται με αντιγόνα ειδικά της ομάδας. Η μέθοδος δεν πρέπει να εκτελείται με λιπαιμικούς ορούς.

Παθητική αιμοσυγκόλληση (ΙΗΑ)

Κατά την εκτέλεση της χρησιμοποιείται το ίδιο ειδικό της ομάδας αντιγόνο με εκείνο της δοκιμασίας Latex. Τα ερυθρά προβάτου ευαισθητοποιούνται με γλουταραλδεύδη και διατηρούνται λίγες μόνο ημέρες. Η ευαισθησία της μεθόδου είναι περίπου ίδια με εκείνη της συγκόλλησης με Latex (Kaplan & Schonberger 1986; Raoult & Hechemy et al, 1985; Shirai et al, 1975; McDade 1991).

Εμμεσος ανοσοφθορισμός (ΑΦ) (Philip 1976)

Η δοκιμασία του **έμμεσου ανοσοφθορισμού (ΑΦ)** είναι ευαίσθητη και παρέχει την δυνατότητα προσδιορισμού των ισότυπων των ανοσοσφαιρινών (IgM, IgG) (McDade 1991). Εμφανίζει επίσης το προτέρημα ότι η κινητική των αντισωμάτων στις ρικετσιώσεις έχει μελετηθεί με την δοκιμασία αυτή. Είναι ειδική του είδους εφόσον ο τίτλος των αντισωμάτων προσδιοριστεί με αντιγόνα όλων των ειδών ΟΚΠ και ΟΤ ή ακόμα εφόσον ο ορός υποστεί απορρόφηση με τα διάφορα είδη ρικετσιών. Θεωρείται από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας μέθοδος αναφοράς (WHO Working Group 1982) και η χρήση της έχει καθιερωθεί παγκόσμια σαν η ενδεικνυόμενη διαγνωστική μέθοδος των ρικετσιώσεων (McDade 1991; Kaplan & Schonberger 1986; Newhouse et al, 1979; Philip et al, 1976; Raoult & Hechemy et al, 1985; Raoult & Rousseau et al, 1984).

Η δοκιμασία Line blot

Το **Line blot** (Raoult & Dasch 1989a, 1989b) είναι μια ανοσολογική μέθοδος (ανοσοκαθίωση) όπου τα αντιγόνα εναποτίθενται σε φύλλα νιτροκυτταρίνης εμφανίζοντας διακεκριμένες μπάντες. Δεν αποφεύγει όμως τις διασταυρούμενες αντιδράσεις αφού χρησιμοποιεί ολικό αντιγόνο και είναι λίγο πιο ευαίσθητο και ειδικό από τον ΑΦ (Raoult & Dasch 1989a).

ELISA

Η ευαισθησία της **ELISA** υπερέχει εκείνης του ΑΦ (Mansueto et al, 1989; McDade 1991; Raoult 1988). Είναι ειδική του είδους εφόσον τηρηθούν οι προϋποθέσεις που αναφέρθηκαν στον ΑΦ και χρησιμοποιηθούν σωματικά αντιγόνα και όχι βακτηριακά κλάσματα. Αποτέλεσε αντικείμενο λίγων μόνο δημοσιεύσεων.

Western Blot

Η δοκιμασία του **Western Blot** είναι ευαίσθητη και ειδική. Η ευαισθησία της μεθόδου έχει συγκριθεί μόνο με εκείνη του ΑΦ και βρέθηκε ότι είναι ίδια (Teyssie & Raoult 1992). Σε ότι αφορά την ειδικότητα της αντίδρασης έχει γίνει εκτενής ανάλυση του θέματος στην ανοσοβιολογία. Η δοκιμασία Western blot χρησιμοποιείται μόνο σε ειδικά εργαστήρια και μέχρι σήμερα δεν έχει χρησιμοποιηθεί σε οροεπιδημιολογικές μελέτες.

ΠΡΟΦΥΛΑΞΗ

Τα κύρια προφυλακτικά μέτρα επικεντρώνονται στην καταπολέμηση των κροτώνων (τακτικά καθάρισμα των σκύλων και χρήση εντομοκτόνων). Στις ενδημικές περιοχές, η καθημερινή επιθεώρηση ολόκληρου του σώματος επιτρέπει την ανίχνευση των κροτώνων. Όταν αποκολλάται ο κρότωνας από το σώμα πρέπει να αποφευχθεί η σύνθλιψή του, γιατί διαφορετικά θα μολυνθεί ο ασθενής. Η γύρω δερματική περιοχή απολυμαίνεται με αλκοόλη. Οι ίδιες προφυλάξεις και χειρισμοί ανιστοούνται και για τους σκύλους. Ταξιδιώτες προερχόμενοι από ενδημικές περιοχές πρέπει να ελέγχουν τα σκυλιά τους ώστε να αποφευχθεί εισαγωγή μολυσμένων κροτώνων (Raoult 1991). Τέτοιου είδους περιπτώσεις εμφανίζονται ημέρες, μήνες ή και χρόνια μετά το ταξίδι (Edlinger & Navarro 1983).

Ειδικό εμβόλιο δεν είναι ακόμη διαθέσιμο, αν και πειράματα σε ινδόχοιρους έδειξαν πως η 198-kDa πρωτεΐνη της *R. conorii* είναι υποψήφια για ένα εμβόλιο κατά του ΜΚΠ (Vishwanath et al., 1990; Li et al., 1988). Προληπτική χορήγηση αντιβιοτικών μετά από τσίμπημα κρότωνα σε ενδημική περιοχή δεν ενδείκνυται γιατί υπάρχει κίνδυνος υποτροπών μετά το τέλος της θεραπείας (Raoult 1991). Η ιατρική επίβλεψη παρέχει γρήγορη, ειδική και επαρκή θεραπεία σε περιπτώσεις μόλυνσης.

ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Η θεραπεία αναφοράς για τους εξανθηματικούς πυρετούς είναι η τετρακυκλίνη και τα παράγωγά της ή η χλωραμφενικόλη (Raoult & Walker 1990).

Η τετρακυκλίνη όμως προκαλεί οδοντικές διχρωμίες και υπερπλασίες σε παιδιά μικρότερα των 8 ετών. Η χλωραμφενικόλη παρά το γεγονός ότι χορηγείται εδώ και πολλά χρόνια, λίγα δεδομένα έχουν δημοσιευθεί και η αποτελεσματικότητά της πρόσφατα αμφισβητήθηκε. Αποτυχίες και υποτροπές παρατηρήθηκαν στο Ισραήλ και τις ΗΠΑ (Shaked et al., 1988; Fishbein et al., 1990). Λαμβάνοντας μάλιστα υπόψη τον κίνδυνο απλαστικής αναιμίας, η χορήγηση χλωραμφενικόλης θα πρέπει να αποφεύγεται. Αρκετές μελέτες έγιναν για τις κινολόνες. Η ciprofloxacin αναδείχθηκε εναλλακτική λύση για την τετρακυκλίνη (Raoult et al., 1986; Ruiz-Beltran & Herrero 1991). Η ofloxacin έχει χρησιμοποιηθεί επιτυχώς στην θεραπεία του ΜΚΠ, με μικρότερη όμως αποτελεσματικότητα (Ruiz-Beltran & Herrero 1991).

Η ερυθρομυκίνη και η κωτριμοξαζόλη παρουσίασαν επιτυχίες αλλά και αποτυχίες στην θεραπεία ρικετσιώσεων της ΟΚΠ (Ruiz-Beltran & Herrero 1991).

Η josamycin είναι εξίσου αποτελεσματική και μάλιστα συνίσταται σε παιδιά και έγκυους (Raoult & Drancourt 1991). Αντίθετα, η ριφωμυκίνη απέτυχε στη θεραπεία παιδιών (Bella et al., 1991).

Ως προς την διάρκεια της αντιβιοθεραπείας υπάρχουν αντικρουόμενες απόψεις.

Συμπερασματικά, η doxycycline αποτελεί το αντιβιοτικό πρώτης εκλογής για τον ΜΚΠ, με δοσολογία 200 mg / ημ για δύο έως πέντε ημέρες. Η χορήγηση πρέπει να σταματά 24 ώρες μετά την απουσία (Raoult & Drancourt 1991). Σε έγκυους και παιδιά η josamycin αποτελεί την καλύτερη λύση (50 mg/kg/ημ για 5 ημ).

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Οι στόχοι της εργασίας μπορούν να διαχωρισθούν σε δύο ενότητες. Η πρώτη περιλαμβάνει την οροεπιδημιολογική μελέτη και η δεύτερη την ανίχνευση, απομόνωση και ταυτοποίηση ρικετσιών.

Στην πρώτη ενότητα σκοπός της μελέτης ήταν:

α) να βρεθεί η συχνότητα του ΜΚΠ σε αγροτοκτηνοτροφικό πληθυσμό του Ν. Φωκίδας με την χρήση δύο διαγνωστικών τεχνικών, του ανοσοφθορισμού και του Western blot

β) να προσδιοριστεί η ευαισθησία, η ειδικότητα, η θετική και αρνητική διαγνωστική αξία του ανοσοφθορισμού

γ) να συσχετισθεί η ευρεθείσα συχνότητα με παραμέτρους όπως το φύλο, την ηλικία και το επάγγελμα.

Στην δεύτερη ενότητα σκοπός της μελέτης ήταν:

α) η συλλογή και ταξινόμηση των κροτώνων της ευρύτερης περιοχής

β) η ανίχνευση ρικετσιών από τους κρότωνα με την δοκιμασία της αιμολέμφου και την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης της DNA πολυμεράσης (PCR)

γ) η απομόνωση των ρικετσιών με την μέθοδο *shell-vial*

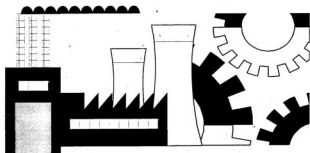
δ) η ταυτοποίηση των απομονωθέντων στελεχών με:

- ανάλυση της πρωτεϊνικής και αντιγονικής κατατομής με τις τεχνικές *SDS-PAGE* και *Western blot* αντίστοιχα

- την μέθοδο του *Phillip*

- ανάλυση του πολυμορφισμού των κλασμάτων του DNA στελεχών μετά από υδρόλυση με περιοριστικά ένζυμα (PCR-RFLP)

- την ηλεκτροφόρηση πηκτώματος με ώση πεδίου (Pulsed Field Gel Electrophoresis, PFGE).



ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Η εργασία διακρίνεται σε 2 μέρη με επιμέρους ενότητες

ΜΕΡΟΣ ΠΡΩΤΟ

Οροεπιδημιολογική μελέτη, όπου περιγράφονται:

- A) Ο τρόπος συλλογής των ορών και συμπλήρωσης του επιδημιολογικού δελτίου.
- B) Η παραγωγή αντιγόνου για τις διαγνωστικές τεχνικές. Στο τμήμα αυτό περιγράφονται:
- i) Οι μέθοδοι κύτταροκαλλιέργειας των ρικετσιών
 - ii) Η χρήση Gimenez για την ανίχνευση των ρικετσιών
 - iii) Ο καθαρισμός των ρικετσιών με renografin gradient
 - iv) Ο προσδιορισμός της ποσότητας των ρικετσιών στο εναίωρημα με την μέθοδο Lowry.
- Γ) Τα πρωτόκολλα των παρακάτω μεθόδων:
- i) Εμμεσος ανοσοφθορισμός.
 - ii) Ανάλυση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου, παρουσία SDS (SDS-PAGE).
 - iii) Western blot.
 - iv) Προσδιορισμός της ειδικότητας, της ευαισθησίας, της θετικής και αρνητικής διαγνωστικής αξίας του ανοσοφθορισμού.

ΜΕΡΟΣ ΔΕΥΤΕΡΟ

Περιλαμβάνει τις παρακάτω ενότητες:

- A) **Συλλογή και ταξινόμηση** των κροτώνων
- B) **Ανίχνευση** ρικετσιών από κρότωνα, που υπάρχουν στην παραπάνω περιοχή. Για τον σκοπό αυτό εφαρμόστηκε η δοκιμασία της αιμολέμφου και η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης της DNA πολυμεράσης (PCR)
- Γ) **Απομόνωση ρικετσιών από κρότωνα** με την μέθοδο *shell-vial*
- Δ) **Ταυτοποίηση** των στελεχών που απομονώθηκαν με:
- ανάλυση της πρωτεϊνικής και αντιγονικής κατατομής με τις τεχνικές *SDS-PAGE* και *Western blot* αντίστοιχα
 - την μέθοδο του *Philip*
 - ανάλυση του πολυμορφισμού των κλασμάτων του DNA στελεχών μετά από υδρόλυση με περιοριστικά ένζυμα (*PCR-RFLP*)
 - την ηλεκτροφόρηση πηκτής με ώση πεδίου (*Pulsed Field Gel Electrophoresis, PFGE*)
- Το παρακάτω διάγραμμα δείχνει την στρατηγική που ακολουθήθηκε στο δεύτερο μέρος της εργασίας.

ΚΡΟΤΙΣΜΑΣ

Ουρετανολίθια

Ανάλυση
(PCR με ενδοκις
της Κίχνης Σωθώρας)

Ανάλυση
(PCR με ενδοκις της
190-10a)

RFLP
με *RsaI*

RFLP
με *PstI*

Απομόνωση
(ταχεία καλλιέργεια)

Αιμόκαρος

Ανάλυση
(ορική Γαμμαζα)

Απομόνωση
(ταχεία καλλιέργεια)

Κολλήματα στελέχους
σε κulture LB29

Μορφή καλλιέργεια
για παροχή αντιγόνου

Επιλεκτική μέθοδος
Phlip

SDS-PAGE

Western Blot

PFGE

ΜΕΡΟΣ ΠΡΩΤΟ

ΟΡΟΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

ΣΥΛΛΟΓΗ ΟΡΩΝ

Ο νομός της Φωκίδας κατοικείται στην πλειοψηφία του από κτηνοτρόφους. Τα χωριά που επιλέχθηκαν για την μελέτη, Λευκαδίτι, Βουνιχώρα και Μακρυνή, βρίσκονται σε υψόμετρο περίπου 400 μ (βλ. χάρτη της επόμενης σελ.). Ο πληθυσμός τους είναι αντίστοιχα 109, 449 και 149 κάτοικοι.

Το πρωτόκολλο της έρευνας καταστρώθηκε μετά από προκαταρκτική επίσκεψη στις περιοχές που μελετήθηκαν. Το πρωτόκολλο περιλάμβανε συγκέντρωση των κατοίκων του χωριού την παραμονή της ημέρας που θα γινόταν η δειγματοληψία. Στις συγκεντρώσεις αυτές ο πληθυσμός ενημερωνόταν διεξοδικά πάνω στις ρικετσιώσεις με την βοήθεια διαφανειών. Επίσης κατά τις συγκεντρώσεις καταρτιζόταν το τελικό πρόγραμμα δειγματοληψίας, σύμφωνα και με τις υποδείξεις των κατοίκων (τόπος και ώρα δειγματοληψίας, συγκρότηση μιάς ή περισσότερων ιατρικών ομάδων κ.λ.π.).

Πριν από κάθε αμοληψία συμπληρωνόταν επιδημιολογικό δελτίο ειδικά καταρτισμένο για την έρευνα όπου καταγράφονταν τα παρακάτω στοιχεία: ηλικία, φύλο, επάγγελμα και στοιχειώδης νοσολογικό ιστορικό με ιδιαίτερη έμφαση στην πρόσφατη ύπαρξη πυρετού.

Για την ουσιαστικότερη διερεύνηση της σχέσης επάγγελμα-μόλυνση, το πληθυσμιακό δείγμα κατανεμήθηκε σε τρεις ομάδες ανάλογα με την επαγγελματική απασχόληση ή την ιδιότητα του εξεταζομένου :

α) την **ΕΡΓ-1** που περιελάμβανε ανθρώπους άμεσης επαγγελματικής επαφής με ζώα, π.χ. κτηνοτρόφους και σφαγείς.

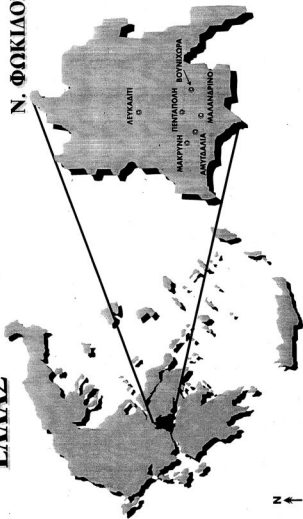
β) την **ΕΡΓ-2** με άτομα έμμεσης επαγγελματικής επαφής, όπως μεταφορείς γάλακτος ή με λίγα οικόσιτα ζώα.

γ) την **ΕΡΓ-3** με εκείνους που δήλωσαν ότι δεν έχουν καμία επαφή με ζώα στον εργασιακό χώρο ή στον χώρο κατοικίας τους, π.χ. δημόσιοι υπάλληλοι.

Οι οροί ελήφθησαν από υγιή άτομα. Μετά την αμοληψία, το αίμα παρέμεινε σε θερμοκρασία περιβάλλοντος προς πήξη. Στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκε στις 3000 στρ για 10 λεπτά. Ακολούθησε συλλογή του ορού και φύλαξη του στους -20°C μέχρι την χρήση του. Η αμοληψία και η φυγοκέντρηση του ορού πραγματοποιήθηκαν την ίδια ημέρα στον τόπο λήψης. Για την αποφυγή λάθους, τοποθετήθηκαν αυτοκόλλητες ετικέτες (με τον ίδιο αριθμό δείγματος) στο επιδημιολογικό δελτίο, στο σωληνάριο αμοληψίας και στα σωληνάρια erpendorf όπου φυλασσόταν ο ορός.

ΕΛΛΑΣ

Ν. ΦΩΚΙΔΟΣ



ΛΕΥΚΑΔΙΤΙ

ΜΑΚΡΥΝΗ ΠΕΝΤΑΠΟΛΗ

ΒΟΥΝΙΣΟΡΑ

ΑΚΥΤΑΛΙΑ

ΜΑΛΑΝΔΡΙΝΟ

↑
N

ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΑΝΤΙΓΟΝΟΥ

Το αντιγόνο που χρησιμοποιήθηκε για όλες τις ορολογικές δοκιμασίες παράχθηκε σύμφωνα με την διαδικασία που περιγράφεται παρακάτω. Συνοπτικά, συνίσταται στην μόλυνση υγιών κυττάρων με ρικέτσιες και στη συνέχεια στον καθαρισμό τους με renografin density gradient. Αναλυτικά:

Κυτταροκαλλιέργειες

Οι χειρισμοί γίνονται μέσα σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής ώστε να αποφευχθεί κάθε μόλυνση των κυτταρικών σειρών. Το χρησιμοποιούμενο υλικό είναι στείρο και μιας χρήσης.

Κυτταρική σειρά

Για την παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα L929 που είναι ακτινοβολημένα κύτταρα ποικίλου μορφής μακροφάγου (ATCC, CCL-1 NCTC clone 929).

Τα κύτταρα διατηρούνται στο υγρό άζωτο με την βοήθεια διαλύματος DMSO ή γλυκερίνης που συνίσταται από:

θρεπτικό υλικό	75%
ορό εμβρύου μόσχου	15%
DMSO ή γλυκερίνη	10%

Όργανα

- μικροσκόπιο αναστροφής φάσης
- κλίβανος 37°C, 5% CO₂
- υδατόλουτρα 37° και 56°C
- φυγόκεντρος
- φλάσκες καλλιέργειας των 75- και 150-cm² (Falcon)
- στείρες πιπέτες του 1, 2, 5, 10 και 25 ml
- σωλήνες φυγοκέντρησης των 50 ml με κυκλικό πυθμένα
- βιδωτοί σωλήνες των 50 ml με κωνικό πυθμένα
- γυάλινες σφαίρες
- αντικειμενοφόρες πλάκες

Υλικά

- trypticase soya agar (TSA)
 - Το θρεπτικό υλικό (MEM 4%) για την καλλιέργεια των κυττάρων L929 παρασκευάζεται ως ακολούθως:
 - * 500 ml θρεπτικό μέσο MEM-EARLE με 2.2 g/l NaHCO₃ (Seromed-Biochrom KG, Berlin) χωρίς γλουταμίνη
 - * 5 ml L-Glutamine (2 mM, Gibco)
 - * 25 ml ορού εμβρύου μόσχου, Fetal Calf Serum, FCS (Seromed-Biochrom KG, Berlin). Προηγείται αδρανοποίηση στους 56°C για 30 λεπτά και διήθηση με φίλτρο μεμβράνης (Millipore, Millex GS, 0.45 μm).
 - θρυσίνη-EDTA (αντίστοιχα 0,05% και 0,02%) σε PBS, Ca⁺⁺, Mg⁺⁺ (Seromed).
- Διατήρηση στους -20°C.

- διάλυμα Rinaldini:

NaCl	6,8 g
KCl	0,2 g

Glucose	1,0 g
NaHCO ₃	2,2 g
Na ₂ HPO ₄ ·2 H ₂ O	0,156 g
Κόκκινο της φαινόλης	0,02 g
Απεσταγμένο νερό qsp	1 λίτρο

Το διάλυμα αποστειρώνεται σε αυτόκαυστο και διατηρείται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

Διαδικασία

- Δύο σωλήνες, με 1,5 ml κυτταρικού εναιωρήματος ο καθένας, θερμαίνονται σε υδατόλουτρο 37°C.
- Το κυτταρικό εναιώρημα προστίθεται σε 30 ml θρεπτικού υλικού που περιέχει 20% ορό εμβρίου μόσχου.
- Το παραπάνω διάλυμα μεταφέρεται σε φλάσκα των 150 cm² και στη συνέχεια επωάζεται για 24 ώρες στους 37°C σε ατμόσφαιρα 5% διοξειδίου του άνθρακα.
- Μετά την πάροδο 24 ωρών, αλλάζεται το θρεπτικό υλικό.
- Μετά από 48 ώρες, ελέγχεται η ανάπτυξη του κυτταρικού τάπητα σε μικροσκόπιο αναστροφής φάσης. Στην συνέχεια ο κυτταρικός τάπητας θρυψινοποιείται.

Θρυψινοποίηση :

- Απομακρύνεται το θρεπτικό υλικό.
 - Γίνονται εκπλύσεις του κυτταρικού τάπητα με 20 ml διαλύματος Rinaldini, για να απομακρυνθεί ο ορός εμβρίου μόσχου, ο οποίος αναστέλλει την δράση της θρυψίνης.
 - Προστίθενται 2 ml θρυψίνης.
 - Τοποθετείται η φλάσκα στους 37°C για τέσσερα έως πέντε λεπτά ώστε να αποκολληθεί ο κυτταρικός τάπητας.
 - Λαμβάνονται τρεις σωλήνες κωνικού πυθμένα στους οποίους προστίθενται από 30 ml θρεπτικού υλικού. Από κάθε σωλήνα αφαιρούνται 2 ml θρεπτικού υλικού τα οποία προστίθενται στη φλάσκα θρυψινοποίησης. Το κυτταρικό εναιώρημα της φλάσκας αναροφάται και μοιράζεται ισοποσα (2ml) στους τρεις σωλήνες.
 - Ομογενοποιείται το μείγμα με την βοήθεια πιπέτας.
 - Ο έλεγχος στεριότητας του θρεπτικού υλικού επιτυγχάνεται με τον ενοφθαλμισμό μιας σταγόνας μίγματος σε τριβύλλιο trypticase soya agar (TSA) το οποίο επωάζεται σε 37°C.
 - Το περιεχόμενο κάθε σωλήνα μεταφέρεται σε αντίστοιχες φλάσκες των 150 cm².
 - Ακολουθεί επώαση στους 37°C, 5% CO₂ με ημιανοηχτό καπάκι.
- Οι φλάσκες αυτές μπορούν εκ νέου να θρυψινοποιηθούν και τριπλασιαστούν μετά από 48 ώρες. Η περίσσεια των φλασκών μπορεί να διατηρηθεί για μια ή δυο ημέρες στους 32°C μέχρι να χρησιμοποιηθεί ή ακολουθεί ψύξη των κυττάρων.

Ψύξη κυττάρων

- Η ψύξη κυττάρων από μια μεγάλη φλάσκα γίνεται ως εξής:
- Απομακρύνεται το υπερκείμενο.
 - Πλένεται ο κυτταρικός τάπητας με διάλυμα Rinaldini.
 - Προστίθεται 1 ml θρυψίνης και επωάζεται στους 37°C μέχρις ότου αποκολληθούν τα κύτταρα.
 - Το κυτταρικό εναιώρημα ανακτάται με 5 ml μέσου ψύξης.
 - Διανέμεται σε τέσσερις σωλήνες (cryo-tubes) από 1,5 ml του μίγματος.

- Οι σωλήνες ψύχονται με ανάδευση μέσα σε μίγμα απόλυτης αιθυλικής αλκοόλης και ξηρό πάγο (-50°C έως -70°C) και συντηρούνται στο υγρό άζωτο.

Μόλυνση κυττάρων με ρικέτσιες

- Αποψύχεται ένας σωλήνας με καλλιιεργημένες ρικέτσιες (1 ml).
- Αναμιγνύονται τα μολυσμένα με ρικέτσιες κύτταρα με 4 ml θρ. υλικού 4%.
- Απορρίπτεται το υπερκείμενο από μια φιάσκα των 150 cm² που περιέχει συνεχή κυτταρικό τάπητα.
- Το κυτταρικό υλικό εισάγεται στη φιάσκα των 150 cm².
- Σταγόνα μίγματος ενοφθαλμίζεται σε τρυβλίο trypticase soya agar, για την ανίχνευση πιθανής μόλυνσης από άλλα βακτήρια.
- Παραμονή της φιάσκας για 60 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος με κλειστό καπάκι.
- Προστίθενται 30 ml MEM στη φιάσκα και επωάζεται στους 32°C.

Η κυτταροπαθογόνος δράση των ρικετσιών παρατηρείται μετά από δυο με τρεις ημέρες. Στο οπτικό μικροσκόπιο τα μολυσμένα κύτταρα εμφανίζονται συρρικνωμένα και αποστρωγγυλεμένα. Πέντε ημέρες μετά από την μόλυνση, γίνεται δειγματοληψία του κυτταρικού τάπητα και του υπερκείμενου. Με την βοήθεια της χρώσης Gimenez (βλ. επόμενη παράγραφο) εκτιμάται ο βαθμός μόλυνσης.

Αν ο βαθμός μόλυνσης είναι αρκετός (δηλ. 90% των κυττάρων να είναι μολυσμένα με ρικέτσιες):

- Εισάγονται αποστειρωμένες υάλινες σφαίρες στη φιάσκα και αναδεύονται έντονα έτσι ώστε να γίνει πλήρης αποκόλληση των κυττάρων.
 - Το κυτταρικό υλικό τοποθετείται σε σωλήνα κυκλικού πυθμένα.
- Με το κυτταρικό αυτό υλικό είναι δυνατόν να μολυνθούν επτά νέες φιάσκες.

Αν θέλουμε να ψύξουμε τις ρικέτσιες:

- Ο σωλήνας με τα μολυσμένα κύτταρα ψυγοκεντρείται για 10 λεπτά στις 10000 στρ.
 - Απομακρύνεται το υπερκείμενο.
 - Το ίζημα ανακτάται με 1 ml MEM και μεταφέρεται σε πλαστικό σωλήνα των 2 ml
- Οι ρικέτσιες ψύχονται στους -80°C.

Χρώση Gimenez

(Gimenez 1964)

Αρχή της μεθόδου

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

Διαλύματα

Προετοιμάζονται τα παρακάτω διαλύματα:

- Βασική φουζίνη

- a) 10 g φουζίνης σε 100 ml αιθανόλης 95%.

β) 11,25 g φαινόλης σε 250 ml χλιαρού νερού (περίπου 37°C).

Ανάμειξη των δύο διαλυμάτων. Διατήρηση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για ένα χρόνο.

- Πράσινο του μαλαχίτη 0,8%

2 g οξαλικού μαλαχίτη σε 250 ml νερού. Το διάλυμα μπορεί να χρησιμοποιηθεί για 4 μήνες.

- Ρυθμιστικό διάλυμα

0,2M NaH ₂ PO ₄	3,5 ml
0,2M Na ₂ HPO ₄	15,5 ml
Απεσταγμένο νερό	19,0 ml

Διαδικασία

Λίγο πριν από την πραγματοποίηση της χρώσης:

- Αναμιγνύονται 2 ml βασικής φουζίνης και 5 ml ρυθμ. διαλύματος. Το μίγμα διηθείται σε ηθμό Whatman και μπορεί να διατηρηθεί για 48 ώρες.

- Τα δείγματα που περιέχουν ρικέτσιες τοποθετούνται σε αντικειμενοφόρο πλάκα.

Μετά το στέγνωμα της πλάκας γίνονται τα ακόλουθα βήματα:

1. Χρώση με το διάλυμα της βασικής φουζίνης για 3 λεπτά.
2. Εκπλύση με νερό βρύσης.
3. Χρώση με το διάλυμα του πράσινου του μαλαχίτη για 9 δευτερόλεπτα.
4. Εκπλύση με νερό βρύσης.
5. Χρώση με το διάλυμα του πράσινου του μαλαχίτη για 9 δευτερόλεπτα.
6. Εκπλύση με νερό βρύσης.

Η πλάκα στεγνώνεται ανάμεσα σε δυο φύλλα απορροφητικού χαρτιού.

Ακολουθεί παρατήρηση της πλάκας με καταδυτικό φακό σε οπτικό μικροσκόπιο. Οι ρικέτσιες εμφανίζονται ροζ σε πράσινο κυτταρικό φόντο.

Καθαρισμός ρικετσιών με renografin gradient

(J.E. McDade, τροποποίηση των Weiss et al., 1975)

Ο καθαρισμός των ρικετσιών πραγματοποιείται για την παραγωγή αντιγόνου που θα χρησιμοποιηθεί στον έμμεσο ανοσοφθορισμό, το SDS-PAGE, το Western blot και το PFGE. Ως ρυθμιστικό διάλυμα χρησιμοποιείται το PBS, ενώ σε μια περίπτωση (του PFGE) το K 36.

Υλικά

- Υπερφυγόκεντρος Beckman L3-50
- Rotor SW 41 (ή SW 27)
- Φυγόκεντρος Sorvall RC2B
- Rotor SS34
- Συσσκευή gradient Gilson Minipuls 2
- Συσσκευή υπερήχων
- σωλήνες φυγοκέντρησης 250 ml (βιδωτά, με σφαιρικό πυθμένα)
- σωλήνες φυγοκέντρησης 50 ml (polycarbonate, βιδωτά, με σφαιρικό πυθμένα, Bioblock)
- σωλήνες φυγοκέντρησης 50 ml (polycarbonate, βιδωτά, με κωνικό πυθμένα, Bioblock)
- αποστειρωμένοι βιδωτοί σωλήνες 2ml.

- Σύριγγες των 3 ml
- Σύριγγες των 60 ml
- Βελόνες Becton-Dickinson, Yale Spinal 19 gauges 3/2
- Φίλτρα διαμέτρου 8 mm
- Το ρικετσιακό στέλεχος που έχει φυλαχθεί στους -70°C με MEM 4% FCS

Διαλύματα

- Ρυθμιστικά διαλύματα:
 - α) PBS χωρίς ασβέστιο ή μαγνήσιο (pH 7.4)
 - ή β) K 36, το οποίο παρασκευάζεται ως εξής:

KH ₂ PO ₄	2,25 g
K ₂ HPO ₄	5,8 g
KCl	7,4 g
NaCl	0,9 g
Νερό qsp	1 l

- Θουρίνη 5% σε PBS ή K 36 ανάλογα με την χρήση
- Sucrose 25% σε PBS ή K 36

Sucrose (Merck)	25 g
ρυθμ. διάλυμα qsp	100 ml

Η sucrose διαλυτοποιείται με μαγνητικό αναδευτήρα και φιλτράρεται.

- Renografin 76: σκευάσμα Radioselectan® (Schering, France)

Σύνθεση:

Amidotrizoates de sodium	10 g
Amidotrizoates de meglumine	66 g
Tetracemate disodique	0,01 g
Ενέσιμο απυρογόνο νερό qsp	100 ml

- Διαλύματα Renografin

	28%	45%
Renografin 76	58,3 ml	145,3 ml
PBS qsp	100 ml	100 ml

Τα διαλύματα συντηρούνται στους +4°C και μεταφέρονται πάνω σε πάγο.

Διαδικασία

Όλα τα κυτταρικά διαλύματα διατηρούνται σε πάγο κατά την διάρκεια της διαδικασίας. Ο καθαρισμός των ρικετσιακών πραγματοποιείται μόνο εφόσον υπάρχουν 12 μεγάλες φλάσκες (150 cm²) μολυσμένες κατά 90% με ρικέτσιες.

- Ελέγχεται ο βαθμός μόλυνσης των κυτάρων με χρώση Gimenez.
- Εισάγονται αποστειρωμένες γυάλινες σφαίρες μέσα στη φλάσκα, η οποία ανακινείται έντονα ώστε να αποκολληθούν πλήρως τα κύτταρα.
- το μίγμα (αποκολληθέντα κύτταρα και θρεπτικό υλικό) μεταφέρεται σε σωλήνα με κυκλικό πηθίμα.
- Φυγοκέντρωση 17.500 x g / 10' / 4°C.
- Απορρίπτεται το υπερκείμενο και το ίζημα επαναδιαλυτοποιείται με ρυθμιστικό διάλυμα.
- τα κύτταρα σπάζουν με σύριγγα ινσουλίνης με συνεχείς εισαγωγές-εξαγωγές (3-4 φορές).

- Εφαρμογή των υπερήχων για πληρέστερη διάρρηξη των κυττάρων.
- Φυγοκέντρηση 150 x g / 10' / 4°C με φρένο ώστε να διαχωριστούν οι ρικέτσιες (υπερκεείμενο) από τα κύτταρα (ίζημα).
- Επανάληψη του προηγούμενου βήματος.
- Το υπερκεείμενο συλλέγεται σε σωλήνες φυγοκέντρησης 50 ml (polycarbonate, βιδωτά, με σφαιρικό πυθμένα).
- Προσεκτικά προστίθεται ίση ποσότητα sucrose 25% με αυτή του υπερκεείμενου.
- Φυγοκέντρηση 7.000 x g / 30' / 4°C / χωρίς φρένο (rotor HS-4, Sorvall).
- Το υπερκεείμενο απομακρύνεται με αντλία κενού μέσα στον θάλαμο νηματικής ροής (προσοχή πρέπει να αλλάζει η πίεση Pasteur όταν χειρίζομαστε διαφορετικά στελέχη).
- Το ίζημα επαναδιαλυτοποιείται και ομογενοποιείται με 1ml ρυθμιστ. διάλυμα.
- Στην τελευταία σταγόνα εφαρμόζεται η χρώση Gimenez, για να ελεγχθεί ο βαθμός απομάκρυνσης των κυττάρων.
- Το εναιώρημα προστίθεται προσεκτικά σε σωλήνες φυγοκέντρησης ultra-clear της Beckman που περιέχουν gradient renografine 28 με 45%.
- Οι σωλήνες ζυγίζονται ώστε να είναι ισοβαρείς. Η εξισορρόπηση του βάρους γίνεται με προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος.
- Μεταφορά των σωλήνων φυγοκέντρησης στους ειδικούς περιέκτες του Rotor SW27 (ή SW41) της Beckman.
- Φυγοκέντρηση 25000 στρ / 60' / 4°C / φρένο.
- Μετά την φυγοκέντρηση, συλλογή των κλάσμάτων με σύριγγα των 3 ml και βελόνη (Yale Spinal 19 gauges 3/2 Beckton-Dickinson). Δύο κλάσματα είναι ορατά: η πιο κοντά στην επιφάνεια αντιστοιχεί στα κυτταρικά υπολείματα και απορρίπτεται, ενώ η δεύτερη αποτελείται από άθικτες ρικέτσιες και συλλέγεται προσεκτικά. Μερικές φορές ένα πρόσθετο κλάσμα είναι ορατό κάτω από το προηγούμενο. Αυτό συλλέγεται και εξετάζεται με χρώση Gimenez για πιθανή ύπαρξη ρικετσιών.
- Τα κλάσματα με τις ρικέτσιες συλλέγονται σε σωλήνες φυγοκέντρησης με σφαιρικό πυθμένα των 50 ml και αραιώνονται 6-8 φορές με προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος.
- Φυγοκέντρηση 17.500 x g / 10' / 4°C / φρένο (Rotor SS34, Sorvall).
- Το υπερκεείμενο απομακρύνεται με αντλία κενού και το ίζημα επαναδιαλυτοποιείται με ρυθμιστικό διάλυμα.
- Φυγοκέντρηση 17.500 x g / 10' / 4°C / φρένο.
- Το νέο υπερκεείμενο απομακρύνεται με αντλία κενού, ενώ το ίζημα επαναδιαλυτοποιείται με ελάχιστη ποσότητα (0,4 ml) ρυθμιστικό διάλυμα.
- Η καθαρότητα ελέγχεται με χρώση Gimenez.
- Η συγκέντρωση των ρικετσιών στο εναιώρημα ελέγχεται με την μέθοδο Lowry.
- Οι ρικέτσιες διατηρούνται στους -70°C.

Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των ρικετσιών με την μέθοδο Lowry

Η μέθοδος στηρίζεται στη δημιουργία χηλικού συμπλόκου, χρώματος ερυθροειδούς, ανάμεσα σε δύο γειτονικούς πεπτιδικούς δεσμούς, παρουσία ιόντων χαλκού (αντίδραση διουρίας) σε αλκαλικό περιβάλλον. Το σχηματιζόμενο σύμπλοκο ανάγει το αντιδραστήριο Folin Ciocalteu's (μίγμα χηλικών συμπλόκων και φωσφορικού οξέος, του μολυβδαινικού οξέος και του βολφραμικού οξέος) και το προϊόν, κυανού του μολυβδαινίου, έχει ευρύ φάσμα απορρόφησης με μέγιστο στα 750 nm.

Κατασκευή της πρότυπης καμπύλης

Από ένα πυκνό διάλυμα BSA, ετοιμάζουμε 6 διαφορετικά πρότυπα διαλύματα με συγκεντρώσεις 1, 5, 10, 20, 30 και 40 mg/ml. Οι διαδοχικές αυτές αραιώσεις γίνονται σε απεσταγμένο νερό.

Παρασκευή Διαλυμάτων

Ετοιμασία των παρακάτω μητρικών διαλυμάτων:

A - 1% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

B - 2% K,Na-tartrate σε H_2O

C - 3% Na_2CO_3 σε 0,1 N NaOH

Τα παραπάνω διαλύματα είναι σταθερά για δύο περίπου μήνες.

Το διάλυμα Folin αγοράζεται έτοιμο (Sigma).

Ακριβώς πριν από την χρήση, παρασκευάζονται τα ακόλουθα δυο διαλύματα εργασίας:

D - Αποτελεί μίγμα των μητρικών διαλυμάτων A, B και C σε αναλογία 1 : 1 : 10.

E - Το αντιδραστήριο Folin αραιώνεται με απεσταγμένο νερό 1 : 1.

Διαδικασία

Όλοι οι προσδιορισμοί γίνονται δύο φορές, σε δοκιμαστικούς σωλήνες των 5 ml.

- Σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα, προστίθενται 200 μl ρυθμιστικού διαλύματος (τυφλό), πρότυπου διαλύματος ή αγνώστου δείγματος και ακολούθως 1 ml διαλύματος D.

- Ακολουθεί καλή ανακίνηση και επώαση για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, στο σκοτάδι.

- Προστίθεται 0,1 ml διαλύματος E, ανακινείται και επωάζεται 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, στο σκοτάδι.

- Η απορρόφηση μετράται στα 750 nm.

- Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης κρεατίνης των άγνωστων δειγμάτων γίνεται με σύγκριση της απορρόφησης τους, σε σχέση με την απορρόφηση της πρότυπης καμπύλης.

ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

Εμμεσος ανοσοφθορισμός

Αρχή της μεθόδου

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

Υλικά

- Αντιγόνο της *R. corydii* (στέλεχος Moroccan ATCC VR 141) που παρασκευάστηκε σύμφωνα με τις προηγούμενες τεχνικές

- IgG και IgM αντι-ανθρώπινα αντισώματα αίγας συζευγμένα με fluorescein isothiocyanate (Fluoline G και M αντίστοιχα, BioMerieux, France)

- Rheumatoid Factor absorbent για προσδιορισμούς IgM (Behring Mannheim, Germany)

- Γλυκερόλη (Fluorprep, BioMerieux, France)

- αιθανόλη 70%

- Ακετόνη

- Σκόνη μη λιπαρού γάλακτος
- διάλυμα **Phosphate Buffer Saline (PBS)**

NaCl	20,0 g
KCl	0,5 g
Na ₂ HPO ₄	2,87 g
KH ₂ PO ₄	0,5 g
Νερό qsp	2 l

Διαδικασία

- Οι πλάκες ανοσοφθορισμού εμβαπτίζονται σε αιθανόλη 70% για πέντε λεπτά και καθαρίζονται με μαλακή πετσέτα.
- Το αντιγόνο τοποθετείται στις πλάκες ανοσοφθορισμού με την βοήθεια λεπτής πένας.
- Ξήρανση.
- Το αντιγόνο σταθεροποιείται με εμβάπτιση των πλακών σε ακετόνη για δέκα λεπτά.
- Ξήρανση.
- Προετοιμάζονται διαδοχικές αραιώσεις των ορών με PBS εμπλουτισμένο με 3% σκόνη μη λιπαρού γάλακτος (PBS 3%).

Για προσδιορισμό IgG αρχική αραιώση 1 / 64

IgM 1 / 32

- Ειδικά για τον προσδιορισμό IgM οι αραιώσεις των ορών επωάζονται δέκα λεπτά με Rheumatoid Factor absorbent.
 - 20 μl κάθε αραιώσης τοποθετούνται στις υποδοχές των αντικειμενοφόρων πλακών.
 - Η πλάκα επωάζεται για τριάντα λεπτών στους 37°C με υγρασία.
 - Ακολουθούν δύο δεκάλεπτες πλύσεις με PBS και μία με νερό.
 - Ξήρανση.
 - Τα φθορίζοντα αντισώματα αραιώνονται (1 / 300) με την βοήθεια μίγματος Blue Evans (50 μl Blue Evans και 50 ml PBS 3%).
 - 20 μl κάθε αραιώσης τοποθετείται στις υποδοχές των αντικειμενοφόρων πλακών
 - Επώαση τριάντα λεπτών στους 37°C με υγρασία.
 - Ακολουθούν δύο δεκάλεπτες πλύσεις με PBS και μία με νερό.
 - Ξήρανση.
 - Προστίθενται μερικές σταγόνες γλυκερόλης στις πλάκες και επικαλύπτονται με καλυπτρίδα, αποφεύγοντας την δημιουργία φουσαλλίδων.
 - Διάβασμα των αποτελεσμάτων στο μικροσκόπιο ανοσοφθορισμού.
- Οι ρικέττιες φθορίζουν πράσινες.

Ανάλυση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου, παρουσία SDS (SDS-PAGE)

Για την πραγματοποίηση του Western blot στους ανθρώπινους ορούς είναι απαραίτητος ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών υψηλού MB (SPA) από τον ΛΠΣ με ηλεκτροφόρηση.

Σύμφωνα με την μέθοδο αυτή, επιτυγχάνεται διαχωρισμός των πρωτεϊνών με βάση τις διαφορές τους στο μέγεθος και το φορτίο τους, καθώς κινούνται κάτω από την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου, μέσα από τους πόρους πηκτής ακρυλαμίδιου. Αν ελαχιστοποιηθεί η επίδραση του μοριακού φορτίου, παρουσία SDS και β-μερκαπτοαιθανόλης, τότε η μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον υπολογισμό του μοριακού βάρους (MB) των πρωτεϊνών, εφόσον παράλληλα χρησιμοποιηθούν ως μάρτυρες πρωτεΐνες γνωστού MB. Πράγματι, όταν χρησιμοποιείται SDS επέρχεται μετουσίωση και διαχωρισμός των πρωτεϊνών στις αντίστοιχες υπομονάδες, καθώς και σύνδεση του SDS στα πεπτιδία αυτά με υδρόφοβους δεσμούς (1,4 g SDS ανά g πρωτεΐνης). Τα πεπτιδία που προκύπτουν φέρουν καθαρό

αρνητικό φορτίο σε pH 7,2 και η ηλεκτροφορητική τους κινητικότητα είναι αποκλειστικά συνάρτηση του MB των πεπτιδίων. Η πηκτή του πολυακρυλαμιδίου δημιουργείται με τον ταυτόχρονο πολυμερισμό του πολυακρυλαμιδίου και του Bis (30%:0,8%). Ο πολυμερισμός (μηχανισμός ελεύθερων ριζών) αρχίζει με την προσθήκη υπερθεϊτικού αμμωνίου και καταλύεται με την προσθήκη TEMED. Απαραίτητη είναι η ασαήρωση του διαλύματος αυτού πριν την προσθήκη του TEMED για να απομακρυνθεί το μοριακό οξυγόνο που παρεμποδίζει τον πολυμερισμό.

Διαλύματα

	<i>Tris pH 6.8</i>	<i>Tris pH 8.8</i>
Tris base	12.12 g	36.36 g
Νερό qsp	200 ml	200 ml

Το pH ρυθμίζεται με προσθήκη συμπυκνωμένου HCl πριν ο συνολικός όγκος φτάσει τα 200 ml.

	<i>44.08</i>	<i>30.08</i>
Ακρυλαμίδη	220 g	150 g
N, N' methylenbisacrylamide (bis)	4 g	4 g
Νερό qsp	500 ml	500 ml
	pH ≤ 7	

Τα διαλύματα φιλτράρονται και αποθηκεύονται σε σκοτεινόχρωμο φιαλίδιο στους 4°C για 2 μήνες.

	<i>Running Buffer</i>
Tris base	12.11 g (1.25 M)
Glycine	57.68 g (1.92 M)
	σε 500 ml νερό
SDS	4 g (0.1%)
Νερό qsp	4 l

Υπερθεϊκό αμμώνιο (Ammonium Persulfate) 10%

Υπερθεϊκό αμμώνιο	100 mg
Νερό qsp	1ml
Διατήρηση στους +4°C, μακριά από το φώς.	

Πηκτή διαχωρισμού

	4 gels για Western blot ορών (8%)
44.08	2.75 ml
Tris 1.5M pH 8,8	3.75 ml
Νερό	8.46 ml
Υπερθεϊκό αμμώνιο	420 μl
TEMED	23 μl

Πηκτή επιστοίβαξης (3.9%)

30.08	1ml
Tris 0,625M pH 6.8	2.5 ml
Νερό	6.4 ml

SDS	100 μl
Υπερθειικό αμμόνιο	100 μl
TEMED	10 μl

Αντιδραστήριο Laemmli (2x)

Διάλυμα Tris-base	1,52 g
Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)	2 g
2-mercaptoethanol	2 ml
Glycerol	20 ml
Μπλέ της βρομοφαινόλης	1 mg
Προσθήκη 40 ml νερό και ρύθμιση του pH στο 6.8	
Νερό qsp	100 ml

Διάλυμα χρωστικής Coomassie blue

Coomassie blue R250	0,25 g
Μεθανόλη	45 ml
Νερό	45 ml
Φιλτράρισμα με χαρτί Whatman No 1	
Glacial Acetic Acid	10 ml

Αποχρωματικό διάλυμα 1

Μεθανόλη	500 ml
Glacial Acetic Acid	100 ml
Νερό qsp	1 l

Αποχρωματικό διάλυμα 2

	50 ml
	70 ml
	1 l

Διαδικασία

- Τα τζάμια πλένονται με ζεστό νερό και σαπούνι και ξεπλένονται με αποιονισμένο νερό και στη συνέχεια με αλκοόλη.

- Συναρμολογείται το σύστημα των τζαμιών.

- Προετοιμάζονται τα διαλύματα.

- Μοιράζεται η πηκτή διαχωρισμού (πάντα σε κάθετη θέση) προσέχοντας να μην σχηματιστούν φυσαλίδες. Αφήνεται ικανό διάστημα για την εισαγωγή της πηκτής επιστοιβαζής (το ύψος της χτένας και ένα εκατοστό).

- Προστίθεται ισοβουτανόλη (για να εμποδισθεί το οξυγόνο να διαλυθεί και να διευκολυνθεί ο πολυμερισμός). Για πηκτή ≤8% αντί της ισοβουτανόλης χρησιμοποιείται διάλυμα ακρυλαμίδης 0.1% σε SDS.

- Η πηκτή τοποθετείται σε κάθετη θέση και παραμένει για πολυμερισμό (περίπου μισή ώρα).

- Μετά τον πολυμερισμό αφαιρείται η ισοβουτανόλη.

- Η επάνω επιφάνεια της πηκτής εκπλένεται με νερό ώστε να μετακινήσει η τυχόν μη πολυμερισμένη ακρυλαμίδα.

- Με την άκρη απορροφητικού χαρτιού απομακρύνεται το νερό.

- Μοιράζεται η πηκτή επιστοιβαζής (πάντα σε κάθετη θέση) και αμέσως τοποθετείται το χτένι προσέχοντας να μην σχηματιστούν φυσαλίδες.

- Αναμονή για τον πολυμερισμό (περίπου μισή ώρα).

- Μετά την ολοκλήρωση του πολυμερισμού προσεκτικά αφαιρείται η χτένα.

- Αμεσο πλύσιμο των πηγαδιών με νερό.

- Συναρμολογείται η συσκευή ηλεκτροφόρησης (Mini-Protean II, Bio-rad, Richmond, Ca, USA) και τοποθετείται η πηκτή. Πλένονται τα πηγάδια με προφυγμένο Running buffer.

- Το αντιγόνο ομογενοποιείται με σύριγγα Hamilton

- 100 μl αντιγόνου (1 mg / ml) αναμιγνύονται με ισόποσο διάλυμα Laemmli (1x).

- Το μίγμα ομογενοποιείται και μοιράζεται στο πηγάδι.

- Μοιράζονται 20 μl δεικτών MB στα αντίστοιχα πηγάδια (Low range prestained SDS-PAGE molecular weight standards, BioRad, Richmond, CA, USA).

Phosphorylase B	106,0 kDa
Bovine serum albumin	80,0 kDa
Ovalbumin	49,5 kDa
Carbonic anhydrase	32,5 kDa
Soybean trypsin inhibitor	27,5 kDa
Lysozyme	18,5 kDa

- Η ένταση ρυθμίζεται στα 10 mA ανά πηκτή.

- Όταν το κυανού της βρομοφαινόλης φθάνει στο τέλος της πηκτής, τερματίζεται η ηλεκτροφόρηση.

Western blot

Διαλύματα

Transfer Buffer

Tris base	12.11 g
Glycine	57.68 g
σε 500 ml νερό	
Methanol	800 ml
Νερό qsp	4 l

Διάλυμα TBS 5%

Merthiolate (0,1%)	4 g
Tris base 100 mM	46,6 g
NaCl	585 g
Νερό qsp	4 l

Ponceaux S

Ponceaux S (0.5%)	5 g
Οξικό οξύ (1%)	10 ml
Νερό qsp	1 l

Μεταφορά των πρωτεϊνών στα φύλλα νιτροκυτταρίνης (Transfer)

- Σε μπάνιο με transfer buffer τοποθετούνται με την ακόλουθη σειρά σπόγγος, χαρτί Whatman, πηκτή πολυακρυλαμίδης, νιτροκυτταρίνη (μέγεθος πόρου 0.5 μm), χαρτί Whatman και σπόγγος στον υποδοχέα της συσκευής Western blot (trans-blot cell, BioRad).

- Απομακρύνονται οι φυσαλίδες αέρα.

- Συναρμολογείται η συσκευή.

- Η ένταση ρυθμίζεται στο μέγιστο, ενώ η τάση στα 50 Volts για μια ώρα.

- Αποσυναρμολογείται η συσκευή.

- Σημειώνονται τα όρια της πηκτής πολυακρυλαμίδης στην νιτροκυτταρίνη.

- Η νιτροκυτταρίνη εμβαπτίζεται σε διάλυμα Ponceaux S για ένα λεπτό, ώστε να αποκαλυφθούν τα πρωτεϊνικά κλάσματα και μετά εκπλένεται με νερό.

- Η νιτροκυτταρίνη μεταφέρεται σε διάλυμα TBS με 5% μη λιπαρό γάλα, για την κάλυψη των μη ειδικών θέσεων προσρόφησης πρωτεϊνών.

- Αναδεύεται για 12 ώρες (overnight).
- Εκπλένεται τρεις φορές για 10' με νερό.
- Στεγνώνεται με απορροφητικό χαρτί και φυλάσσεται στους 4°C.

Western blot

Χρησιμοποιήθηκε η συσκευή Miniblotter MN28, Immunetics, USA. Η διαδικασία του Western blot που συνιστάται από τους κατασκευαστές επιτρέπει την ταυτόχρονη εξέταση 25 έως 50 ορών.

Βήματα εργασίας

- Τα φύλλα νιτροκυτταρίνης εμβαπτίζονται σε TBS με 3% μη λιπαρό γάλα και τοποθετούνται στην συσκευή.
- Οι οροί αραιώνονται (1:200) σε TBS με 3% μη λιπαρό γάλα και κατανέμονται στα κανάλια της συσκευής.
- Ακολουθεί επώαση με ανάδευση για μια ώρα σε ΘΔ.
- Τα διαλύματα απορρίπτονται και τα κανάλια πλένονται με TBS.
- Σε κάθε κανάλι προστίθενται 50 μl αντι-ανθρώπινης αιμοσφαιρίνης IgG συζευγμένης με υπεροξειδάση (Institut Pasteur, Production, Paris, France).
- Ακολουθεί επώαση με ανάδευση για μια ώρα σε ΘΔ.
- Τα διαλύματα απορρίπτονται και ακολουθούν πλύσεις των καναλιών με TBS.
- Η συσκευή αποσυρμαολογείται και μεταφέρεται η νιτροκυτταρίνη σε μάνιο με TBS.
- Παρασκευάζονται δύο αντιδραστήρια:
Αντιδραστήριο Α: διάλυση 30 mg 4-chloro-1-naphthol σε 10 ml methanol
Αντιδραστήριο Β: ανάμιξη 20 ml TBS με 12 μl υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂)
- Προστίθενται 4 ml του αντιδρ. Α στο αντιδρ. Β.
- Απορρίπτεται το TBS και προστίθεται το υπόστρωμα.
- Μετά την εμφάνιση των μαντών η αντίδραση διακόπτεται με πλύσεις νερού.
- Τα φύλλα νιτροκυτταρίνης ξηραίνονται ανάμεσα σε απορροφητικό χαρτί και παρατηρούνται τα αποτελέσματα.

Ευαισθησία, ειδικότητα, θετική και αρνητική διαγνωστική αξία του ΑΦ

(Τριχόπουλος 1982)

Η ευαισθησία, η ειδικότητα και η διαγνωστική αξία συχνά χρησιμοποιούνται για να αξιολογηθούν οι διαγνωστικές δυνατότητες των ορολογικών δοκιμασιών. Ουσιαστικά όμως είναι παράμετροι πιθανότητας.

Ευαισθησία (sensitivity) είναι η αναλογία των αληθώς θετικών (ΑΘ) αποτελεσμάτων στο σύνολο των προσιμπτωματικών ασθενών, ή σε μαθηματική έκφραση, η πιθανότητα ενός θετικού αποτελέσματος όταν η παρουσία προσιμπτωματικής νόσου είναι δεδομένη. Ο υπολογισμός της γίνεται ως εξής:

$$\text{Ευαισθησία} = \text{ΑΘ} : (\text{ΑΘ} + \Psi\text{Α})$$

όπου **ΑΘ**: Αληθώς Θετικά αποτελέσματα είναι οι οροί που βρέθηκαν θετικοί με τον ΑΦ και περιείχαν αντισώματα έναντι των SPA

και **ΨΑ**: Ψευδώς Αρνητικά αποτελέσματα είναι οι οροί που βρέθηκαν αρνητικοί με τον ΑΦ και περιείχαν αντισώματα έναντι των SPA

Ειδικότητα (specificity) είναι η αναλογία των αληθώς αρνητικών (ΑΑ) αποτελεσμάτων στο σύνολο των εξετασθέντων που δεν πάσχουν από τη νόσο, ή σε μαθηματική έκφραση, η πιθανότητα ενός αρνητικού αποτελέσματος όταν η απουσία της

νόσου είναι δεδομένη. Ο υπολογισμός της γίνεται ως εξής:

$$\text{Ειδικότητα} = \frac{AA}{(AA + \Psi\Theta)}$$

όπου **AA**: Αληθώς Αρνητικά αποτελέσματα είναι οι οροί, που βρέθηκαν αρνητικοί με τον ΑΦ και δεν περιείχαν αντισώματα έναντι των SPA

και **ΨΘ**: Ψευδώς Θετικά αποτελέσματα είναι οι οροί που βρέθηκαν θετικοί με τον ΑΦ και δεν περιείχαν αντισώματα έναντι των SPA

Θετική διαγνωστική αξία (ΘΔΑ, positive predictive value) είναι η αναλογία των αληθώς θετικών (ΑΘ) αποτελεσμάτων στο σύνολο των θετικών αποτελεσμάτων της δοκιμασίας διαλογής, ή σε μαθηματική έκφραση, η πιθανότητα ύπαρξης της νόσου όταν υπάρχει θετικό αποτέλεσμα στην αντίστοιχη δοκιμασία διαλογής. Ο υπολογισμός της γίνεται ως εξής:

$$\Theta\Delta\Lambda = \frac{A\Theta}{(A\Theta + \Psi\Theta)}$$

Αρνητική διαγνωστική αξία (ΑΔΑ, negative predictive value) είναι η αναλογία των αληθώς αρνητικών (ΑΑ) αποτελεσμάτων στο σύνολο των αρνητικών αποτελεσμάτων της δοκιμασίας διαλογής, ή σε μαθηματική έκφραση, η πιθανότητα απουσίας της νόσου όταν υπάρχει αρνητικό αποτέλεσμα στην αντίστοιχη δοκιμασία διαλογής. Ο υπολογισμός της γίνεται ως εξής:

$$\Lambda\Delta\Lambda = \frac{A\Lambda}{(A\Lambda + \Psi\Lambda)}$$

Ο προσδιορισμός των ΨΘ και ΨΑ βασίσθηκε στα αποτελέσματα της δοκιμασίας Western blot. Η αναφορά στην μέθοδο αυτή στηρίζεται στην δυνατότητα ανίχνευσης των ειδικών πρωτεϊνών 115- και 135-kDa που θεωρούνται παθολογιογονικές για την *R. conorii*. Οι υπολογισμοί των παραπάνω μεγθών πραγματοποιήθηκαν με βάση τον ακόλουθο πρότυπο πίνακα :

ΑΦ	SPA+LPS		Σύνολο
	+	-	
+	AΘ	ΨΘ	AΘ+ΨΘ
-	ΨΑ	ΑΑ	ΑΑ+ΨΑ
Σύνολο	AΘ+ΨΑ	ΑΑ+ΨΘ	

ΜΕΡΟΣ ΔΕΥΤΕΡΟ

Εκτός από την μελέτη των ορών έγινε προσπάθεια απομόνωσης ρικετσιών από τους κρότωνα της περιοχής. Οι κρότωνα συλλέχθηκαν, ταξινομήθηκαν και εξετάστηκαν για την ύπαρξη ρικετσιών με την δοκιμασία της αιμολέμφου και το PCR. Παράλληλα με την ανίχνευση έγινε και προσπάθεια απομόνωσης με την τεχνική των shell-vial. Η ταυτοποίηση των απομονωθέντων στελεχών έγινε με σύγκριση της πρωτεϊνικής (SDS-PAGE) και αντιγονικής (Western blot) κατατομής. Τέλος ταξινομήθηκε με τεχνικές μοριακής βιολογίας (PCR-RFLP και PFGE).

ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΡΟΤΩΝΩΝ

Τον Μάιο του 1992, συλλέχθηκαν 242 κρότωνα από κατοίκους, πρόβατα και σκύλους του νομού Φωκίδας. Η μελετούμενη περιοχή συμπεριλάμβανε τα χωριά Λευκαδίτι, Βουνιχώρα, Μακρυνή, Αμυδαλιά, Μαλανδρίνο και Πεντάπολη, με τοπική μεσογειακή χλωρίδα. Το υψόμετρο κυμαίνεται από 400 έως 700 μ.

ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΤΩΝ ΚΡΟΤΩΝΩΝ

Τα ταξινομικά κλειδιά των Morel and Vassiliadis (Morel & Vassiliadis, 1962) χρησιμοποιήθηκαν για τον διαχωρισμό των *Rh. sanguineus* ενώ οι αλγόριθμοι του Παπαδόπουλος (Papadopoulos 1990) για τα *Rh. bursa*.

ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ

Τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης της DNA πολυμεράσης (PCR)

Αρχή της μεθόδου

Το PCR είναι εργαστηριακή μέθοδος σύνθεσης νουκλεϊνικών οξέων κατά την οποία αντιγράφεται ένα συγκεκριμένο τμήμα του DNA (Saiki et al, 1988).

Σε γενικές γραμμές μμεταί τον φυσιολογικό μηχανισμό της αντιγραφής στο κύτταρο. Η μέθοδος περιλαμβάνει δύο ολιγονουκλεοτιδικούς εναρκτές, οι οποίοι προσδένονται στα άκρα του τμήματος του DNA που θα αντιγραφεί, και επαναλαμβανόμενους κύκλους πολ/μού του DNA. Κάθε κύκλος περιλαμβάνει τρία βήματα (βλ. σχήμα επόμενης σελ.):

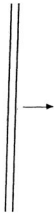
1) Θερμική μετουσίωση του DNA, η οποία επιτρέπει την αποδιάταξη του δίκλωνου μορίου του DNA με την επίδραση 95°C για 20".

2) Προσαρμογή των εναρκτών με την αλληλουχία-στόχο του DNA σε χαμηλή θερμοκρασία (48°C) για 30".

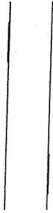
3) Επμήκυνση των εναρκτών με την επίδραση της Taq πολυμεράσης και σύνθεση των συμπληρωματικών αλυσίδων του DNA με προσαρμογή των συμπληρωματικών βάσεων.

Στο τέλος του κύκλου η ποσότητα του DNA έχει πολλαπλασιαστεί με τον παράγοντα 2 μετά από *n* κύκλους έχει πολ/στεί κατά 2^{*n*}, δηλ. πάνω από 10⁹ μετά από 30 κύκλους, ένας αριθμός που χρησιμοποιείται συχνά. Το μέγεθος του αναπαραχθέντος τμήματος

Δίκλωνο DNA



ΜΕΤΟΥΣΙΩΣΗ



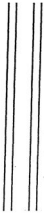
ΥΒΡΙΔΟΠΟΙΗΣΗ



ΕΠΙΜΗΚΥΝΣΗ



2 μόρια δίκλωνου DNA



ΑΡΧΗ ΜΕΘΟΔΟΥ
ΤΗΣ
ΤΕΧΝΙΚΗΣ
ΑΛΥΣΙΑΩΤΗΣ
ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ
ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ
(PCR)

ανιχνεύεται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης και χρωματίζεται με βρομιούχο αιθιδίο.

Σε όλους τους πολλαπλασιασμούς, εκτός των δειγμάτων, συστηματικά χρησιμοποιείται ένας αρνητικός μάρτυρας (χωρίς DNA), ένας κυτταρικός μάρτυρας (μη μολυσμένα κύτταρα L929) και ένας θετικός μάρτυρας (*R. conorii* στέλεχος Moroccan).

Ο αρχικός έλεγχος των κρότάνων έγινε με την χρήση του ζεύγους εναρκτηών *RpCS.877p* και *RpCS.1258n*, οι οποίοι κωδικοποιούν μια αλληλουχία 381 ζευγών βάσεων του γενώματος της κυτταρικής συνθάσης της *R. prowazekii* με στόχο την ανίχνευση κάθε είδους ρικέτσιας. Οι συγκεκριμένοι εναρκτές φαίνεται να πολλαπλασιάζουν όλες τις ρικέτσιες εκτός της *R. tsutsugamushi*, της *E. coli* και των ειδών *Mycoplasma* (Regnery et al., 1991).

Στους κρότάνες, που βρέθηκαν με τον πρώτο πολλαπλασιασμό θετικοί, έγινε στη συνέχεια ανίχνευση ρικετσιών με τους εναρκτές *R190.70p* και *R190.602n*, οι οποίοι κωδικοποιούν μια αλληλουχία 532 ζευγών βάσεων του γενώματος του 190-kDa αντιγόνου της *R. rickettsii*. Με τους παραπάνω εναρκτές πολλαπλασιάζονται όλες οι ρικέτσιες της ΟΚΠ εκτός των *R. akari* και *R. australis* (Regnery et al., 1991).

Εναρκτές	Είδος	Γένωμα	Αλληλουχία (5'-3')	Μήκος bp
<i>RpCS.877p</i>	<i>R. prowazekii</i>	Citrate synthase	GGGGCCCTGCTCAGGGCGG	381
<i>RpCS.1258n</i>	<i>R. prowazekii</i>	Citrate synthase	ATTGCAAAAAGTACAGTGΔACA	381
<i>R190.70p</i>	<i>R. rickettsii</i>	190-kDa antigen	ATGGCGAATATTCTCCAAAA	532
<i>R190.602n</i>	<i>R. rickettsii</i>	190-kDa antigen	AGTGCAGCATTCGCTCCCCCT	532

Υλικά

- συσκευή PCR θερμοκυκλωτή (PREM III, Lep Scientific, Flobio, Courbevoie, France)
- θάλαμος νηματικής ροής
- στείρα μικροσωληνάρια (Sarstedt)
- θήκη μικροσωληναρίων
- Ρυθμιζόμενες μικροπιπέτες αποκλειστικής χρήσης στο PCR
- Ρύγχη μικροπιπετών

Αντιδραστήρια

- Στείο απεσταγμένο νερό
- Ταq πολυμεράση (5,000 U / ml, Promega, USA)
- Mg-free ρυθμιστικό διάλυμα (10x) για την Ταq πολυμεράση (Promega, USA)
- MgCl₂ (Promega, USA)
- Νουκλεοτίδια με τα ανάλογα ρυθμιστικά διαλύματα (dNTPs, Boehringer Mannheim)

dATP	20 μl
dCTP	20 μl
dGTP	20 μl
dTTP	20 μl
Νερό	920 μl

Διατήρηση στους -20°C.

- Ολιγονουκλεοτιδικοί εναρκτηρες, σε υδατικό διάλυμα (βλ. πίν. προηγούμενης σελ.).
- μη μολυσμένα κύτταρα L929
- *R. conorii* Moroccan strain
- δείγματα
- παραφινέλαιο

Διαδικασία

- Οι κρότνες αποψύχονται και εμβαπτίζονται σε 1 ml θρεπτικού υλικού (4% FCS), κάτω από στείρες συνθήκες. Συνθλιβονται, ομογενοποιούνται και το ελαιώδη διαχωρίζεται. Η μισή ποσότητα χρησιμοποιείται για τον γενωμικό πολλαπλασιασμό, ενώ η υπόλοιπη φυλάσσεται στους -80°C (για πιθανή απομόνωση).

- Τα δείγματα πλένονται 3 φορές με απεσταγμένο νερό με φυγοκέντρηση (17.500 x g για 5 λεπτά στους +4°C).

- Το υπερκείμενο απορρίπτεται και επαναδιαλυτοποιείται σε 1 ml νερό. Μετά την τελευταία φυγοκέντρηση επαναδιαλυτοποιείται σε 100 μl.

- Τα δείγματα βράζονται σε υδατόλουτρο για 10 λεπτά. Τοποθετούνται σε πάγο μέχρι την νέα χρήση.

- Οι παρακάτω χειρισμοί γίνονται σε θάλαμο νηματικής ροής με υλικά και αντιδραστήρια αποκλειστικής χρήσης, ώστε να μειωθεί ο κίνδυνος μόλυνσης από εξωγενές DNA.

- Τοποθέτηση των μικροσωληναρίων στη θήκη και σήμανσή τους.

- Προετοιμάζεται το μείγμα αντίδρασης:

Απεσταγμένο νερό	55,5 μl
MgCl ₂ 25mM	4 μl
Mg-free Ταq buffer 10x (Promega, USA)	10 μl
διάλυμα dNTPs	10 μl
Εναρκτης αρ. 1 (positive)	5 μl
Εναρκτης αρ. 2 (negative)	5 μl

- Ταq πολυμεράση 0,5 μl
- Αναμιγνύονται 90 μl μίγματος αντίδρασης με 10μl δείγματος.
 - Για όλους τους πολ/μούς απαιτείται συστηματική πρόβλεψη ενός σωλήνα αρνητικού μάρτυρα (νερό), ενός κυτταρικού μάρτυρα (L929) και ενός θετικού μάρτυρα (*R. coryli*).
 - Τοποθετούνται 4 σταγόνες παραφίνης σε κάθε σωλήνα.
 - Εναποτίθενται οι σωλήνες στην συσκευή PCR, εξασφαλίζοντας καλή επαφή ανάμεσα στους σωλήνες και τον θερμικό υποδοχέα με μια σταγόνα παραφίνης.
 - Προγραμματίζεται η συσκευή για 15 κύκλους. Κάθε κύκλος συνίσταται από 3 βήματα:
 - 95°C για 20 δευτερόλεπτα (μετουσίωση)
 - 48°C για 30 δευτερόλεπτα (στερέωση των εναρκτηίων)
 - 60°C για 2 λεπτά (επέκταση)
 - Προστίθενται 0,5 μl Ταq πολυμεράση (5,000 U / ml).
 - Πραγματοποιούνται 15 νέοι κύκλοι όπως παραπάνω.
 - Στο τέλος του πολ/μου, τα προϊόντα συντηρούνται στους +4°C μέχρι να επιβεβαιωθεί η επιτυχία του πολλαπλασιασμού με την ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης.

Επιβεβαίωση του πολλαπλασιασμού σε πηκτή αгарόζης

(Maniatis et al., 1990).

Η επιτυχία και η ειδικότητα του πολλαπλασιασμού επιβεβαιώνονται σε πηκτή αгарόζης. Η επιτυχία και η ειδικότητα εκτιμάται συγκρίνοντας τις κατατομές των δειγμάτων με τους δείκτες των μοριακών βαρών και την κατατομή του θετικού μάρτυρα. Ο βαθμός διαχωρισμού του DNA στην πηκτή αгарόζης εξαρτάται από τους παρακάτω παράγοντες:

- Τη συγκέντρωση της πηκτής αгарόζης

Ένα τμήμα DNA σταθερού μεγέθους παρουσιάζει διαφορετική ηλεκτροφορητική κινητικότητα μέσω πηκτών με διαφορετική συγκέντρωση αгарόζης. Υπάρχει μια αναλογική σχέση μεταξύ της ηλεκτροφορητικής κινητικότητας του DNA (μ) και της συγκέντρωσης της πηκτής αгарόζης (x) : $\log \mu = \log \mu_0 - k \cdot x$, όπου μ_0 είναι η ελεύθερη ηλεκτροφορητική κινητικότητα του DNA. Έτσι ο διαχωρισμός τμημάτων DNA, με μεγάλη διαφορά μεγέθους μεταξύ τους, καθίσταται δυνατός με την χρήση πηκτών διαφορετικής συγκέντρωσης αгарόζης.

- Τη δομή του DNA

Μόρια κυκλικού και ευθύγραμμου DNA τα οποία έχουν το ίδιο MB παρουσιάζουν διαφορετική ηλεκτροφορητική κινητικότητα μέσω πηκτών της ίδιας συγκέντρωσης αгарόζης όταν η ηλεκτροφόρηση γίνεται με το ίδιο διάλυμα και εφαρμόζεται η ίδια τάση ηλεκτρικού πεδίου.

- Την τάση του ηλεκτρικού πεδίου

Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα των μορίων του DNA αυξάνεται αναλογικά με την αύξηση της τάσης του ηλεκτρικού πεδίου. Ωστόσο, με μεγάλη αύξηση της τάσης, η ηλεκτροφορητική κινητικότητα του DNA δεν μεταβάλλεται αναλογικά. Η βέλτιστη ανάλυση τμημάτων DNA επιτυγχάνεται με εφαρμογή τάσης ίσης με 5V/cm πηκτής αгарόζης.

- Το διάλυμα ηλεκτροφόρησης

Ενα μόριο DNA έχει διαφορετική ηλεκτροφορητική κινητικότητα μέσω πηκτών αгарόζης όταν χρησιμοποιείται διαφορετικής ιονικής ισχύος διάλυμα ηλεκτροφόρησης.

Έτσι, το ίδιο μέρος DNA αναλύεται περισσότερο όταν χρησιμοποιείται διάλυμα TAE 1x (Tris-acetate/EDTA) αντί διαλύματος TBE 1x (Tris-borate/EDTA) σαν διάλυμα ηλεκτροφόρησης (οι άλλοι παράγοντες παραμένουν σταθεροί).

Υλικά

- Ζυγός
- Φοβρνος μικροκυμάτων
- Μη στείρες πιπέτες
- Πλαστική λεκάνη για χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο
- Αναδευτήρας
- Πηγή φωτός UV
- Φωτογραφική συσκευή και φίλμ Polaroid τύπου 667 θετικό/αρνητικό

Αντιδραστήρια

- αγαρόζη ηλεκτροφόρησης (BRL, Gaithersburg, MD)
- βρωμιούχο αιθίδιο (Ethidium Bromide, EtBr)
- Διάλυμα χρωστικής (loading buffer) 6x:

κυανό της βρωμοφαινόλης	0.25%
κυανό του ξυλενίου	0.25%
γλυκερίνη v/v	30%
νερό qsp	
- ρυθμιστικό διάλυμα TBE 10x:

Tris base	54 g
Βορικό οξύ	27,5 g
0,5M EDTA pH 8.0	20 ml ή EDTA 3,7224 g
νερό qsp	1 lt

Αποστείρωση με αυτόκαυστο. Διατηρείται σε ΘΔ σε υάλινα μπουκάλια.

- Διάλυμα ηλεκτροφόρησης:

10x TBE	50 ml
Νερό qsp	500 ml
- Δείκτες μοριακού βάρους DNA molecular weight marker VI (Boehringer Mannheim).

Διαδικασία

- Προετοιμάζεται το διάλυμα αγαρόζης:

αγαρόζη	1,5 g
TBE 1x qsp	100 ml
- Η αγαρόζη διαλυτοποιείται με βρασμό.
- Παραμονή της σε θερμοκρασία δοματίου μέχρι να φτάσει περίπου τους +40°C.
- Το διάλυμα αγαρόζης προστίθεται στο εκμαγείο της συσκευής ηλεκτροφόρησης όπου αφήνεται να πήξει (περίπου 45 λεπτά).
- Προετοιμασία ενός αριθμημένου σωληναρίου για κάθε προϊόν πολλαπλασιασμού καθώς και ενός για τους δείκτες μοριακών βαρών.
- Τοποθετούνται 2 μl διαλύματος χρώσης σε κάθε σωλήνα, ενώ στη συνέχεια 10 μl του προϊόντος πολ/μου στον αντίστοιχο σωλήνα.
- Η πηκτή τοποθετείται στην συσκευή ηλεκτροφόρησης. Προσεκτικά αποσύρεται η χτένα, έχοντας προσθέσει μικρή ποσότητα διαλύματος ηλεκτροφόρησης.
- Προστίθεται το υπόλοιπο διάλυμα.

- Τοποθετούνται τα δείγματα στις κυψελίδες της πηκτής.
- "Προ-τρέξιμο" 10 λεπτά στα 50 Volts.
- "Τρέξιμο" 1 ώρα στα 100 Volts.
- Η πηκτή μεταφέρεται σε "μπάνιο" με TBE 1x και EtidBr (0,5 µg / ml) για 30 λεπτά.
- Τοποθετείται σε πηγή υπεριώδους ακτινοβολίας (UV).
- Φωτογραφίζεται με μηχανή Polaroid για την παρατήρηση των αποτελεσμάτων.

Ο αρνητικός μάρτυρας πρέπει να είναι κενός.

Ο θετικός μάρτυρας πρέπει να περιέχει μια μοναδική μπάντα μοριακού βάρους 381 ζευγών βάσεων σε πολ/μό του γενόματος της κιτρικής συνθήσης, και 532 ζευγών βάσεων σε πολ/μό του γενόματος του αντιγόνου 190-kDa. Κάθε επιτυχημένος πολ/μός εμφανίζει όμοια μπάντα με αυτή του θετικού μάρτυρα.

Δοκιμασία αιμολέμφου

Οι ρικέτσιες βρίσκονται στα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου του κρότωνα και κυκλοφορούν στην αιμόλεμφο του. Με την σύνθλιψη του κρότωνα και την βοήθεια της χρώσης Gimenez είναι δυνατή η ανίχνευση των κυκλοφορούντων ρικετσιών.

Υλικά

- Θάλαμος νηματικής ροής
- δυο στείρες λαβίδες
- ψαλίδι
- αντικειμενοφόρες πλάκες 30 πηγαδιών
- στείρο απορροφητικό χαρτί
- στείρο νερό

Αντιδραστήρια

- διάλυμα απολύμανσης:	βαφή ιωδίου	12 ml
	αιθυλενογλυκόλη	6 ml
	αιθανόλη 70% qsp	1 lt

Διαδικασία

Εργασία σε θάλαμο νηματικής ροής.

- ο κρότωνας απολυμαίνεται με την εμβάπτισή του σε δ/μα απολύμανσης για 10 λεπτά, κατόπιν σε στείρο νερό δύο φορές. Στο τέλος στεγνώνεται με στείρο απορροφητικό χαρτί μέσα σε τριβλίο.

- Κρατώντας τον κρότωνα με την λαβίδα, κόβεται το πρώτο αριστερό πόδι στην μεσαία άρθρωση ώστε να απελευθερωθεί μια σταγόνα αιμολέμφου.

- Η σταγόνα αιμολέμφου τοποθετείται πάνω στο πηγάδι της αντικειμενοφόρου πλάκα, ενώ ο κρότωνας φυλάσσεται σε στείρο σωληνάριο στους -80°C.

- Εφαρμόζεται η χρώση Gimenez στην αντικειμενοφόρο πλάκα.

- Οι ρικέτσιες εμφανίζονται ροζ σε πράσινο κυτταρικό φόντο.

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΡΙΚΕΤΣΙΩΝ ΑΠΟ ΤΗΝ ΑΙΜΟΛΕΜΦΟ ΚΡΟΤΩΝΩΝ

Η τεχνική των shell-vial

(Peter et al, 1990)

Παράλληλα με την δοκιμασία της αιμολέμφου έγινε προσπάθεια απομόνωσης των ρικετσιών από τους κρότωνες. Η τεχνική συνίσταται σε φυγοκέντρηση της αιμολέμφου κάθε κρότωνα πάνω σε μια στοιβάδα κυττάρων L929. Η κυτταρική σειρά βρίσκεται πάνω σε ένα μικρό υάλινο δίσκο, μέσα σε σωλήνα φυγοκέντρησης τύπου shell-vial (Marrero & Raoult 1989).

Προετοιμασία κυτταρικής σειράς στα shell-vial

Υλικά

- στείροι σωλήνες φυγοκέντρησης (shell-vial), επίπεδου πυθμένα, 3,7 ml (Sterilin, Feltham, U.K.)

Διαδικασία

- Καλιεργείται η επιθυμητή κυτταρική σειρά σε φιάσκα των 75 cm² σύμφωνα με το πρωτόκολλο της σελ. 55.
- Θρυψινοποιείται η φιάσκα με τα κύτταρα.
- Συλλέγεται το κυτταρικό εναιώρημα σε 45 ml MEM και ομογενοποιείται.
- Διανέμεται σε κάθε shell-vial 1 ml κυτταρικού υλικού.
- Το καπάκι του shell-vial αφήνεται μισή στροφή ανοιχτό.
- Τα shell-vial επωάζονται σε κλίβανο 37°C, 5% CO₂.

Πρωτόκολλο απομόνωσης

Υλικά

- στείροι σωλήνες φυγοκέντρησης (shell-vial), επίπεδου πυθμένα, 3,7 ml (Sterilin, Feltham, U.K.)
- φυγοκέντρος Heraeus, Minifuge RF, rotor 2150
- θάλαμος νηματικής ροής
- επωαστικοί κλίβανοι 32°C και 37°C, 5% CO₂
- υδατόλουτρο 37°C
- μικροσκόπιο ανάστροφης φάσης
- στείρες πιπέτες 1 και 5 ml
- στείρες λαβίδες

Αντιδραστήρια

- κύτταρα L929 σε συνεχή μονοστοιβάδα
- θρεπτικό υλικό (MEM) φιλτραρισμένο από φίλτρο με διάμετρο πόρων 0,22 μm
- αιματούχο άγαρ
- brain heart infusion (BHI)

Διαδικασία

Εργασία σε θάλαμο νηματικής ροής.

- Τρεις ημέρες πριν από τον ενοφθαλμισμό, προετοιμασία των κυττάρων L929 στα shell-vial (δύο για κάθε κρότωνα).

- Την ημέρα ενοφθαλμισμού, επιβεβαιώνεται η συνέχεια του κυτταρικού τάπητα με μικροσκόπιο ανάστροφης φάσης.

- Τοποθέτηση των υλικών στο υδατόλουτρο 37°C.

- Κόβεται το μπροστά αριστερό πόδι του κρότωνα ώστε να απελευθερωθεί αιμόλεμος.

- Τοποθετείται η σταγόνα της αιμολέμμου σε 300 μl BHI και αναμειγνύεται.

- Απορρίπτεται το υπερκείμενο από 2 shell-vial με L929.

- Μεταφέρονται 150 μl του μίγματος αιμολέμμου/BHI σε κάθε shell-vial.

- Φυγοκέντρηση των shell-vial για μια ώρα, στα 700 g και 18°C.

- Απορρίπτεται το υπερκείμενο.

- Προστίθεται 1 ml θρ. υλικού 4% σε κάθε shell-vial.

- Έλεγχος στεριότητας με ενοφθαλμισμό μιας σταγόνας θρεπτικού υλικού σε αιματούχο, που επωάζεται στους 37°C.

- Τα shell-vial επωάζονται σε κλίβανο 32°C.

Μετά την καλλιέργεια της αιμολέμμου των κροτώνων σε L929 κύτταρα, η επιτυχία της απομόνωσης ελέγχεται με χρώση Gimenez κάθε 6 ημέρες. Όταν ανιχνευθούν ρικετίαιες τότε προχωρούμε στην θρυψινοποίηση του shell-vial.

Θρυψινοποίηση των θετικών shell-vial

Υλικά

-Rinaldini

- θρυψίνη

-θρεπτικό υλικό 10%

Διαδικασία

- Απορρίπτεται το υπερκείμενο του shell-vial.

- Το shell-vial πλένεται με Rinaldini.

- Προστίθεται 0,2 ml θρυψίνης.

- Ακολουθεί επώση λίγων λεπτών στους 37°C.

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

- Προστίθεται 0,8 ml θρεπτικού υλικού 4%.

- Το εναιώρημα μεταφέρεται σε φιάσκα των 25 cm², που περιέχει 5 ml θρεπτικού υλικού 4%.

- Η φιάσκα επωάζεται στους 32°C.

Η ανίχνευση των ρικετιών ελέγχεται με την χρώση Gimenez. Ακολουθεί καλλιέργεια του στελέχους σύμφωνα με την μέθοδο κυτταροκαλλιέργειας που περιγράφηκε στο πρώτο μέρος.

ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ

Το στέλεχος που απομονώθηκε καλλιεργήθηκε σε μεγάλες ποσότητες σύμφωνα με τις μεθόδους που αναφέρθηκαν στο κεφάλαιο της παραγωγής του αντιγόνου. Ακολούθησε ο καθαρισμός του με στόχο την ταυτοποίηση του σύμφωνα με την μέθοδο του Philip και την ανάλυση των πρωτεϊνών με SDS-PAGE. Παράλληλα εξετάστηκαν οι ανοσογόνες πρωτεΐνες με την βοήθεια του Western blot, αφού παρήχθησαν οι κατάλληλοι αντιοροί. Τέλος το στέλεχος ταυτοποιήθηκε με PCR και PFGE.

Η ίδια μεθοδολογία ακολουθήθηκε για τα στελέχη αναφοράς *R. conorii* (Moroccan strain), Israeli tick typhus ή "*R. israelii*" και "*R. massilia*".

Ανοσοποίηση ποντικών για την παραγωγή ορών

- 0.1 ml μολυσμένων κυττάρων (10^3 με 10^4 PFU) με το επιθυμητό ρικετσιακό στέλεχος ενοφθαλμίζονται ενδοφλέβια (φλέβα της ουράς) σε τέσσερα Swiss Webster ποντίκια την ημέρα 0 και 7.

- Την δέκατη ημέρα χορηγείται αναισθητικό δηλ.

Ketamine (Imalgene ¹⁰⁰⁰ , Rhône-Mérieux)	25%
Xylazine 2% (Rompun, Bayer)	50%
Ενέσιμο νερό	25%

- Γίνεται αφαιμάξη από την καρδιά και το αίμα συλλέγεται σε erpendorf.

- Φυγοκέντρηση 12.000 στρ / 7' / 4°C.

Ο ορός συλλέγεται και φυλάσσεται στους -20°C.

Ανάλυση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου, παρουσία SDS (SDS-PAGE)

Στην προκειμένη περίπτωση η σύγκριση των πρωτεϊνών του υπό ταυτοποίηση στελέχους με άλλα πρότυπα στελέχη συμβάλουν στην ταυτοποίηση του άγνωστου στελέχους.

Η **πηκτή διαχωρισμού (7.5%)** παρασκευάζεται όπως παρακάτω:

44.08	2.5 ml
Tris 1.5M pH 8.8	2.5 ml
Νερό	5.0 ml
SDS 10%	100 μl
Υπερθειικό αμμώνιο	200 μl
TEMED	10 μl

Η **προετοιμασία του αντιγόνου** γίνεται ως εξής:

- Το αντιγόνο (1 mg/ml) μεταφέρεται από τους -20°C σε ΘΔ.

- Τοποθετείται 16 ml αντιγόνου σε μικρό erpendorf.

- Φυγοκέντρηση 12000 στρ / 10' / 4°C με φρένο.

- Απομακρύνεται το υπερκείμενο με την βοήθεια πιπέτας.

- Προστίθεται 16 ml διαλύματος Laemmli (1x) και ομογενοποιείται.

- Μοιράζεται 9 ml του μείγματος σε κάθε πηγάδι.

- Μοιράζεται 8 ml δεικτών MB (High range prestained SDS-PAGE molecular weight standards, BioRad, Richmond, CA, USA)

Myosin	205,0 kDa
β-galactosidase	116,5 kDa
Bovine serum albumin	80,0 kDa
Ovalbumin	49,5 kDa

Μεταφορά των πρωτεϊνών στα φύλλα νιτροκυτταρίνης (Transfer)

Η μεταφορά των πρωτεϊνών του πηκτώματος σε φύλλα νιτροκυτταρίνης γίνεται όπως προηγούμενα αναφέρθηκε (σελ. 64).

Western blot των ορών ποντικού

- Τα φύλλα νιτροκυτταρίνης εμβαπτίζονται σε TBS με 3% μη λιπαρό γάλα.
- Αραιώνονται (1:150) οι οροί έναντι των στελεχών σε TBS με 3% μη λιπαρό γάλα και προστίθενται στον υποδοχέα με τα φύλλα νιτροκυτταρίνης.
- Επικιάζονται με ανάδευση για δύο ώρες σε ΘΔ.
- Απορρίπτονται τα υπερκείμενα και ακολουθούν πλύσεις με TBS.
- Προσθήκη peroxidase-conjugated affinitypure goat anti-mouse IgG+IgM (H+L) (Jackson ImmunoResearch Lab., USA).
- Επικιάζονται με ανάδευση για δύο ώρες σε ΘΔ.
- Απορρίπτονται τα υπερκείμενα και ακολουθούν πλύσεις με TBS.
- Αποσυναρμολογείται η συσκευή και μεταφέρονται τα φύλλα της νιτροκυτταρίνης σε μπάνιο με TBS.
- Απορρίπτεται το TBS και προστίθεται κατάλληλο ενζυμικό υπόστρωμα:

4-chloronaphthol	0.015%
hydrogen peroxide	0.015%
methanol	16.7%
TBS	qsp
- Μετά την εμφάνιση των μαντλών διακόπτεται η αντίδραση με πλύσεις νερού.
- Τα φύλλα νιτροκυτταρίνης ξηραίνονται ανάμεσα σε απορροφητικό χαρτί και παρατηρούνται οι υπάρχουσες πρωτεϊνικές μνάντες.

Εμμεσος ανοσοφθορισμός ορών ποντικού

Υλικά

- Αντιγόνο της "*R. massilia*" και ελληνικού στελεχούς (ΕΣ)
- Ολικά (IgG και IgM (H και L)) αντι-ποντικού αντισώματα αίγας συζευγμένα με φλουορεσίνη (Fluorescein (DTAF)-conjugated affinitypure goat anti-mouse IgG+IgM (H+L), Jackson ImmunoResearch Lab., USA)
- Γλυκερόλη (Fluorgerp, BioMerieux, France)
- αιθανόλη 70%
- Ακετόνη
- διάλυμα Phosphate Buffer Saline (PBS)

Διαδικασία

- Οι πλάκες ανοσοφθορισμού εμβαπτίζονται σε αιθανόλη 70% για πέντε λεπτά και καθαρίζονται με μαλακή πετσέτα.
- Το αντιγόνο τοποθετείται στις πλάκες ανοσοφθορισμού με την βοήθεια λεπτής πένα.
- Ξήρανση.
- Σταθεροποιείται το αντιγόνο εμβαπτίζοντας τις πλάκες σε ακετόνη για δέκα λεπτά.
- Ξήρανση.
- Διαδοχικές αραιώσεις των ορών προετοιμάζονται με PBS. Αρχική αραιώση 1 / 8.

- 20 μl κάθε αραιώσης τοποθετείται στις υποδοχές των αντικειμενοφόρων πλακών.
 - Επώαση τριάντα λεπτών στους 37°C με υγρασία.
 - Ακολουθούν δύο δεκάλεπτες πλύσεις με PBS και μια με νερό.
 - Ξήρανση.
 - Τα φθορίζοντα αντισώματα αραιώνονται (1 / 200) με την βοήθεια μίγματος Blue Evans (5 μl Blue Evans και 5 ml PBS).
 - 20 μl κάθε αραιώσης τοποθετούνται στις υποδοχές των αντικειμενοφόρων πλακών.
 - Τοποθετείται 20 μl κάθε αραιώσης στις πλάκες ανοσοφθορισμού.
 - Επώαση τριάντα λεπτών στους 37°C με υγρασία.
 - Ακολουθούν δύο δεκάλεπτες πλύσεις με PBS και μια με νερό.
 - Ξήρανση.
 - Προστίθενται μερικές σταγόνες γλυκερόλης στις πλάκες και επικαλύπτονται με καλυπτρίδα, αποφεύγοντας την δημιουργία φυσαλίδων.
 - Διάβασμα των αποτελεσμάτων στο μικροσκόπιο ανοσοφθορισμού.
- Οι ρικέτσιες φθορίζουν πράσινες.

Προσδιορισμός οροτύπου με εφαρμογή της μεθόδου του Philip (1978)

Η διαφορά ειδικότητας (specificity difference (SPD) δύο στελεχών εκτιμάται με βάση την παρακάτω εξίσωση:

$$SPD = (A_a + B_b) - (A_b + B_a)$$

όπου:

A_a είναι ο τίτλος του ορού A με το ομόλογο αντιγόνο a.

B_b είναι ο τίτλος του ορού B με το ομόλογο αντιγόνο b.

A_b είναι ο τίτλος του ορού A με το ετερόλογο αντιγόνο b.

B_a είναι ο τίτλος του ορού B με το ετερόλογο αντιγόνο a.

Τίτλος 1 / 8 ορίζεται ως 1, 1 / 16 = 2, 1 / 32 = 3 κ.ο.κ. Ορός που δεν αντιδρά στην αρχική αραιώση ορίζεται ως 0.

Δύο στελέχη ανήκουν σε διαφορετικό ορότυπο όταν $SPD \geq 3$.

Ταυτοποίηση των ρικετσιακών στελεχών με μεθόδους της μοριακής βιολογίας

Υδρόλυση των προϊόντων πολ/μου με περιοριστικά ένζυμα (PCR-RFLP)

(Regnery et al, 1991)

Η υδρόλυση των προϊόντων πολλαπλασιασμού με περιοριστικά ένζυμα παρέχει κατατομές που συγκρίνονται με τις αντίστοιχες των στελεχών αναφοράς (Regnery et al, 1991), συμβάλλει ουσιαστικά στην ταυτοποίηση του νέου στελέχους.

Τα προϊόντα του γενεαμικού πολ/μού με εναρκτές της κιτρικής συνθετάσης υδρολύθηκαν με το περιοριστικό ένζυμο *Alu* I, ενώ εκείνα που προέρχονταν από πολ/μό με εναρκτές του αντιγόνου 190-kDa υδρολύθηκαν με τα περιοριστικά ένζυμα *Rsa* I και *Pst* I.

Υλικά

- περιοριστικά ένζυμα *Alu* I, *Rsa* I και *Pst* I με τα αντίστοιχα ρυθμιστικά διαλύματα (New England Biolabs, Inc., Beverly, MA, USA)
- υδατόλουτρο 37°C

Διαδικασία

Διατήρηση των προϊόντων πολ/μου σε πάγο

- Προετοιμάζεται το διάλυμα αντίδρασης

περιοριστικό ένζυμο	1.0 μl
αντίστοιχο ρυθμιστικό διάλυμα	2.7 μl
δείγμα	23.3 μl

Προϊόντα πολ/μου με εναρκτές την κιτρική συνθετάση υδρολύονται με *Alu* I, ενώ με εναρκτές του 190-kDa αντιγόνου με *Rsa* I και *Pst* I.

- Το διάλυμα αντίδρασης επωάζεται για 2 ώρες σε υδατόλουτρο 37°C.

Τα δείγματα διατηρούνται στους +4°C, μέχρι την ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης, με στόχο την σύγκριση των προφίλ.

Ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμίδης (PAGE)

Υλικά

- συσκευή κάθετης ηλεκτροφόρησης (BRL)
- ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης TBE 1x
- διάλυμα ακρυλαμίδης 30%:

Ακρυλαμίδη	30 g
N, N' methylenbisacrylamide (bis)	4 g
Νερό qsp	100 ml

Το διάλυμα φιλτράρεται και αποθηκεύεται σε σκοτεινόχρωμο φιαλίδιο στους 4°C για 2 μήνες.

- TEMED
- υπερθειικό αμμόνιο (Ammonium Persulfate) 10%
- Gel-loading Buffer (6x):

Μπλέ της βρομοφαινόλης	0,25%
Κυανό του ξυλνίου	0,25%
Ficoll	15%
Νερό qsp	

- Δείκτες μοριακού βάρους DNA molecular weight marker V (Boehringer Mannheim).

Διαδικασία

- Τα τζάμια πλένονται με ζεστό νερό και σαπούνι και ξεπλένονται με απιονισμένο νερό, στη συνέχεια με αλκοόλη.

- Συναρμολογείται το σύστημα των τζαμιών.

- Προετοιμάζεται η πηκτή 8%:

ακρυλαμίδη 30%	13.3 ml
Νερό	26.35 ml
TBE 10x	10 ml
υπερθειϊκό αμμώνιο (10%)	350 μl
TEMED	17.5 μl

- Εισάγεται η πηκτή και η χτένα στη συσκευή, ενώ αποφεύγεται ο σχηματισμός φυσαλίδων.

- Η πηκτή τοποθετείται με κλίση ώστε να αποφευχθεί τυχόν διαρροή.

- Ο πολυμερισμός επέρχεται σε περίπου μια ώρα.

- Μετά την ολοκλήρωση του πολυμερισμού προσεκτικά αφαιρείται η χτένα.

- Εκπλένεται η επάνω και κάτω επιφάνεια της πηκτής με νερό ώστε να μετακινηθεί η μη πολυμερισμένη ακρυλαμίδη.

- Συναρμολογείται η συσκευή ηλεκτροφόρησης και τοποθετείται στην πηκτή.

- Πλένονται τα πηγάδια με ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης TBE 1x.

- Αραιώνονται (1:5) τα δείγματα με gel-loading buffer (6x).

- Ρυθμίζεται η τάση στα 80 V.

- Όταν το κυανού της βρομοφαινόλης φθάνει στο τέλος της πηκτής, τερματίζεται η ηλεκτροφόρηση και αποσυναρμολογείται η συσκευή.

- Η πηκτή μεταφέρεται σε διάλυμα TBE 1x και EidBr (0,5 μg/ml) για 30 λεπτά.

- Στη συνέχεια τοποθετείται σε πηγή υπεριώδους ακτινοβολίας (UV).

- Φωτογραφίζεται και παρατηρούνται τα αποτελέσματα.

- Ακολουθεί υπολογισμός του μεγέθους των τμημάτων του DNA με την βοήθεια των δεικτών.

Ηλεκτροφόρηση πηκτής με ώση πεδίου (Pulsed Field Gel Electrophoresis, PFGE)

Η ηλεκτροφόρηση σε αгарόζη ή σε πολυακρυλαμίδη δεν επιτρέπει τον διαχωρισμό κλασμάτων DNA μεγαλύτερων των 50 kb, γιατί η ηλεκτροφορητική κινητικότητα τους είναι ίδια. Το 1984, οι Cantor και Schwartz χρησιμοποίησαν για πρώτη φορά την ηλεκτροφόρηση μεταβλητού πεδίου για να ξεπεράσουν το παραπάνω πρόβλημα. Η νέα τεχνική ονομάστηκε **Pulsed Field Gel Electrophoresis**. Το εξελισσόμενο σύστημα περιλαμβάνει μια τετράγωνη κυβέτα που προορίζεται για την πηκτή και τα ηλεκτρόδια πλατινίας που τοποθετούνται κάθετα. Ένα μη ομοιογενές πεδίο δημιουργήθηκε χρησιμοποιώντας μια σειρά αρκετών ηλεκτροδίων σαν κάθοδο, ενώ ένα μόνο ηλεκτρόδιο σαν άνοδο. Όμως, σε μη ομοιογενές ηλεκτρικό πεδίο, το DNA μετακινείται διαγώνια διαγράφοντας μια κυρτή τροχιά. Με τον τρόπο αυτό είναι πάρα πολύ δύσκολος ένας ακριβής υπολογισμός του μεγέθους του DNA καθώς και η σύγκριση της κατατομής πολλών δειγμάτων.

Το ίδιο έτος, οι Carle και Olson μετατρέπουν το αρχικό σύστημα (Carle & Olson 1985). Δύο μη ομοιογενή πεδία δημιουργούνται χρησιμοποιώντας ένα μακρύ καλώδιο πλατινίας για κάθοδο και ένα μικρό για άνοδο. Αυτό το νέο σύστημα ονομάστηκε εναλλακτικά **Orthogonal Field Gel Electrophoresis (OFGE)**. Αλλά και στην περίπτωση αυτή, η

επεξήγηση είναι εξίσου δύσκολη γιατί το DNA διαγράφει μια κυρτή τροχιά προς τα έξω. Οι ίδιοι ερευνητές κατασκεύασαν ένα άλλο σύστημα επιτρέποντας την ευθύγραμμη μετακίνηση του DNA, γνωστό με το όνομα Field Inversion Gel Electrophoresis (FIGE) (Carle et al, 1986). Σ'αυτή την περίπτωση έχουμε δύο ισομεγέθη ηλεκτρόδια (ανόδου και καθόδου) επιτρέποντας την δημιουργία ενός ομοιογενούς πεδίου. Η πολικότητα του πεδίου μετατρέπεται ρυθμικά. Ο χρόνος της μετακίνησης είναι μεγαλύτερος προς τα εμπρός παρά προς τα πίσω επιτρέποντας την μετακίνηση των κλασμάτων του DNA προς το εσωτερικό. Το σύστημα FIGE επιτρέπει τον διαχωρισμό μορίων μέχρι 1 Mb.

Το 1986 οι Chu et al (1986) κατασκεύασαν το σύστημα που χρησιμοποιείται περισσότερο σήμερα και ονομάζεται Contour Clamped Homogeneous Electric Field (CHEF). Το ομοιογενές ηλεκτρικό πεδίο επιτυγχάνεται με την βοήθεια 24 ηλεκτροδίων μοιρασμένων σε ένα εξάγωνο.

Η τεχνική συνίσταται από τρία μεγάλα βήματα:

- δημιουργία των μπλόκ και κυτταρική λύση με πρωτεΐνωση K και lauroylsarcosine
- επίδραση στο DNA με περιοριστικό ένζυμο εκλογής
- ηλεκτροφόρηση σε πηκτική agarόζης

Για τον υπολογισμό του συνολικού MB του γενόματος ενός βακτηρίου δεν πραγματοποιείται το δεύτερο βήμα.

Υλικά

- InCert® agarose

-διάλυμα **ESP**:

EDTA 0,5 M pH 8

lauroylsarcosine 1%

proteinase K 1 mg/ml

- διάλυμα **TE**:

Tris-HCl 10 mM

EDTA 1 mM pH 7,6

- ρυθμιστικό διάλυμα **TBE 5x**:

Tris base 54 g

Βορικό οξύ 27,5 g

0,5M EDTA pH 8.0 20 ml

νερό qsp 1 lt

Ρύθμιση του pH στο 8

- phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)

- διάλυμα **ES** (EDTA 0,5 M, sarcosyl® 1%)

- Οι δείκτες MB προμηθεύτηκαν από την Bio Labs, New England, MA, USA.

α) Yeast Chromosome PFG marker: χρωμοσώματα απομονωμένα από τον *Saccharomyces cerevisiae* (225-2500 kb)

β) Low-range PFG Marker: μίγμα concatemers και μονομερών του φάγου λ μετά από υδρόλυση με *Hind* III (0.1-194 kb)

γ) Lambda Ladder PFG Marker: μίγμα concatemers του DNA του φάγου λ (48-1018.5 kb).

Δημιουργία των μπλοκς και κυτταρική λύση με πρωτεΐνωση K και lauroylsarcosine

Εξαιτίας της ευαισθησίας του μεγαλομοριακού DNA σε μηχανικές αλλοιώσεις, οι Schwartz και Cantor ανέπτυξαν μια τεχνική που εσωκλείει τα βακτήρια μέσα σε πηκτική agarόζης, της οποίας η κατασκευή επιτρέπει την ελεύθερη διάχυση του απορρυπαντικού

και της πρωτεΐνωσης. Με τον τρόπο αυτό, τα μεγάλα μακρομόρια του DNA είναι προφυλαγμένα (Balayeva 1989).

- Προετοιμάζεται ένα διάλυμα αгарόζης 1% με InCert® Agarose (low melting, FMC Bioproducts, Rockland ME) σε K36 και τοποθετείται σε υδατόλουτρο 37°C.

- Παράλληλα τοποθετείται το εναιώρημα των ρικετσιών σε υδατόλουτρο 37°C.

- Αναμιγνύονται ίση ποσότητα βακτηριακού εναιωρήματος και αгарόζης 1% και δημιουργούνται κύβοι των 80 έως 100 μl με την βοήθεια ενός κατάλληλου καλουπιού. Το καλούπι είναι πάνω σε πάγο που επιτρέπει την στερεοποίηση των κύβων μέσα σε 10-15 λεπτά.

- Μεταφέρονται οι στερεοί κύβοι σε λυτικό μίγμα ESP (5 όγκοι μίγματος για 1 όγκο μπλόκ). Το EDTA αναστέλλει κάθε δραστηριότητα ενδογενούς νουκλεάσης. Οι κύβοι επωάζονται για 24 ώρες στους 50°C. Το λυτικό μίγμα αντικαθίσταται με ίσο όγκο φρέσκου μίγματος και ακολουθεί νέα επώση 24 ωρών στους 50°C.

- Οι κύβοι ανακτώνται και πλένονται δύο φορές σε διάλυμα TE για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

- Μεταφέρονται σε διάλυμα TE που περιέχει 0,04 mg/ml phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) ώστε να απενεργοποιηθεί η πρωτεΐνάση K.

- Τοποθετούνται στους 50°C για 1 ώρα.

- Επανάληψη της διαδικασίας μετά από αλλαγή του διαλύματος.

- Οι κύβοι πλένονται δύο φορές σε TE και αποθηκεύονται σε EDTA 0,5 M στους 4°C. Οι κύβοι μπορούν να διατηρηθούν περίπου 1 χρόνο.

Επίδραση στο DNA με περιοριστικό ένζυμο εκλογής

Τα περιοριστικά ένζυμα είναι ενδονουκλεάσες που δρουν με καθορισμένο τρόπο και αναπαράγουν τους δύο κλώνους του DNA όπως κι αν είναι η καταγωγή του. Τα ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα: *Bss* HII, *Sma* I, *Eag* I και προμηθεύτηκαν από την BioLabs, New England, MA, USA.

ENZYMATA

ΠΕΡΙΟΧΗ ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΗΣ ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ

Bss HII

5'-G ↓ C G C G C-3'
3'-C G C G C ↑ G-5'

Sma I

5'-C C C ↓ G G G-3'
3'-G G G ↑ C C C-5'

Eag I

5'-C ↓ G G C C G-3'
3'-G C C G G ↑ C-5'

Διαδικασία

- οι κύβοι που θα υδρολυθούν πλένονται δύο φορές TE για 15 λεπτά
- τοποθετούνται ανεξάρτητα, σε κοινικό σωλήνα (ependorf) του 1,5 ml, που περιέχει:

- 30 U ενζύμου
- 270 μl απεσταγμένο νερό
- 30 μl ρυθμ. διάλυμα ανάλογα με το ένζυμο

- Επωάζονται δύο ώρες στους 50°C, 25°C και 37°C αντίστοιχα για τα ένζυμα *Bss* HII, *Sma* I και *Eag* I.

- Απορρίπτεται το ενζυμικό διάλυμα και επαναλαμβάνεται η υδρόλυση δύο φορές με τις ίδιες συνθήκες.

- Απορρίπτεται το διάλυμα και η αντίδραση σταματά με την προσθήκη 1 ml διαλύματος ES (EDTA 0,5 M, sarcosyl® 1%).

- Ακολουθεί επώαση δύο ωρών στους 50°C. Το διάλυμα ES αναροφάται και προστίθεται 1ml διαλύματος ESP.

Οι κύβοι είναι λοιπόν έτοιμοι για ηλεκτροφόρηση. Μπορούν να αποθηκευθούν στους 4°C για αρκετούς μήνες.

Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης

Η συσκευή που χρησιμοποιήθηκε ήταν η CHEF-DR® Bio Rad:

Διαδικασία

- Προτοιμάζονται 2,3 l TBE 0,5X : δύο λίτρα χρησιμοποιούνται σαν διάλυμα ηλεκτροφόρησης, 120 ml χρησιμοποιούνται για την παρασκευή της πηκτής, ενώ το υπόλοιπο χρησιμοποιείται στην διατήρηση των μπλόκ.

- Προστίθενται 2 l TBE στην κυψέλη ηλεκτροφόρησης. Συνδέεται η αντλία και ενεργοποιείται ο κρουστάτης. Ενδεικνυόμενη θερμοκρασία εργασίας 14°C.

- Τοποθετούνται οι κύβοι σε TBE για τριάντα λεπτά (ΘΔ).

- Απομακρύνεται το διάλυμα και επαναπροστίθεται TBE για άλλα τριάντα λεπτά.

- Ζυγίζονται 1,2 g αгарόζης, μεταφέρονται σε 120 ml TBE και βράζονται. Το διάλυμα αгарόζης τοποθετείται σε υδατόλουτρο 50°C.

- Τοποθετείται το καλούπι (14 X 12,5 cm) σε επίπεδη επιφάνεια.

- Εφαρμόζεται η κτένα με κατάλληλο τρόπο και η αгарόζη μεταφέρεται στο καλούπι.

- Φυλάσσονται 5 με 6 ml αгарόζης σε υδατόλουτρο 50°C.

- Η αгарόζη αφήνεται να πήξει σε ΘΔ και ψύχεται για δέκα με δεκαπέντε λεπτά στους 4°C.

- Αφαιρείται η κτένα με προσοχή.

- Τοποθετούνται οι κύβοι των δειγμάτων και των δεικτών του μοριακού βάρους στο πηγάδι με την βοήθεια σπάτουλας.

- Συμπληρώνεται το πηγάδι με την αгарόζη που φυλάχθηκε στους 50°C.

- Παραμονή σε ΘΔ μέχρι να στερεοποιηθεί η πηκτή.

- Εξάγεται η πηκτή από το καλούπι και τακτοποιείται στην κυψέλη της συσκευής CHEF-DR®.

- Ρυθμίζεται το επίπεδο του διαλύματος TBE ώστε να υπερβαίνει η πηκτή αгарόζης κατά 2 mm.

- Εναρξη λειτουργίας του pulswave και της πηγής ενέργειας (powersupply).

	<i>Bss</i> HII	<i>Sma</i> I	<i>Eag</i> I
pulswave (δευτ)	5-120	3-5	3-10
Χρόνος (ωρ)	40	30	24
Τάση (Vts)	150	180	190
Δείκτες	Lambda Ladder	Low range	Low range

- Στο τέλος της ηλεκτροφόρησης, το ρεύμα διακόπτεται αυτόματα.

- Μεταφέρεται η πηκτή σε διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου (0,5 μg/ml) για τριάντα λεπτά.

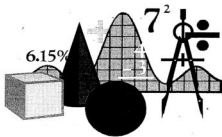
- Ανάγνωση της κατατομής διαχωρισμού του DNA σε UV.

Στατιστική ανάλυση

Η δοκιμασία του student- και χ^2 -test καθώς και το Fisher's exact test χρησιμοποιήθηκαν για την σύγκριση των συχνοτήτων. Σημαντική στατιστική διαφορά θεωρήθηκε όταν $p \leq 0.05$.

Σύγκριση με άλλες ρικέτσιες

Ο προσδιορισμός του μοριακού βάρους και η σύγκριση των αποτελεσμάτων των SDS-PAGE, PCR-RFLP και PFGE πραγματοποιήθηκε με την βοήθεια του ηλεκτρονικού οπτικού συστήματος Imager TM system (Appligene, Illkirch, France) σε συνεργασία με το πρόγραμμα επεξεργασίας εικόνας QGEL programm (Quantigel Corporation, Madison, USA).



ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Τα αποτελέσματα της εργασίας διακρίνονται σε 2 μέρη με επιμέρους ενότητες:

ΜΕΡΟΣ ΠΡΩΤΟ

Περιλαμβάνει τις παρακάτω ενότητες:

α) **Ορολογική μελέτη**, όπου αναπτύσσονται τα αποτελέσματα:

i) του ανοσοφθορισμού (ΑΦ) για την ανίχνευση αντισωμάτων IgG και IgM έναντι της *R. conorii*

ii) του Western blot για την ανίχνευση αντισωμάτων έναντι του λιποπολυσακχαρίτη (LPS) που αντιστοιχεί στις πρωτεΐνες MB 20- έως 50-kDa και τις πρωτεΐνες υψηλού μοριακού βάρους (115-kDa και 135-kDa, Specific Protein Antigen, SPA)

iii) προσδιορισμός της ειδικότητας, της ευαισθησίας, της θετικής και αρνητικής διαγνωστικής αξίας του ανοσοφθορισμού

β) **Επιδημιολογική μελέτη** του ΜΚΠ στην περιοχή της Φωκίδας

ΜΕΡΟΣ ΔΕΥΤΕΡΟ

Περιλαμβάνει τις παρακάτω ενότητες:

α) **Συλλογή και ταξινόμηση** των κρότωνων

β) **Ανίχνευση ρικετσιών από κρότωνες** με την *δοκιμασία της αιμολέμφου* και την τεχνική του *PCR*

γ) **Απομόνωση και καλλιέργεια** των ρικετσιών από κρότωνες. Η απομόνωση έγινε με την ταχεία καλλιέργεια σε *shell-vial* και με κλασσικές μεθόδους καλλιέργειας

δ) **Ταυτοποίηση** των στελεχών με:

- ανάλυση της πρωτεϊνικής και αντιγονικής κατατομής με τις τεχνικές *SDS-PAGE* και *Western Blot*
- την μέθοδο του *Philip*
- ανάλυση του πολυμορφισμού των κλασμάτων του DNA στελεχών μετά από υδρόλυση με περιοριστικά ένζυμα (*PCR-RFLP*)
- την ηλεκτροφόρηση πηκτής με ώση πεδίου (*Pulsed Field Gel Electrophoresis, PFGE*)

ΜΕΡΟΣ ΠΡΩΤΟ ΟΡΟΛΟΓΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

Εμμεσος ανοσοφθορισμός

Συνολικά 146 άτομα από τα 254 του δείγματος, που εξετάστηκαν με ΑΦ, δηλαδή ποσοστό 57,5% είχαν IgG αντισώματα έναντι της *R. corydii* σε αραιώσεις του ορού $\geq 1:32$. Είκοσι εννέα άτομα είχαν τίτλο 1:32, ενώ 117 (46,1%) μεγαλύτερο ή ίσο του 1:64. Εξήντα ένα άτομα είχαν τίτλο 1:64, 34 τίτλο 1:128, 13 τίτλο 1:256 και 7 τίτλο 1:1024 (πίνακας 1).

Μόνο δύο άτομα από το σύνολο του δείγματος είχαν IgM αντισώματα έναντι της *R. corydii*: άνδρας ηλικίας 41 ετών από την Μακρυνή που είχε τίτλο 1:64 (IgG 1:128) και γυναίκα 85 ετών από την Βουνιχώρα που είχε τίτλο 1:32 (IgG 1:128).

Τίτλοι ΑΦ	ΑΦ		Western blot		
	Αρνητικοί	SPA Μόνο	SPA+LPS	LPS Μόνο	
< 32	108 (42,5)	108 (42,5)	0	0	0
32	29 (11,4)	11 (4,3)	10 (3,9)	2 (0,8)	6 (2,4)
64	61 (24,0)	6 (2,4)	29 (11,4)	20 (7,9)	6 (2,4)
128	34 (13,4)	0	16 (6,3)	16 (6,3)	2 (0,8)
256	13 (5,1)	0	9 (3,5)	4 (1,6)	0
512	7 (2,7)	0	2 (0,8)	5 (1,9)	0
1024	2 (0,8)	0	0	2 (0,8)	0
Σύνολο	254	125 (49,2)	66 (26)	49 (19,3)	14 (5,5)

Πίνακας 1: Αποτελέσματα του ΑΦ και του Western blot για το σύνολο του δείγματος (σε παρένθεση το ποσοστό στα 254 άτομα).

Western blot

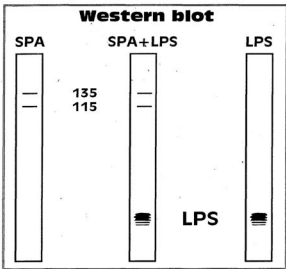
Η μέθοδος του Western blot αποκάλυψε αντισώματα έναντι του λιποπολυσακχαρίτη (LPS, 20 έως 50-kDa) και των πρωτεϊνών υψηλού MB (115-kDa και 135-kDa, Specific Protein Antigen, SPA) (φωτογραφία 1).

Τα αποτελέσματα του Western blot χωρίστηκαν σε τρεις ομάδες:

α) **SPA:** ο ορός έχει αντισώματα μόνο έναντι της πρωτεΐνης 115-kDa ή και της πρωτεΐνης 135-kDa (SPA) (σχήμα).

β) **SPA + LPS:** ο ορός έχει ταυτόχρονα αντισώματα έναντι των SPA και του LPS.

γ) **LPS:** ο ορός έχει αντισώματα μόνο έναντι του LPS.



Σύμφωνα λοιπόν με την παραπάνω κατάταξη από το σύνολο του δείγματος, 66 οροί είχαν αντισώματα μόνο έναντι των πρωτεϊνών SPA, δηλαδή ποσοστό 26% (πρώτη ομάδα) και 49 οροί, ποσοστό 19,3%, είχαν αντισώματα έναντι των πρωτεϊνών SPA και του LPS (δεύτερη ομάδα). Τέλος, 14 μόνο οροί (5,5%) είχαν αντισώματα αποκλειστικά έναντι του LPS (τρίτη ομάδα). Καμμία στατιστικά σημαντική διαφορά δεν επισημάνθηκε ανάμεσα στην πρώτη και δεύτερη ομάδα ($p < 0,05$). Αντίθετα τα αποτελέσματα της τρίτης ομάδας διαφέρουν σημαντικά από εκείνα των δύο προηγούμενων ομάδων ($p < 0,05$).

Συνεπώς 115 άτομα (45,3%) της πρώτης και δεύτερης ομάδας από τα 254, είχαν αντισώματα έναντι των SPA, που είναι ειδικά αντιγόνα της *R. conorii*. Εξήντα τρεις οροί, δηλαδή ποσοστό 24,80%, είχαν αντισώματα έναντι του LPS (δεύτερη και τρίτη ομάδα).

Όπως φαίνεται από τον πίνακα όλοι οι οροί που είχαν τίτλο μικρότερο του 1/32 (108 άτομα) δεν είχαν αντισώματα έναντι του LPS και των SPA.

Τα δύο άτομα που εμφάνισαν IgM αντισώματα είχαν επίσης αντισώματα έναντι των πρωτεϊνών SPA: το ένα από αυτά έναντι μόνο των SPA και το άλλο έναντι και του LPS.

Από τους 146 ορούς που είχαν τίτλο μεγαλύτερο ή ίσο του 1:32, οι 49 είχαν αντισώματα έναντι του SPA και του LPS (49/146, 33,6%), 66 μόνο έναντι των SPA (66/146, 45,2%), 14 αποκλειστικά έναντι του LPS (14/146, 9,6%) και 17 δεν παρουσίασαν καμία αντίδραση (17/146, 11,6%) (πίνακας 1). Συνολικά έναντι των SPA είχαν αντισώματα 115 από τους 146 ορούς, δηλαδή ποσοστό 78,8%.

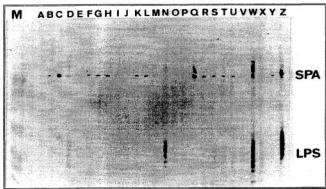
Από τους 117 ορούς που είχαν τίτλο μεγαλύτερο ή ίσο του 1:64, οι 47 είχαν αντισώματα έναντι των SPA και του LPS (47/117, 40,2%), 56 μόνο έναντι των SPA (56/117, 47,9%), 8 μόνο έναντι του LPS (8/117, 6,8%) και 6 δεν παρουσίασαν καμία αντίδραση (6/117, 5,1%) (πίνακας 1, σελ. 87). Συνολικά έναντι των SPA είχαν αντισώματα 103 από τους 117 ορούς, δηλαδή ποσοστό 88,0%.

Από τους 56 ορούς που είχαν τίτλο μεγαλύτερο ή ίσο του 1:28, οι 27 είχαν αντισώματα έναντι των SPA και του LPS (27/56, 48,2%), 27 μόνο έναντι των SPA (27/56, 48,2%) και 2 αποκλειστικά έναντι του LPS (2/56, 3,6%)(πίνακας 1). Συνολικά έναντι των SPA είχαν αντισώματα 54 από τους 56 ορούς, δηλαδή ποσοστό 96,4%.

Από τους 22 ορούς που είχαν τίτλο μεγαλύτερο ή ίσο του 1:256, οι 11 είχαν αντισώματα έναντι των SPA και του LPS (11/22, 50,0%) και 11 μόνο έναντι των SPA (11/22, 50,0%). Συνολικά έναντι των SPA είχαν αντισώματα 22 από τους 22 ορούς, δηλαδή ποσοστό 100%.

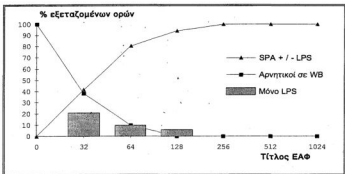
Από τους 9 ορούς που είχαν τίτλο μεγαλύτερο ή ίσο του 1:512, οι 7 είχαν αντισώματα έναντι των SPA και του LPS (7/9, 77,8%) και 2 μόνο έναντι των SPA (2/9, 22,2%)(πίνακας 1). Συνολικά έναντι των SPA είχαν αντισώματα 9 από τους 9 ορούς, δηλαδή ποσοστό 100%.

Οι 2 οροί που είχαν τίτλο μεγαλύτερο ή ίσο του 1:1024, είχαν αντισώματα έναντι των SPA και του LPS (2/2, 100%).



Φωτογραφία 1: Μέθοδος του Western blot σε 26 ορούς όπου φαίνονται οι αντιδράσεις με τις ειδικές πρωτεΐνες (SPA) (στήλες b, c, f, g, h, k, l, q-v, y) ή με τον λιποπολυσακχαρίτη (LPS) (στήλες d και n), ή και με τα δύο αντιγόνα (στήλες w και z). Μερικοί οροί είναι αρνητικοί (στήλες a, e, i, j, m, o, p, x). Στήλη M : δεικτών μοριακού βάρους (Low range prestained SDS-PAGE molecular weight standards).

Το γράφημα 1 δείχνει ότι όσο αυξάνει ο τίτλος του ΑΦ τόσο πιο πολλοί οροί είχαν αντισώματα έναντι των SPA. Αντίθετα, όσο αυξάνει ο τίτλος στον ΑΦ τόσο περισσότερο μειώνονται τα αντισώματα έναντι του LPS. Φαίνεται λοιπόν ότι οι SPA αποτελούν ειδικό διαγνωστικό στοιχείο σε αντίθεση με τον LPS.



Γράφημα 1 : Ποσοστά αρνητικών ορών, ορών που αντέδρασαν με ειδικές πρωτεΐνες (SPA) και με τον λιποπολυσακχαρίτη (LPS) χρησιμοποιώντας Western blot σε σχέση με διάφορους τίτλους στον ανοσοφθορισμό (IFA).

Ευαισθησία, ειδικότητα, θετική και αρνητική διαγνωστική αξία του ΔΦ

Η εφαρμογή του πρότυπου πίνακα για οριακό τίτλο $\geq 1/32$ έδωσε τις ακόλουθες τιμές:

	+	-	Σύνολο
+	115	31	146
-	0	108	108

ευαισθησία = $115 / 115 + 0 = 100\%$

ειδικότητα = $108 / 108 + 31 = 77,69\%$

$\Theta\Delta\Lambda = 115 / 115 + 31 = 78,77\%$

$\Lambda\Delta\Lambda = 108 / 108 + 0 = 100\%$

Η εφαρμογή του πρότυπου πίνακα για οριακό τίτλο $\geq 1/64$ έδωσε τις ακόλουθες τιμές:

	+	-	Σύνολο
+	103	14	117
-	12	125	137

ευαισθησία = $103 / 103 + 12 = 89,56\%$

ειδικότητα = $125 / 125 + 14 = 89,93\%$

$\Theta\Delta\Lambda = 103 / 103 + 14 = 88,03\%$

$\Lambda\Delta\Lambda = 125 / 125 + 12 = 91,2\%$

Η εφαρμογή του πρότυπου πίνακα για οριακό τίτλο $\geq 1/128$ έδωσε τις ακόλουθες τιμές:

	+	-	Σύνολο
+	54	2	56
-	61	137	198

ευαισθησία = $54 / 54 + 61 = 46,96\%$

ειδικότητα = $137 / 137 + 2 = 98,56\%$

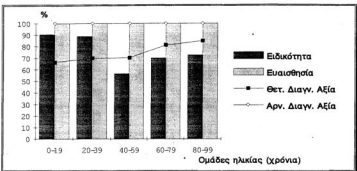
$\Theta\Delta\Lambda = 54 / 54 + 2 = 96,43\%$

$\Lambda\Delta\Lambda = 137 / 137 + 61 = 69,19\%$

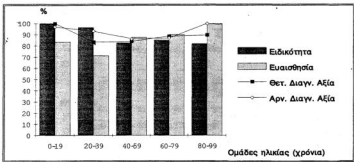
Τα παραπάνω αποτελέσματα συνομίζονται στον πίνακα:

Οριακός τίτλος (cut-off) ανοσοφθορισμού

	1/32	1/64	1/128
Ευαισθησία	100,0	89,6	47,0
Ειδικότητα	77,7	89,9	98,6
Θετική διαγνωστική αξία	78,77	88,0	96,4
Αρνητική διαγνωστική αξία	100,0	91,2	69,2



Γράφημα 3 : Η ειδικότητα, ευαισθησία, θετική και αρνητική διαγνωστική αξία του ανοσοφθορισμού για οριακό τίτλο (cut-off) την αραιώση 1/32 ανά ομάδα ηλικίας.



Γράφημα 4 : Η ειδικότητα, ευαισθησία, θετική και αρνητική διαγνωστική αξία του ανοσοφθορισμού για οριακό τίτλο (cut-off) την αραιώση 1/64 ανά ομάδα ηλικίας.

ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

Κατανομή κατά ηλικία και φύλο

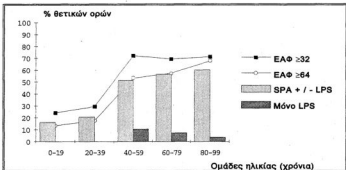
Ο μέσος όρος της ηλικίας των ατόμων του δείγματος ήταν 50,5 έτη. Άτομα με τίτλο αντισωμάτων $\geq 1:64$ είχαν μέση ηλικία 62,8 έτη, ενώ με τίτλο $< 1:64$ είχαν μέση ηλικία 45,69. Η εφαρμογή του t-test έδειξε ότι ο μέσος όρος ηλικίας των θετικών διέφερε στατιστικά σημαντικά από τον μέσο όρο των αρνητικών ($p < 0,001$).

Τα άτομα των οποίων ο ορός αντέδρασε με τις SPA είχαν μέσο όρο ηλικίας 61,7 έτη, ενώ εκείνων που δεν αντέδρασε με τις SPA είχαν μέσο όρο ηλικίας 46,87. Η στατιστική επεξεργασία (t-test) έδειξε ότι υπάρχει σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων ($p < 0,001$).

Ο μέσος όρος ηλικίας των θετικών του ΑΦ δεν είχε καμία στατιστικά σημαντική διαφορά από εκείνους που είχαν αντισώματα έναντι των SPA ($p = 0,61 > 0,05$, t-test). Επίσης καμία στατιστικά σημαντική διαφορά δεν βρέθηκε ανάμεσα στο μέσο όρο ηλικίας των αρνητικών του ΑΦ και εκείνων που δεν είχαν αντισώματα έναντι των SPA ($p = 0,68 > 0,05$, t-test).

Το συνολικό δείγμα κατανεμήθηκε σε πέντε ομάδες με βάση την ηλικία, ώστε να προσδιοριστεί κατά πόσον η συχνότητα σχετίζεται με την ηλικία (γράφημα 5). Οι ομάδες αυτές ήταν 0-19, 20-39, 40-59, 60-79 και μεγαλύτερη ή ίση των 80 ετών. Το γράφημα 5 δείχνει την αναλυτική κατανομή των θετικών αποτελεσμάτων ανά ομάδα ηλικίας. Στον ΑΦ με ελάχιστο θετικό τίτλο το 1:32, η συχνότητα βρέθηκε 20-30% μέχρι την ηλικία των 40 ετών και γύρω στο 70% μετά τα 40 έτη. Θεωρώντας ελάχιστο θετικό τίτλο το 1:64, η συχνότητα ήταν κάτω από 20% μέχρι την ηλικία των 40 ετών και αυξήθηκε στο 50-70% στις ηλικίες ανάμεσα στο 40ο και 90ο έτος.

Στο Western blot παρατηρήθηκε ανάλογη συσχέτιση της ηλικίας με τους ορούς που είχαν αντισώματα έναντι των SPA. Αντίθετα, η παραπάνω συσχέτιση δεν παρατηρήθηκε για τον LPS (γράφημα 5).



Γράφημα 5 : Κατανομή κατά ηλικία των θετικών στον ΑΦ ορών και των ορών που είχαν αντισώματα έναντι του LPS και των ειδικών πρωτεϊνών (SPA) στο Western blot.

Η αναλογία ανδρών/γυναικών του δείγματος ήταν 0,94 (123/131), 1,21 (64/53) στους θετικούς στον ΑΦ και 1,02 (58/57) σε εκείνους που είχαν αντισώματα έναντι των SPA. Στατιστικά, το φύλο δεν επηρέασε σε σημαντικά επίπεδα την έκβαση των αποτελεσμάτων του ΑΦ (τίτλος ≥ 64) και της δοκιμασίας του Western blot ($p = 0,60 \cdot 0,05$, δοκιμασία χ^2).

Επαγγελματική κατανομή

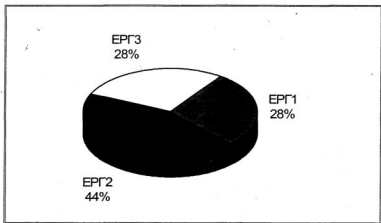
Η επεξεργασία του ατομικού επιδημιολογικού δελτίου που συμπληρώθηκε έδειξε ότι εβδομήντα κάτοικοι αποτελούσαν την ομάδα **EPΓ-1**, δηλαδή ποσοστό 27,6% (γράφημα 6). Σαράντα ένα από αυτούς είχαν τίτλο μεγαλύτερο ή ίσο του 1:64 (58,6%) και τριάντα έξι είχαν αντισώματα έναντι των SPA (51,4%).

Το μεγαλύτερο τμήμα του πληθυσμού ανήκε στην ομάδα **EPΓ-2**, δηλαδή 112 κάτοικοι από τους 254 (44,1%) (γράφημα 6). Στην ομάδα αυτή ίσος περίπου αριθμός ατόμων είχε τίτλο μεγαλύτερο ή ίσο του 1:64 και είχαν αντισώματα έναντι των SPA (45 και 47 αντίστοιχα σε σύνολο 112 κατοίκων).

Όσο αφορά την ομάδα **EPΓ-3**, εβδομήντα-δύο κάτοικοι (28,3%) δήλωσαν πλήρη απουσία επαφής με ζώα στον εργασιακό ή οικιακό τους χώρο (γράφημα 6). Οι τριάντα-ένα από τους παραπάνω είχαν αντισώματα έναντι της *R. conorii* με τίτλο $\geq 1:64$ (43,03%) και τριάντα-δύο έναντι των SPA (44,4%).

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων του ΑΦ και του Western blot δεν έδειξε καμία διαφορά ($p=0,4$, χ^2 -test).

Λεπτομερής παράθεση των αποτελεσμάτων εμφανίζεται στον πίνακα 3. Στον πίνακα αυτό παρουσιάζεται η συχνότητα της νόσου σε σχέση με την ηλικία και την εργασία.



Γράφημα 6 : Κατανομή του υπό μελέτη πληθυσμού σύμφωνα με τις ομάδες απασχόλησης EPΓ-1, EPΓ-2 και EPΓ-3.

Πίνακας 3. Παράθεση των δεδομένων της συχνότητας της νόσου καταναμιμένα σύμφωνα με την ηλικία και το επάγγελμα για δύο διαφορετικούς ελαχίστους τίτλους (Cul-off) ανοσοφορομίου (1/32-και 1/64) και για τους ορούς που αντιδράσαν με τις SPA με τη δοκιμασία του WB. Εντός παρένθεσης το ποσοστό στο σύνολο του δείγματος (254)

Ομάδες ηλικίας	ΑΦ IgG23C			ΑΦ IgG264			WB SPA+					
	EF-1	EF-2	EF-3	ΣΥΝΟΛΟ	EF-1	EF-2	EF-3	ΣΥΝΟΛΟ	EF-1	EF-2	EF-3	ΣΥΝΟΛΟ
0-19	2 (0,8)	7 (2,8)	0 (0,0)	9 (3,5)	1 (0,4)	4 (1,6)	0 (0,0)	5 (2,0)	2 (0,8)	4 (1,6)	0 (0,0)	6 (2,3)
20-39	3 (1,2)	3 (1,2)	4 (1,6)	10 (3,9)	3 (1,2)	1 (0,4)	2 (0,8)	6 (2,3)	2 (0,8)	3 (1,2)	2 (0,8)	7 (2,3)
40-59	15 (5,9)	14 (5,6)	5 (2,0)	34 (13,4)	13 (5,1)	8 (3,1)	4 (1,6)	25 (9,8)	10 (3,9)	11 (4,3)	3 (1,2)	24 (9,5)
60-79	25 (9,8)	24 (9,5)	26 (10,2)	75 (29,6)	23 (9,1)	23 (9,1)	16 (6,3)	62 (24,4)	21 (8,7)	21 (8,3)	19 (7,5)	61 (24,4)
≥80	2 (0,8)	9 (3,5)	9 (3,5)	20 (7,9)	1 (0,4)	9 (3,5)	9 (3,5)	19 (7,5)	1 (0,4)	8 (3,1)	8 (3,1)	17 (6,7)
ΣΥΝΟΛΟ	47 (18,5)	57 (22,4)	44 (17,3)	148 (58,3)	41 (16,1)	45 (17,7)	31 (12,2)	117 (46,1)	36 (14,6)	47 (18,5)	52 (20,6)	115 (45,3)

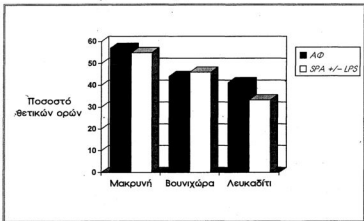
Γεωγραφική κατανομή

Το ποσοστό συμμετοχής του πληθυσμού από το Λευκαδίτι ήταν 46,8% (51/109), από τη Βουνιχώρα 33,8% (152/449) και από τη Μακρυνή 34,7% (51/147). Συνολικά για τα τρία χωριά, το ποσοστό συμμετοχής στην μελέτη ήταν 35,9% (254/707).

Το υψηλότερο ποσοστό οροθετικότητας με τον ΑΦ ($\geq 1/64$) βρέθηκε στην Μακρυνή (56,9%). Το 44,1% των κατοίκων της Βουνιχώρας βρέθηκαν θετικοί με τον ΑΦ και στο Λευκαδίτι το 41,2%. Με την εφαρμογή του χ^2 δεν διαπιστώθηκε καμία στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στα τρία χωριά ($p = 0,20 > 0,05$).

Με το Western blot (οροί που είχαν αντισώματα έναντι των SPA \pm LPS), η Μακρυνή παρουσίασε και πάλι το υψηλότερο ποσοστό (54,9%). Το ποσοστό στο Λευκαδίτι ήταν 33,3% και στην Βουνιχώρα 46,05%. Με την εφαρμογή του χ^2 δεν διαπιστώθηκε καμία στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στα τρία χωριά ($p = 0,16 > 0,05$).

Η εφαρμογή του χ^2 έδειξε και πάλι ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των διαφόρων χωριών παρά μόνο ανάμεσα στο Λευκαδίτι και την Μακρυνή ($p = 0,04 > 0,05$).



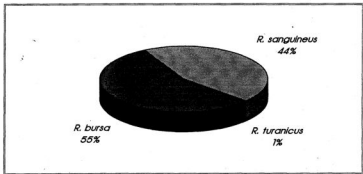
Από 137 κατοίκους που είχαν σκύλο στο άμεσο περιβάλλον τους, 71 είχαν αντισώματα έναντι της *R. conorii* με τίτλο ≥ 32 (ποσοστό 51,82%), και 65 είχαν τίτλο $\geq 1:64$ (47,44%). Από τους 117 που δεν είχαν σκύλο οι 45 (38,46%) είχαν τίτλο ≥ 32 και 22 είχαν τίτλο $\geq 1:64$ (18,8%). Η στατιστική διαφορά των θετικών ατόμων που είχαν σκύλο και εκείνων που δεν είχαν είναι σημαντική ($p < 0,01$). Το στατιστικό αυτό αποτέλεσμα τονίζει τον πρωταγωνιστικό ρόλο του σκύλου στην μετάδοση της *R. conorii*.

ΜΕΡΟΣ ΔΕΥΤΕΡΟ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ, ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΡΙΚΕΤΣΙΩΝ ΑΠΟ ΚΡΟΤΩΝΕΣ

Συλλογή και ταξινόμηση των κροτώνων

Συλλέχθηκαν συνολικά 242 κρότωνες. Σύμφωνα με τα ταξινομικά κλειδιά των Morel & Vassiliadis (1962) και του Παπαδόπουλου (1990) βρέθηκε ότι:

- 107 κρότωνες ανήκαν στο γένος *Rhipicephalus sanguineus*
- 133 κρότωνες ανήκαν στο γένος *Rh. bursa*
- 2 κρότωνες ανήκαν στο γένος *Rh. turanicus*



Δοκιμασία αιμόλεμφου

Η δοκιμασία αιμόλεμφου εφαρμόστηκε στο σύνολο των κρότωνων που συλλέχθηκαν (242). Σε κανένα από αυτούς δεν βρέθηκαν ρικέτσιες με την χρώση Gimenez.

Πολλαπλασιασμός του γενώματος

Χρησιμοποιώντας εναρκτές της κιτρικής συνθέσης, μόνο ένας κρότωνας βρέθηκε μολυσμένος με ρικέτσια (φωτογραφία). Ο θετικός κρότωνας είχε τον κωδικό S14. Από τον ίδιο αυτό κρότωνα απομονώθηκε με καλλιέργεια το ΕΣ. Ο πολλαπλασιασμός του με εναρκτές της 190-kDa πρωτεΐνης έδωσε μια μπάντα 581 ζευγών βάσεων (χαρακτηριστική για τις ρικέτσιες της ΟΚΠ).



Φωτογραφία : Πηκτή αγαρόζης 1,5% μετά από πολλαπλασιασμό με εναρκτές της κιτρικής συνθέτασης. Η πρώτη στήλη (από αριστερά) αντιστοιχεί στον θετικό κρότωνα S14, η δεύτερη στον θετικό μάρτυρα (*R. conorii*), η τρίτη στον αρνητικό μάρτυρα (κύτταρα L929) και η τελευταία στους δείκτες μοριακού βάρους DNA (molecular weight marker VI, Boehringer Mannheim).

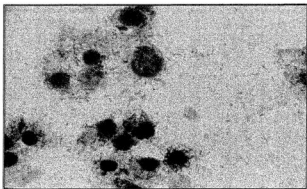
Απομόνωση και καλλιέργεια ρικετσιών από την αιμόλεμφο κρότωνων

Για την απομόνωση ρικετσιών από την αιμόλεμφο χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της ταχείας καλλιέργειας σε *shell-vial*. Από τις 242 ταχείες καλλιέργειες που πραγματοποιήθηκαν μόνο μια απέβει θετική, δηλαδή ποσοστό 0,4%. Καμία από τις αρνητικές για ρικέτσιες καλλιέργειες δεν βρέθηκε μολυσμένη από άλλα βακτήρια.

Στο απομονωθέν στέλεχος δόθηκε ο κωδικός ΕΣ (αρχικά των λέξεων Ελληνικό Στέλεχος). Το στέλεχος ΕΣ βρέθηκε στην αιμόλεμφο θηλικού κρότωνα, που ανήκε στο γένος *R. sanguineus*. Ο μολυσμένος κρότωνας αποκολλήθηκε από αδέσποτο σκύλο στο χωριό Λευκαδίτι.

Το ΕΣ ανακαλλιεργήθηκε σε κύτταρα L929, σύμφωνα με τις κλασσικές μεθόδους. Οι κυτταροκαλλιέργειες δεν εμφάνισαν κυτταροπαθογόνο δράση.

Η ύπαξη όμως ρικετσιών επιβεβαιώθηκε με χρώση Gimenez (φωτογραφία). Όπως φαίνεται στη φωτογραφία το ΕΣ είχε μορφολογία μικρού, στρογγυλού ή μερικές φορές διπλοκοκκικού ενδοκυττάρου βακτηρίου.



Χρώση Gimenez σε κύτταρα L929 μολυσμένα με το στέλεχος ΕΣ

Ανάλυση πρωτεϊνών σε πηκτή ακρυλαμιδίου, παρουσία SDS (SDS-PAGE)

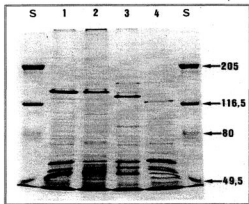
Η πρωτεϊνική κατατομή του ΕΣ συγκρίθηκε με τις κατατομές ρικετσιών που απομονώθηκαν από γειτονικές μεσογειακές χώρες: *R. conorii*, *R. israeli* και *R. massilia*. Παρατηρήθηκε πλήρης ταύτιση των πρωτεϊνών ανάμεσα στο ΕΣ και την *R. massilia*.

Όπως φαίνεται στην φωτογραφία, αρκετές μπάντες, που αντιστοιχούν σε πρωτεΐνες χαμηλού ΜΒ (-50-kDa), είναι ίδιες σε όλες τις εξεταζόμενες ρικέτσιες.

Αντίθετα, σημαντική διαφοροποίηση παρατηρείται στις υψηλού ΜΒ (>90-kDa) ανάμεσα στο ΕΣ και *R. massilia* και στις άλλες ρικέτσιες που εξετάστηκαν (*R. conorii*, *R. israeli*). Στον πίνακα αναγράφονται οι κυριώτερες πρωτεΐνες που χαρακτηρίζουν κάθε στέλεχος (σε -kDa).

ΕΣ	<i>R. massilia</i>	<i>R. israeli</i>	<i>R. conorii</i>
		168*	171*
		158	158
154	154	154	
147.5*	147.5*		
		145	145
		134*	
127.5	127.5	127.5	
			123

*: Επικρατούσες μπάντες.

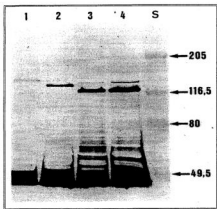


Φωτογραφία: Προφίλ στελεχών των ρικετσιών μετά από ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE. Στήλες 1: ΕΣ, 2: *R. massilia*, 3: *R. israeli*, 4: *R. conorii*, S: δείκτες μοριακού βάρους σε kDa.

Western blot

Τα αποτελέσματα του Western blot παρουσιάζονται στην φωτογραφία. Το ΕΣ (στήλη 4) και η "*R. massilia*" (στήλη 3) εμφάνισαν τις ίδιες πρωτεΐνες, δηλ. 125- και 145-kDa. Μάλιστα η 125-kDa είναι πιο ανοσογόνος (στήλη 3 και 4 φωτογραφία). Η αντίδραση με τον ομόλογο ορό (αντι-ΕΣ) είναι εντονότερη (στήλη 4).

Τα αντισώματα του ΕΣ αναγνωρίζουν στην ανοσοκαθίλιωση την πρωτεΐνη 137-kDa της "*R. israeli*" (στήλη 2) και την 149-kDa της *R. conorii* (στήλη 1).



Φωτογραφία: Western blot πρωτεϊνών διαχωρισμένων με SDS-PAGE, χρησιμοποιώντας ορό ποντικού έναντι του ΕΣ.

Στήλη 1: *R. conorii*

Στήλη 2: "*R. israeli*"

Στήλη 3: "*R. massilia*"

Στήλη 4: ΕΣ

Στήλη S: δείκτες MB σε kDa

Προσδιορισμός οροτύπου με εφαρμογή της μεθόδου του Phillip (1978)

Με ΑΦ το ΕΣ αντέδρασε με ορό ασθενούς με ΜΚΠ.

Χρησιμοποιώντας αντιγόνο και ορούς του ΕΣ και της *R. massilia* που παράχθηκαν σε ποντίκια βρέθηκαν τα παρακάτω αποτελέσματα:

Οροί	ΕΣ	<i>R. massilia</i>
Αντιγόνο		
ΕΣ	1024	256
<i>R. massilia</i>	1024	1024

Εφαρμόστηκε η μέθοδος του Phillip με βάση την παρακάτω εξίσωση:

$$SPD = (A_a + B_b) - (A_b + B_a)$$

όπου:

A_a είναι ο τίτλος του ορού ΕΣ με το ομόλογο αντιγόνο ΕΣ

B_b είναι ο τίτλος του ορού *R. massilia* με το ομόλογο αντιγόνο *R. massilia*

A_b είναι ο τίτλος του ορού ΕΣ με το ετερόλογο αντιγόνο *R. massilia*

B_a είναι ο τίτλος του ορού *R. massilia* με το ετερόλογο αντιγόνο ΕΣ

Αντικαθιστώντας στον τύπο τις τιμές των τίτλων παίρνουμε την παρακάτω εξίσωση:

$$SPD = (8 + 8) - (6 + 6) = 2$$

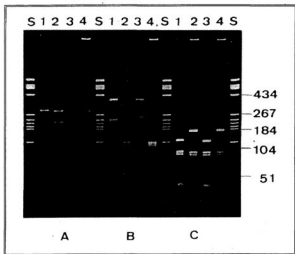
Αρα εφόσον το SPD είναι μικρότερο του 3 σύμφωνα με τον Phillip τα δύο στελέχη ανήκουν στον ίδιο ορότυπο.

Υδρόλυση των προϊόντων πολ/μού με περιοριστικά ένζυμα

Τα αποτελέσματα της υδρόλυσης του ΕΣ, της "*R. massilia*", της *R. conorii* και της "*R. israeli*" φαίνονται στην φωτογραφία.

Η υδρόλυση με το περιοριστικό ένζυμο *Alu I* (τιμήμα C) έδειξε ότι το ΕΣ (στήλη 4) είχε όμοιο προφίλ με αυτό της "*R. massilia*" (στήλη 2). Το ίδιο ένζυμο υδρολύει αλληλουχίες της *R. conorii* (στήλη 3) και της "*R. israeli*" (στήλη 1).

Η υδρόλυση με τα περιοριστικά ένζυμα *Rsa I* (τιμήμα Β) και *Pst I* (τιμήμα Α) έδωσε τα ίδια αποτελέσματα.



Φωτογραφία : Ηλεκτροφόρηση PAGE των υδρολυμένων με περιοριστικά ένζυμα: *Pst I* (Α), *Rsa I* (Β) και *Alu I* (C).

Στήλη 1: "*R. israeli*"

Στήλη 2: "*R. massilia*"

Στήλη 3: *R. conorii*

Στήλη 4: ΕΣ

Στήλη S: Δείκτης μοριακού βάρους DNA molecular weight marker V (σε kb).

Τα μοριακά βάρη σε ζεύγη βάσεων των κλασμάτων της υδρόλυσης με *Alu I*, *Rsa I* και *Pst I* παρουσιάζονται στους παρακάτω πίνακες.

Αποτελέσματα υδρόλυσης με *Alu I*
(σε ζεύγη βάσεων)

<i>ΕΣ</i>	<i>R. massilia</i>	<i>R. israeli</i>	<i>R. conorii</i>
178	178	130	130
94	94	92	92
88	88	82	82
45	45	44	44

Αποτελέσματα υδρόλυσης με *Rsa I*
(σε ζεύγη βάσεων)

<i>ΕΣ</i>	<i>R. massilia</i>	<i>R. israeli</i>	<i>R. conorii</i>
		390	390
		234	254
124	124		
112	112		
100	100		

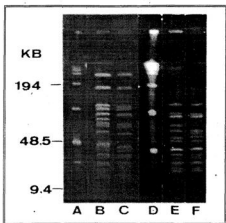
Αποτελέσματα υδρόλυσης με *Pst I*
(σε ζεύγη βάσεων)

<i>ΕΣ</i>	<i>R. massilia</i>	<i>R. israeli</i>	<i>R. conorii</i>
290	290	302	280
			234
225	225	137	
89	89		86
		82	

Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)

Το συνολικό ΜΒ του γενόματος του ΕΣ βρέθηκε 1.353 kb, ενώ εκείνο της "*R. massilia*" 1.370 kb.

Τα αποτελέσματα της υδρόλυσης με *Sma* I του ΕΣ, της "*R. massilia*", της *R. conorii* και της "*R. israeli*" φαίνονται στην φωτογραφία.



Φωτογραφία: PFGE μετά από υδρόλυση με *Sma* I.

Στήλη A: Low-range PFG Marker

Στήλη B: "*R. massilia*"

Στήλη C: ΕΣ

Στήλη D: Lambda Ladder PFG Marker

Στήλη E: *R. conorii*

Στήλη F: "*R. israeli*"

Η υδρόλυση με το περιοριστικό ένζυμο *Sma* I έδειξε ότι το ΕΣ (στήλη C) είχε μικρές διαφορές με την "*R. massilia*" (στήλη B). Συγκεκριμένα οι διαφορές των δύο στελεχών εντοπίζονται στα ζεύγη: 105/108, 90/86, 64/66, -/50, 12/-. Το ίδιο ένζυμο υδρόλυσε σε διαφορετικές θέσεις το γένομα της *R. conorii* (στήλη E) και της "*R. israeli*" (στήλη F).

Η υδρόλυση με το περιοριστικό ένζυμο *Eag* I έδειξε ότι το ΕΣ είχε όμοια κατανομή με αυτό της "*R. massilia*".

Με την επίδραση του Bss HII επισημάνθηκαν μικρές διαφορές ανάμεσα στο ΕΣ και την «*R. massilia*». Συγκεκριμένα με βάση τον πίνακα οι διαφορές των δύο στελεχών εντοπίζονται στα ζεύγη: 407/456 και 214/180.

Αποτελέσματα υδρόλυσης με Bss

HII

(σε χιλιάδες βάσεις)

<i>ΕΣ</i>	<i>R. massilia</i>
407	456
250	250
214	180
168	168
130	130
104	104
49	49



ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα τελευταία χρόνια ο ΜΚΠ κεντρίζει το ενδιαφέρον όλο και περισσότερων ερευνητών. Ένας από τους λόγους είναι ο αυξημένος αριθμός κρουσμάτων στις δεκαετίες του 1970 και 1980 (Segura & Font-Creus 1982; Mansueto et al., 1986). Υπόθυνοι για το γεγονός αυτό είναι ποικίλοι παράγοντες όπως η αυξημένη περιβαλλοντική θερμοκρασία, η αύξηση του αριθμού των σκύλων στις αστικές περιοχές και η αύξηση του πληθυσμού των κροτώνων (Esprejo et al., 1986; Raoult et al., 1992; Mansueto et al., 1986).

Οι αιτίες που συμβάλλουν στην αύξηση της συχνότητας της νόσου στον άνθρωπο είναι: η ύπαρξη του παθογόνου παράγοντα (*R. conorii*) στους κρότινες, οι πόε εντατικές ανταλλαγές ζώων σε διεθνή κλίμακα και ο τουρισμός σε ενδημικές περιοχές. Οι οροεπιδημιολογικές μελέτες μπορούν να προσφέρουν πολλά στην ανεύρεση του βαθμού μόλυνσης του πληθυσμού, στην επίτεια αναζήτηση πληροφοριών για την επισήμανση των συνθηκών που συμβάλλουν στη διατήρηση και εξάπλωση της νόσου αλλά και στην ανάλυση των στοιχείων νοσηρότητας (π.χ. δείκτες επιδημικότητας και ενδημικότητας) σε κάθε περιοχή ξεχωριστά.

Η ιδανική ορολογική δοκιμασία θα πρέπει να έχει πολύ υψηλά ποσοστά ευαισθησίας, ειδικότητας, θετικής και αρνητικής διαγνωστικής αξίας, καθώς επίσης να είναι εύχρηστη και απλή. Η αντίδραση Weil-Felix στερείται ευαισθησίας και ειδικότητας και έχει απορριφθεί από το σύνολο των εργαστηρίων (Kaplan & Schonberger 1986). Η δοκιμασία σύνδεσης συμπληρώματος και μικροσυγκόλλησης απαιτούν σημαντικές ποσότητες αντιγόνου και έχουν μικρή ευαισθησία οπότε δεν ενδείκνυται για οροεπιδημιολογικές μελέτες (Newhouse et al., 1979). Η δοκιμασία latex έχει μέτρια ευαισθησία και δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε λιπαμικούς ορούς. Η Elisa έχει αυξημένη ευαισθησία αλλά μειωμένη ειδικότητα (McDade 1991). Το line blot δεν αποφεύγει τις διασταυρούμενες αντιδράσεις και διαφέρει ελάχιστα από τον ΑΦ ως προς την ειδικότητα και την ευαισθησία. Οι μικρές απαιτήσεις σε αντιγόνο, η πολύ καλή ευαισθησία και η μέτρια ειδικότητα καθήρωσαν τον ΑΦ ως μέθοδο αναφοράς (WHO 1982). Κύριο μειονέκτημα της μεθόδου είναι η εμφάνιση διασταυρούμενων αντιδράσεων ανάμεσα στις διαφορετικές ομάδες των ρικετσιών (Ormsbee 1990; Philip et al., 1976; Hechemy et al., 1989) αλλά και με άλλα βακτήρια όπως τους *Proteus*, *Legionella bozemanii* και *L. micdadei* (Sompolinsky et al., 1986). Αντίθετα, τα αποτελέσματα του Western blot είναι πιο προσδιοριστικά και ειδικά από αυτά του ΑΦ. Οι αναλυτικές δυνατότητες που παρέχει η δοκιμασία του Western blot από την μία μεριά προσδιορίζουν με βεβαιότητα την διάγνωση λοίμωξης με *R. conorii* και από την άλλη μπορούν να θέσουν την υποψία λοίμωξης από άλλη ρικετσία της ΟΚΠ. Η βεβαία διάγνωση λοίμωξης με *R. conorii* ορίζεται από την ανεύρεση των ειδικών πρωτεϊνών MB 115- και 135-kDa (Specific Protein Antigens, SPA). Η υποψία λοίμωξης από άλλο είδος ρικετσιών της ΟΚΠ τίθεται με την ανεύρεση λιποπολυσακχαριτών. Οι ΑΠΕ των ρικετσιών που προκαλούν εξανθηματικούς τύπους είναι ειδικοί της ομάδας (Anacker et al., 1987; Vishwanath 1991). Το ξεχωριστό τους όμως από τους ΑΠΕ άλλων μικροοργανισμών (*Proteus*, *Legionella bozemanii*, *L. micdadei*) (Sompolinsky et al., 1986) δεν είναι δυνατό με τη δοκιμασία του Western blot. Παραταύτα η ανεύρεση ΑΠΕ αποτελεί χρήσιμο εύρημα γιατί συνιστά ένα από "σήμα" που προτρέπει στην αναζήτηση άλλων ρικετσιών της ομάδας που πιθανά κυκλοφορούν στην περιοχή.

Η δοκιμασία Western blot από ότι γνωρίζουμε δεν έχει χρησιμοποιηθεί μέχρι σήμερα σε επιδημιολογικές μελέτες στην διερεύνηση των ρικεττιώσεων. Η χρήση της στην εξέταση μεγάλου αριθμού ορών είναι επίπονη και χρονοβόρα. Εντούτοις λαμβάνοντας υπόψιν τα πλεονεκτήματα που εκθέσαμε παραπάνω θεωρήσαμε αναγκαία την χρησιμοποίηση της στην διερεύνηση του ΜΚΠ, νοσήματος που δεν έχει επαρκώς

μελετηθεί και ως εκ τούτου θεωρείται σπάνιο, και έτσι η περιγραφή μεμονωμένων κλινικών περιπτώσεων αποτελεί αξιόλογο υλικό δημοσίευσης.

Η εφαρμογή της δοκιμασίας Western blot στα 254 άτομα του δείγματος έδειξε ότι 115, δηλ. ποσοστό 45,3% είχαν αντισώματα έναντι των SPA. Γεγονός που δείχνει ότι μεγάλο μέρος του πληθυσμού εμφάνισε συμπτωματική ή ασυμπτωματική κλινική μορφή της νόσου κατά το παρελθόν. Τα αποτελέσματα επίσης δείχνουν ότι υπάρχουν αυξημένες πιθανότητες λοίμωξης από άλλα είδη ρικετσιών της ΟΚΠ, εφόσον ποσοστό 24,80% του πληθυσμού είχε αντισώματα έναντι του ΑΠΣ.

Κατά την διενέργεια επιδημιολογικών μελετών με τον ΑΦ, άλλοι ερευνητές θεωρούν σαν οριακό τίτλο το 1/32 και άλλοι το 1/64. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι με οριακό τίτλο 1/32 το ποσοστό των θετικών ορών είναι 57,5%, δηλ. κατά 12,2 μονάδες υψηλότερο εκείνου που εμφάνισε θετικές τις πρωτεΐνες SPA (45,3%). Από την άλλη όμως πλευρά παρατηρούμε ότι το ποσοστό των θετικών ορών που είχαν τίτλο μεγαλύτερο ή ίσο του 1/64 είναι περίπου ίδιο με εκείνο των ορών που είχαν αντισώματα έναντι των SPA (46,1% και 45,3% αντίστοιχα). Τα αποτελέσματα αυτά συγκρινόμενα με εκείνα άλλων μελετών που έχουν πραγματοποιηθεί σε άλλες Μεσογειακές χώρες δείχνουν ότι η συχνότητα του ΜΚΠ στην χώρα μας είναι από τις υψηλότερες (βλ. πίνακα και χάρτη στο τέλος του κεφαλαίου). Οι Raoult et al βρήκαν ότι 12%, 4,8% και 2,5% των κατοίκων της Ν. Κορσικής είχαν θετικούς τίτλους ΑΦ στις αραιώσεις 1/32, 1/64 και 1/128 αντίστοιχα (Raoult et al, 1985). Οι ίδιοι ερευνητές σε άλλη μελέτη που πραγματοποιήσαν στην Ν. Γαλλία βρήκαν ότι 18% του αστικού και αγροτικού πληθυσμού εμφάνιζαν θετικό τίτλο ΑΦ $\geq 1:32$ (Raoult et al, 1987). Στην Σεβίλλη οι Garcia-Curiel και συν βρήκαν ότι 26,3% του πληθυσμού είχαν αντισώματα έναντι της *R. conorii*. Στην Ιταλία το αντίστοιχο ποσοστό ήταν 10,6% (Mansueto et al, 1984). Η Bacellar στην Πορτογαλία ανέφερε ποσοστό 7,6% (Bacellar et al, 1991). Στην Τυνησία ο Kennou βρήκε 16,8% του γενικού πληθυσμού να έχει αντισώματα έναντι της *R. conorii* με οριακό τίτλο 1/20 και 12,7% με 1/40 (Kennou & Edlinger 1984). Η μοναδική μελέτη που αναφέρει υψηλότερη συχνότητα από την δική μας είναι εκείνη του Ruiz στην Σαλαμάνκα. Στην μελέτη αυτή το ποσοστό των κατοίκων που είχε τίτλο μεγαλύτερο ή ίσο 1/40 ανέρχεται σε 73,5% (Ruiz-Beltran & Herrero-Herrero et al, 1990).

Κλειδί για την ερμηνεία των ορολογικών αποτελεσμάτων που αναφέρθηκαν υπήρξε η αξιολόγηση των στοιχείων του ατομικού επιδημιολογικού δελτίου. Πιο αναλυτικά το επάγγελμα όπως κωδικοποιήθηκε στη μελέτη, δεν επηρέαζε σε στατιστικά σημαντικά επίπεδα τα αποτελέσματα των οροαντιδράσεων, αν και η πλειοψηφία των συμμετεχόντων (ΕΡΓ1 και ΕΡΓ2 = 72%) δήλωσε καθημερινή επαφή με ζώα (κτηνοτρόφοι, σφαγείς, γεωργοί). Αντίθετα η ύπαρξη σκύλων στο οικιακό ή εργασιακό περιβάλλον, όπως αναμενόταν, επηρέαζε σε στατιστικά επίπεδα την ανεύρεση οροθετικών ατόμων. Το γεγονός αυτό μπορεί να εξηγηθεί και την αξιοσημείωτη θετικότητα της ομάδας ΕΡΓ3, που δεν έχει επαφή με ζώα στον εργασιακό χώρο (43% με ΑΦ, 44,4% με Western blot). Όπως ο Herrero επισήμανε στην Ισπανία, συμπεραίνουμε ότι οι περιβαλλοντικοί παράγοντες κινδύνου είναι πύο σημαντικοί από τους επαγγελματικούς. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σημαντικά, κατά την γνώμη μας, διότι δείχνουν ότι ο βαθμός μόλυνσης στις αγροκτηνοτροφικές περιοχές που ελέγχθηκαν δεν εξαρτάται από την επαγγελματική έκθεση αλλά παρουσιάζει ευρεία διασπορά σε όλο τον πληθυσμό.

Ενισχυτικά της ευρείας διασποράς είναι και τα εξής : α) το φύλο και η ηλικία δεν επηρέαζαν σε στατιστικά σημαντικά επίπεδα την έκθεση των οροαντιδράσεων, β) ο τοπογραφικός χαρακτηρισμός των χωριών δεν επηρέαζε την ανεύρεση θετικών ορολογικών αντιδράσεων. Τα προαναφερθέντα συμπεράσματα έρχονται σε πλήρη συμφωνία με αντίστοιχα άλλων συγγραφέων (Raoult & Tissoi-Dupont et al, 1992; Herrero et al, 1984; Mansueto et al, 1984).

Η διαγνωστική αξία του ΑΦ προσδιορίζεται από τον οριακό τίτλο. Σε περιοχές υψηλής ενδημικότητας όπως είναι η περιοχή που μελετήθηκε, ως οριακός τίτλος προσδιορίζεται η αραιώση 1/512. Ο τίτλος αυτός είναι η μικρότερη αραιώση που ορίζει το 98% του πληθυσμού ως αρνητικό. Η οριακή αυτή αραιώση συγκρινόμενη με εκείνη όλων των προηγούμενων μελετών (Raoult et al., 1987; Gross et al., 1983; Mansueto et al., 1984; Raoult et al., 1985; Ruiz et al., 1990; Bacellar et al., 1991; Kennou & Edlinger 1984; Botros et al., 1989; Psitakis et al., 1983) είναι υψηλότερη. Με τόσο υψηλό όμως οριακό τίτλο, η διαγνωστική αξία του ΑΦ σε ένα μόνο ορό είναι μικρή (Herrero et al., 1991).

Όταν η αραιώση 1/32 ορίζεται ως οριακός τίτλος, η ευαισθησία και η αρνητική διαγνωστική αξία παίρνει την τιμή 100%. Αντίθετα με οριακό τίτλο 1/128, ενώ η ειδικότητα και η θετική διαγνωστική αξία αποκτούν παραδεκτές τιμές (98,6% και 96,4%, αντίστοιχα), η ευαισθησία και η αρνητική διαγνωστική αξία μειώνονται κάτω του 50% και 70% αντίστοιχα. Μόνο η αραιώση 1/64 δίνει αποδεκτές τιμές ευαισθησίας (89,6%), ειδικότητας (89,9%), θετικής (88,0%) και αρνητικής (91,2%) διαγνωστικής αξίας. Τα δεδομένα αυτά δείχνουν ότι η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων του ΑΦ εξαρτάται κάθε φορά από τον χρησιμοποιούμενο οριακό τίτλο. Στην αξιολόγηση ορού αρρώστου, η ευαισθησία και η αρνητική διαγνωστική αξία αποκτούν ιδιαίτερη βαρύτητα και επιβάλλουν την χρησιμοποίηση της αραιώσης 1/32. Όταν όμως ζητείται να επιβεβαιωθεί αναδρομικά ο ΜΚΠ, η βαρύτητα μετατοπίζεται στην ειδικότητα και την θετική διαγνωστική αξία, γιατί έτσι μόνο παρέχεται η δυνατότητα ανίχνευσης αληθινών θετικών περιστατικών. Γι'αυτό στις οροεπιδημιολογικές μελέτες καταλληλότερος είναι ο τίτλος 1/128. Η αξιολόγηση ενός θετικού αποτελέσματος στον ΑΦ είναι διαφορετική αν ο ορός προέρχεται από ενδημική ή μη περιοχή.

Στις οροεπιδημιολογικές μελέτες η θετική και η αρνητική διαγνωστική αξία εξαρτώνται από τον επιπολασμό που εμφανίζει το μελετούμενο νόσημα στην δεδομένη γεωγραφική περιοχή. Η εξάρτηση αυτή ισχύει παρά το γεγονός ότι η ειδικότητα και η ευαισθησία δεν σχετίζονται με την συχνότητα της νόσου. Ως εκ τούτου θεωρούμε ότι ο ΑΦ μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε οροεπιδημιολογικές μελέτες μόνο σε περιοχές που ο επιπολασμός έχει ήδη προσδιορισθεί. Μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί στην προκαταρκτική διάλογη ορών από τράπεζες αίματος, με οριακό τίτλο 1/32, για να δοθεί έμφαση στην ευαισθησία και στην αρνητική διαγνωστική αξία. Η επιλεκτική χρήση οριακού τίτλου έχει ήδη προταθεί από τον Hechemy (1979).

Οι δυσκολίες αξιολόγησης των αποτελεσμάτων του ΑΦ τονίζουν ακόμη περισσότερο την αξία της δοκιμασίας Western blot. Το Western blot αποτελεί σήμερα δοκιμασία επιλογής για τις οροεπιδημιολογικές μελέτες, παρά τις δυσκολίες που συνεπάγεται η εφαρμογή και εκτέλεσή της (Teysseire & Raoult 1992).

Από τα αποτελέσματα της οροεπιδημιολογικής μελέτης, προκύπτει ότι το 5,5% των ορών που εξετάσθηκαν είχε αντισώματα έναντι του LPS. Όπως ήδη προαναφέρθηκε, τα αντισώματα αυτά υποδηλώνουν πιθανή λοίμωξη από άλλα είδη ρικετιών ή την ύπαρξη διασταυρούμενων αντιδράσεων με *Proteus* και *Legionella*. Η περαιτέρω διερεύνηση του αιτιολογικού παράγοντα με την δοκιμασία Western blot προϋποθέτει την διαδοχική χρησιμοποίηση κάθε φορά άλλου είδους ρικετίαιας ως αντιγόνου. Εναλλακτικά είναι επίσης δυνατόν να αναζητηθούν στους φυσικούς τους φορείς, δηλ. τους κρότωνες, οι κυκλοφορούσες στην υπό εξέταση περιοχή ρικετίαιες. Θεωρήσαμε ότι η δεύτερη επιλογή ήταν προτιμότεα, γιατί εμφανίζει το προτέρημα της άμεσης ανίχνευσης ή απομόνωσης των αιτιολογικών παραγόντων που υπάρχουν στην περιοχή. Για τον σκοπό αυτό συλλέχθηκαν 242 κρότωνες από την ευρύτερη περιοχή που έγινε η οροεπιδημιολογική μελέτη (τα τρία χωριά της οροεπιδημιολογικής μελέτης και άλλα τρία γειτονικά).

Η εφαρμογή της κλασικής τεχνικής της αιμολέμφου δεν επέτρεψε την ανίχνευση καμίας ρικετίσας από τους κρότωνες. Η τεχνική αυτή έχει χρησιμοποιηθεί από αρκετούς ερευνητές. Η αναζήτηση των ρικετιών γίνεται είτε μετά από χρώση της αιμολέμφου με Gimenez είτε με ΕΑΦ. Όσο η πρώτη όσο και η δεύτερη επιλογή, εμφανίζουν μειονεκτήματα. Η πρώτη επειδή εκτός από τις ρικετίσες και άλλα βακτήρια κρατούν την βασική φουζίνη κατά την χρώση Gimenez. Η δεύτερη μέθοδος είναι πιο ευαίσθητη, αλλά η ειδικότητα εξαρτάται από το χρησιμοποιούμενο αντίσωμα. Με την χρησιμοποίηση μονοκλωνικών αντισωμάτων θα ήταν εφικτή η αποφυγή των διασταυρωμένων αντιδράσεων, όχι όμως η βελτίωση της ευαισθησίας. Ο Dobson σε πρόσφατη μελέτη χρησιμοποίησε την Elisa (sandwich Elisa) για την ανίχνευση *R. typhi* στην αιμολέμφο ψύλλων και ισχυρίζεται ότι, εκτός από την ευαισθησία, η τεχνική εμφανίζει και υψηλή ειδικότητα (Dobson et al., 1989).

Τα αποτελέσματα της εργασίας μας δείχνουν ότι η ανίχνευση ρικετιών στους κρότωνες με την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης της DNA πολυμεράσης (PCR) εμφανίζει μεγάλη ευαισθησία, εφόσον με την μέθοδο αυτή ανιχνεύθηκε η ύπαρξη ρικετιών σε κρότωνα που συλλέχθηκε από το χωριό Λευκαδίτι. Το στελέχος αυτό ονομάστηκε Ελληνικό Στέλεχος (ΕΣ), επειδή είναι η πρώτη ρικετία που απομονώθηκε στην Ελλάδα. Η τεχνική PCR έχει ήδη χρησιμοποιηθεί από τους Webb et al. για την ανίχνευση της *R. typhi* από ψύλλους και από τους Gage et al. για την ανίχνευση της *R. rickettsii* σε κρότωνα (Webb et al., 1990; Gage et al., 1992). Οι παραπάνω όμως μελέτες αφορούν την ανίχνευση ρικετιών σε αρθρώποδα που μολύνθηκαν πειραματικά με πρότυπα στελέχη ρικετιών στο εργαστήριο. Η παρούσα εργασία είναι η πρώτη επιτυχημένη εφαρμογή της PCR σε μολυσμένα αρθρώποδα του περιβάλλοντος. Η εφαρμογή της PCR εκτός από αυξημένη ευαισθησία εμφανίζει και υψηλή ειδικότητα. Η υψηλή ειδικότητα της μεθόδου οφείλεται στην δυνατότητα επιλογής των εναρκτών. Η προκαταρκτική ανίχνευση των ρικετιών, επιτυγχάνεται με την χρησιμοποίηση εναρκτών της κεντρικής συνθέσεως που πολλαπλασιάζουν γενεαμικρές αλληλουχίες των ρικετιών και όχι άλλων βακτηρίων (Regnery et al., 1991). Το θετικό αποτέλεσμα κατά την προκαταρκτική φάση επιβεβαιώνεται με την εμφάνιση αλληλουχίας μοριακού βάρους 381 bp στην ηλεκτροφόρηση ηλεκτρικής αφαρόζης. Εκτός όμως από τα πλεονεκτήματα της ευαισθησίας ή της ειδικότητας η PCR παρέχει την δυνατότητα ανίχνευσης ζωντανών ή νεκρών ρικετιών σε αφυδατωμένους ή διατηρημένους σε αλκοόλη κρότωνα. Η ευχέρεια αυτή καθιστά την μέθοδο PCR καταλληλότερη για την εκτέλεση επιδημιολογικών ερευνών διότι μειώνει τους κινδύνους που προκύπτουν από την διατήρηση και μεταφορά των μολυσμένων αρθρώποδων από το φυσικό περιβάλλον στο εργαστήριο.

Τα αποτελέσματα της PCR επιβεβαιώθηκαν με την μέθοδο ταχείας καλλιέργειας των ρικετιών (shell-vial). Η καλλιέργεια βρέθηκε θετική στον ίδιο κρότωνα που ήταν θετικός στο PCR. Η μέθοδος αυτή αποτελεί παραλλαγή της ταχείας καλλιέργειας του CMV (Paya et al., 1987). Το θετικό αποτέλεσμα δυνατόν να εμφανισθεί σε 48 ώρες, ενώ η καλλιέργεια σε αυγά απαιτεί 5 έως 7 ημέρες (Cox 1942). Οι ταχείες καλλιέργειες έχουν εφαρμοσθεί με επιτυχία για την απομόνωση ρικετιών από φυσικά μολυσμένους κρότωνα σε πολλές γεωγραφικές περιοχές (Kelly & Mason 1991; Peter et al., 1990; Kelly & Mason 1990; Beati & Ereemeeva et al., 1992; Fan et al., 1988; Beati et al., 1993). Η συμβολή της στην εξέλιξη της ρικετιολογίας είναι σημαντική. Στην παρούσα μελέτη το ποσοστό των θετικών κροτώνων ήταν χαμηλό (1/242, 0,4%) και δεν συμβαδίζει με τον υψηλό επιπολασμό των κατοίκων (45,3%). Ανάλογη μελέτη στην Γαλλία (Raoult et al., 1993) έδειξε ότι σε περιοχή που η συχνότητα του ΜΚΠ ήταν 6,7%, το ποσοστό των μολυσμένων κροτώνων έφτανε το 14,8%. Στην ενδομική περιοχή του Ν. Φωκίδας θα περίμενε κανείς να ήταν υψηλότερο. Το χαμηλό ποσοστό που βρήκαμε θα μπορούσε να εξηγηθεί από την ύπαρξη αίματος στους

κρότωναες που όπως είναι γνωστό αναστέλλει την δράση της πολυμεράσης (Higuchi 1989). Η παράλληλη όμως εφαρμογή της shell-vial αναιρεί την υπόθεση αυτή.

Η ταυτοποίηση των ρικετσιών μπορεί να πραγματοποιηθεί με την εφαρμογή διαφόρων μεθόδων. Αρχικά, οι ρικετίες της ΟΚΠ ταξινομήθηκαν με βάση τη γεωγραφικά κριτήρια και την κλινική συμπτωματολογία της νόσου. Ορολογικές τεχνικές, όπως η σύνδεση συμπληρώματος και η δοκιμασία εξουδετέρωσης της τοξίνης (toxins neutralization test), επέτρεψαν την διαφοροποίηση των ρικετσιών της ΟΚΠ σε ορότυπους, οροομάδες και στελέχη. Η ορολογική ταυτοποίηση σύμφωνα με την τεχνική του Philip (1978) αποτελεί σήμερα την μέθοδο αναφοράς για την ΟΚΠ. Η μέθοδος αυτή απαιτεί ελάχιστα υλικά και μόνο μικρή ποσότητα ρικετσιών (περίπου μια φλάσκα 150-cm² για κάθε στέλεχος). Η έλλειψη ανοσοορών στο εμπόριο καθιστά την εκτέλεση της δοκιμασίας αυτής επίπονη και μερικές φορές επικίνδυνη, επειδή απαιτεί την παραγωγή τους στο εργαστήριο με ανοσοποίηση πειραματόζωων. Η προϋπόθεση αυτή περιορίζει την εφαρμογή της μόνο σε εξειδικευμένα εργαστήρια. Σύμφωνα με την εφαρμογή της στην μελέτη μας το Ελληνικό Στέλεχος (ΕΣ) είχε τον ίδιο ορότυπο (SPD + 3) με την «*R. massilia*» που απομονώθηκε μόλις πριν ένα χρόνο στην Ν. Γαλλία (Beati & Fimidori et al., 1992).

Είναι γνωστό ότι με την εφαρμογή του SDS-PAGE οι πρωτεϊνικές κατατομές είναι δυνατόν να αλλοιωθούν από την θερμοκρασία και τις συνθήκες διαλυτοποίησης (Li et al., 1988; Li & Walker 1990). Για τον λόγο αυτό καλλιεργήθηκαν, καθαρίστηκαν και αναλύθηκαν με SDS-PAGE οι ρικετίες «*R. massilia*», «*R. conorii*» και «*R. israelii*», παράλληλα με το ΕΣ για καλύτερη σύγκριση. Τελικά το ΕΣ εμφανίζει την ίδια πρωτεϊνική κατατομή με την «*R. massilia*». Επίσης η κατατομή των ανοσοποιητικών πρωτεϊνών του ΕΣ ήταν ίδια με εκείνη της «*R. massilia*» κατά την εκτέλεση της δοκιμασίας Western blot. Αν και το Western blot χαρακτηρίζεται από τα μειονεκτήματά του SDS-PAGE η εφαρμογή του αποτέλεσε ένα επιπλέον στοιχείο ορολογικής ταυτότητας του ΕΣ με την «*R. massilia*» και διαφοροποίησής του από τις «*R. conorii*» και «*R. israelii*».

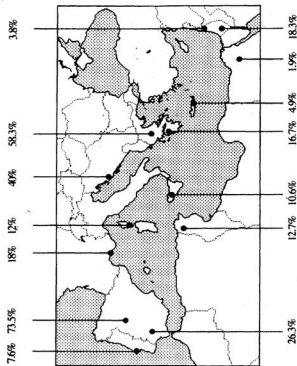
Από τις υπάρχουσες τεχνικές μοριακής βιολογίας προτιμήσαμε την εφαρμογή της PCR σε συνδυασμό με την υδρόλυση με περιοριστικά ένζυμα (PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism) και την ηλεκτροφόρηση με ώση πεδίου (PFGE). Οι μέθοδοι αυτές προσδιορίζουν με μεγαλύτερη ακρίβεια την γενομική ομοιότητα ρικετσιών με ένα από τα στελέχη αναφοράς από ότι ο ιβριδισμός DNA-DNA (Manor et al., 1992; Regnery et al., 1991). Δεδομένου ότι το υπό ταυτοποίηση ΕΣ ανήκε ορολογικά στην ΟΚΠ προερχόσαμε ευθύς εξαρχής στον πολλαπλασιασμό του με εναρκτης της 190-kDa πρωτεΐνης, που είναι ειδικός της ομάδας, και όχι με εναρκτης της κτιρικής συνθετάσης, που πολλαπλασιάζουν όλες τις ομάδες των ρικετσιών (Regnery et al., 1991). Κατά την εφαρμογή της PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism το ΕΣ βρέθηκε γενετικά ταυτόσημο με την «*R. massilia*» και διαφορετικό από τις άλλες ρικετίες της ΟΚΠ.

Το μειονέκτημα όμως της PCR είναι ότι βασίζεται στην σύγκριση μόλις του 2% του συνολικού γενώματος του μικροοργανισμού. Για την πληρέστερη εξαγωγή των συμπερασμάτων εφαρμόσαμε την ηλεκτροφόρηση με ώση πεδίου (PFGE). Η μέθοδος αυτή αν και είναι πιο χρονοβόρα και επίπονη από το PCR-RFLP, θεωρείται πιο ακριβής. Το συνολικό MB του γενώματος του ΕΣ βρέθηκε περίπου ίσο με αυτό της «*R. massilia*» (1.353 και 1.370 kb, αντίστοιχα). Στη συνέχεια, η υδρόλυση με το περιοριστικό ένζυμο Eag I έδειξε ότι το ΕΣ έχει όμοια κατατομή με αυτό της «*R. massilia*». Αντίθετα η επίδραση των *Bss* HII και *Sma* I αποκάλυψε μικρές διαφορές ανάμεσα στις δύο ρικετίες.

Το ελληνικό στέλεχος της «*R. massilia*» απομονώθηκε από τον κρότωνα «*R. sanguineus*», ενώ το γαλλικό από τον κρότωνα «*R. turanicus*» (Beati & Ereemeeva et al., 1992). Τα 2 αυτά είδη είναι γνωστοί ανθρωπόφιλοι κρότωναες. Επομένως η «*R. massilia*» μπορεί να μεταδοθεί στον άνθρωπο και να προκαλέσει τον σχηματισμό αντισωμάτων που δίνουν

διασταυρούμενες αντιδράσεις κατά την εκτέλεση των διαγνωστικών ορολογικών δοκιμασιών και να οδηγήσει σε κακή ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

Συνοψίζοντας καταλήγουμε στο γεγονός ότι ο ΜΚΠ υπάρχει στην Ελλάδα με αυξημένη συχνότητα σε αγροτοκτηνοτροφικές περιοχές, χωρίς να σχετίζεται με το φύλο, την ηλικία και το επάγγελμα. Η εφαρμογή της δοκιμασίας Western blot για πρώτη φορά σε οροεπιδημιολογικές έρευνες την καθιστά μέθοδο επιλογής. Όταν χρησιμοποιείται ο έμμεσος ανοσοφθορισμός, θα πρέπει ο οριακός τίτλος (*cut off*) να προσαρμόζεται ανάλογα με την σκοπιμότητα εφαρμογής της μεθόδου. Το PCR μπορεί να εφαρμοσθεί με αξιοπιστία για την ανίχνευση ρικετσιών όχι μόνο από πειραματικά αλλά και από φυσικά μολυσμένους κρότωνες, παρουσιάζοντας ευαισθησία ίδια με εκείνη της ταχείας καλλιέργειας (*shell-vial*). Για πρώτη φορά στον Ελλαδικό χώρο απομονώθηκε και ταυτοποιήθηκε στέλεχος ρικέτσιας. Το ελληνικό στέλεχος ανήκει στο είδος "*R. massilia*" και φορέας του είναι ο κρότωνας *Rh. sanguineus*.



Χάρτης της Μεσογείου με την συλλήψα του Μικροβιακού Κληιδόσου Πυρετού για κάθε χώρα

Χώρα	Συχνότητα	Τεχνική	Ελάχιστος θετικός τίτλος	Ετος	Συγγραφείς
Γαλλία (Κορσική)	12	AΦ (IgG)	32	1985	Raoult
Γαλλία (Κορσική)	4.8	AΦ (IgG)	64	1985	Raoult
Γαλλία (Κορσική)	2.5	AΦ (IgG)	128	1985	Raoult
Γαλλία (Νότια)	18	AΦ (Συνολικός Ig)	32	1987	Raoult
Ισπανία (Σεβίλλη)	26.3	AΦ	?	1984	Garcia-Curiel
Ισπανία (Σαλαμανκά)	73.5	AΦ	40	1990	Ruiz-Beltran
Πορτογαλία	7.6	?	?	1991	Bacellar
Τυνησία	16.8	AΦ	20	1984	Kennou
Τυνησία	12.7	AΦ	40	1984	Kennou
Αίγυπτος	1.9	AΦ (Συνολικός Ig)	40	1989	Botros
Ισραήλ	18.3	AΦ (Συνολικός Ig)	40	1983	Gross
Ισραήλ	3.8	AΦ (Συνολικός Ig)	40	1990	Yagupsky
Γουατεμάλα	40	AΦ	40	1984	Mansueto
Ελλάδα	16.7	Συγκόλληση Giroud	1600	1972	Δούκα- Σεγδίτσα
Ελλάδα (Κρήτη)	4.9	?	?	1983	Ψυστάκης

Πίνακας : Η συχνότητα της *R. conorii* στις χώρες της Μεσογείου.

AΦ: Ανοσοφθορισμός

ΠΕ: παρούσα εργασία

WB: Western blot

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στη μελέτη αυτή εξετάστηκε οροεπιδημιολογικά ο ΜΚΠ στην περιοχή του Ν. Φωκίδας. Η διερεύνηση αφορούσε την αναζήτηση αντισωμάτων από ορούς δείγματος γενικού πληθυσμού και επεκτάθηκε και στην αναζήτηση των κυκλοφορούντων ρικετσιών σε αρθρόποδα της περιοχής με απώτερο στόχο την απομόνωση ρικετσίας. Για τον σκοπό αυτό εφαρμόστηκαν τόσο κλασσικές τεχνικές όσο και τεχνικές Μοριακής Βιολογίας. Στην μελέτη έγινε σύγκριση των τεχνικών και αξιολόγησή τους ως προς την διαγνωστική τους αξία. Για τον σκοπό αυτό:

- α) έγινε συλλογή ορών και συμπλήρωση του επιδημιολογικού δελτίου
- β) εξετάστηκαν οι οροί με τις τεχνικές του ανοσοφθορισμού (ΑΦ) και του Western blot με αντιγόνο που παρήχθηκε στο εργαστήριο.
- γ) έγινε σύγκριση των αποτελεσμάτων των δύο τεχνικών που χρησιμοποιήθηκαν
- δ) έγινε συλλογή και ταξινόμηση των κροτώνων στην περιοχή με στόχο την απομόνωση και ταυτοποίηση ρικετσιών.
- ε) Η προσπάθεια ταυτοποίησης έγινε με κλασσικές (SDS-PAGE, Western blot, μέθοδος Philip) και σύγχρονες (PCR-RFLP, PFGE) τεχνικές.

Η μελέτη έδειξε ότι:

- Ο ΜΚΠ όχι μόνο υπάρχει στην Ελλάδα αλλά και ότι η συχνότητά του είναι ιδιαίτερα υψηλή σε αγροτοκτηνοτροφικές περιοχές. Η ύπαρξη αντισωμάτων έναντι της *R. conorii* δεν σχετίζεται με το φύλο, την ηλικία και το επάγγελμα.
- Η μελέτη επίσης δείχνει για πρώτη φορά ότι η εφαρμογή της δοκιμασίας Western blot σε οροεπιδημιολογικές έρευνες αποτελεί μέθοδο επιλογής.
- Η ερμηνεία του ΑΦ προϋποθέτει την χρησιμοποίηση οριακού τίτλου, ανάλογοι κάθε φορά με την σκοπιμότητα εφαρμογής της.
- Το PCR μπορεί να εφαρμοσθεί με αξιοπιστία για την ανίχνευση ρικετσιών όχι μόνο από πειραματικά αλλά και από φυσικά μολυσμένους κρότωνες.
- Η ευαισθησία του PCR είναι ίδια με εκείνη της ταχείας καλλιέργειας (shell-vial).
- Απομονώθηκε και ταυτοποιήθηκε για πρώτη φορά στέλεχος ρικετσίας στον Ελλαδικό χώρο. Η ταυτοποίηση της ρικετσίας αυτής έδειξε ότι ανήκει στο είδος "*R. massiliae*".
- Φορέας της «*R. massiliae*» είναι ο κρότωνας *R. sanguineus*

SUMMARY

A seroepidemiological study of Mediterranean Spotted Fever in the prefecture of Fokis is described here. The investigation included the examination of serum samples from among the local population, in regard to detecting specific antibodies and the identification of rickettsiae carried by arthropod vectors of the area and having the isolation of rickettsiae as its main goal. For this purpose classic methods were applied as well as molecular biology techniques. A comparison of the different methods and their evaluation was also done in this study the above things involved:

- a) Collection of the serum samples and filling an epidemiological survey
- b) The serums were tested by applying the methods of immunofluorescence and Western blot using an antigen prepared in our laboratory.
- c) The comparison of the results provided by the above mentioned techniques
- d) The collection and the taxonomic study of the ticks found in the region, aiming to the isolation and identification of rickettsiae.
- e) The use of classic (SDS-PAGE, Western blot, Philip's) and contemporary (PCR-RFLP, PFGE) methods for the purpose of identification.

On the basis of the above results we concluded that:

- Mediterranean Spotted Fever not only exist in Greece but also its prevalence is high in agricultural areas. The presence of antibodies against *R. conorii* is not related to sex, age or profession
- The study also shows for the first time that the application of the Western blot techniques is a method of choice for seroepidemiological research.
- The interpretation of the results obtained by using the immunofluorescence presupposes the use of lower cut off titer each time related to the purpose of the application of the method.
- PCR is a method that can give definite results regarding rickettsial identification not only from experimentally infected ticks, but also from naturally infected ones.
- The sensitivity of the PCR is the same as that of the shell-vial technique
- For the first time a rickettsial strain was isolated and identified in Greece. The specific rickettsiae was identified as belonging to the "*R. massilia*" species
- The vector of the be "*R. massilia*" is the tick *Rh. sanguineus*.



ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Allardet-Servent, A., Bourg, G., Ramuz, M., Pages, M., Bellis, M., Roizes, G. DNA polymorphism in strains of the genus *Brucella*. *J. Bacteriol.* 170:4603-4607, 1988.
- Allison, A.C. and Perkins, H.R. Presence of cell walls like those of bacteria in rickettsiae. *Nature* 188(4753):796-798, 1960.
- Amano, K.I., Tamura, A., Ohashi, N., Urakami, H., Kaya, S. and Fukushi, K. Deficiency of peptidoglycan and lipopolysaccharide components in *Rickettsia tsutsugamushi*. *Infect.Immun.* 55(9):2290-2292, 1987.
- Amano, K.I., Williams, J.C., Missler, S.R. and Reinhold, V.N. Structure and biological relationships of *Coxiella burnetii* lipopolysaccharides. *J.Biol.Chem.* 262(10):4740-4747, 1987.
- Anacker, R.L., Mann, R.E. and Gonzales, C. Reactivity of monoclonal antibodies to *Rickettsia rickettsii* with spotted fever and typhus group rickettsiae. *J.Clin.Microbiol.* 25(1):167-171, 1987.
- Anderson, B.E. and Tzianabos, T. Comparative sequence analysis of a genus-common Rickettsial antigen gene. *J.Bacteriol.* 171(9):5199-5201, 1989.
- Anderson, B.E. The 17-Kilodalton protein antigens of spotted fever and typhus group Rickettsiae. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 590:326-333, 1990.
- Anderson, B.E., McDonald, G.A., Jones, D.C. and Regnery, R.L. A protective protein antigen of *Rickettsia rickettsii* has tandemly repeated, near identical sequences. *Infect.Immun.* 58(9):2760-2769, 1990.
- Anderson, B.E., Regnery, R.L., Carlone, G.M., Tzianabos, T., McDade, J.E., Fu, Z.Y. and Bellini, W.J. Sequence analysis of the 17-Kilodalton-antigen gene from *Rickettsia rickettsii*. *J.Bacteriol.* 169(6):2385-2390, 1987.
- Anderson, J.F., Magnarelli, L.A., Casper, E.A. and Philip, R.N. Importation into the United States from Africa of *Rhipicephalus simus* on a boutonniere fever patient. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 897-899, 1981.
- Aurelius, E., Johansson, B., Skoldenberg, B., Staland, A. and Forsgren, M. Rapid diagnosis of herpes simplex encephalitis by nested polymerase chain reaction assay of cerebrospinal fluid. *Lancet* 337:189-192, 1991.
- Azad, A.F., Webb, L., Carl, M. and Dasch, G.A. Detection of rickettsiae in arthropod vectors by DNA amplification using the polymerase chain reaction. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 590:557, 1990.
- Bacellar, F., Nuncio, M.S., Rehacek, J. and Filipe, A.R. Rickettsiae and rickettsioses in Portugal. In: *Rickettsiae and Rickettsial diseases*, edited by Kazar, J. and Raoult, D. Bratislava: Slovak Academy of Sciences, 1991, p. 451.
- Bacellar, F., Nuncio, M.S., Rehacek, J. and Filipe, A.R. Rickettsiae and Rickettsioses in Portugal. *Eur.J.Epidemiol.* 7(3):291-293, 1991.
- Balayeva, N.M. Approaches to the molecular epidemiology of rickettsioses. *Eur.J.Epidemiol.* 5(4):414-419, 1989.
- Beati, L., Ereemeeva, M.E., Yu, X.J., Tissot-Dupont, H. and Raoult, D. *Rickettsia massiliae*. *Am. Soc. Rick.Rick.Dis.* 1992.
- Beati, L., Pinidori, J.P. and Raoult, D. First isolation of *Rickettsia slovaca* from *Dermacentor marginatus* in France. *Am J Trop Med Hyg* 48(2):257-268, 1993.

- Beati, L., Finidori, J.P., Gilot, B. and Raoult, D. Comparison of serologic typing, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis protein analysis, and genetic restriction fragment length polymorphism analysis for identification of Rickettsiae: Characterization of two new rickettsial strains. *J.Clin.Microbiol.* 30(8):1922-1930, 1992.
- Beati, L., Peter, O., Burgdorfer, W., Aeschlimann, A. and Raoult, D. Confirmation that *Rickettsia helvetica* sp.nov. is a distinct species of the spotted fever group of rickettsiae. *Int.J.Syst.Bact.* 43(3):521-526, 1993.
- Beati, L., Teysseire, N. and Raoult, D. Kinetics of specific antibodies in mediterranean spotted fever determined by western-blotting. Its use in seroepidemiology. In: *Rickettsiae and Rickettsial diseases*, edited by Kazar, J. and Raoult, D. Bratislava: Slovak Academy of Sciences, 1991, p. 609.
- Beati, L., Teysseire, N. and Raoult, D. Kinetics of specific antibodies in mediterranean spotted fever determined by Western Blotting and microimmunofluorescence. *Acta virol.* 36:62-66, 1992.
- Bell, E.J. and Stoenner, H.G. Immunologic relationships among the spotted fever group of rickettsias determined by toxin neutralization tests in mice with convalescent animal serums. *J. Immunol.* 84:171-182, 1960.
- Bell, E.J., Kohls, G.M., Stoenner, H.G. and Lackman, D.B. Nonpathogenic rickettsias related to the spotted fever group isolated from ticks, *Dermacentor variabilis* and *Dermacentor andersoni* from eastern Montana. *J.Immunol.* 90:770-781, 1963.
- Bella, F., Espejo-Arenas, E., Uriz, S., Serrano, J.A., Alegre, M.D. and Tort, J. Randomized Trial of 5-Day Rifampin versus 1-Day Doxycycline Therapy for Mediterranean Spotted Fever. *J.Infect.Dis.* 164(August):433-434, 1991.
- Bierent, P. Au sujet des lesions oculaires provoquées par des rickettsies et des neorickettsies. *Bull.Soc.Path.Exot.* 59:167-172, 1966.
- Bierent, P. Les affections oculaires des rickettsioses chroniques. *Rev Medecine* 6:331-336, 1971.
- Birkelund, S., Stephens, R. S. Construction of physical and genetic maps of *Chlamydia trachomatis* serovar L2 by pulsed-field gel electrophoresis. *J. Bacteriol.* 174:2742-2747, 1992.
- Black, C.M., Tzianabos, T., Roumillat, L.F., Redus, M.A., McDade, J.E. and Reimer, C.B. Detection and characterization of mouse monoclonal antibodies to epidemic typhus rickettsiae. *J.Clin.Microbiol.* 18(3):561-568, 1983.
- Blanc G. et Caminopetros J. *Arch. de l'Inst. Pasteur de Tunis.* t. 20:343. 1932.
- Boinet, and Pieri, J. Epidemies d'exantheme infectieux de nature indeterminee. *La Pres.Med.* 89:3-15, 1927.
- Bonduelle, M. and Lormeau, G. Les manifestations neurologiques des rickettsioses. *Rev Medecine* 6:311-322, 1971.
- Bonnet, J.L., Marigny, G. and Seigneurin, J.M. Forme monosymptomatique de rickettsiose a *Rickettsia conorii* a atteinte oculaire pure. *Bull.Soc.Path.Exot.* 62(2):1006-1011, 1969.
- Botros, B.A.M., Soliman, A.K., Darwish, M., El Said, S., Morrill, J.C. and Ksiazek, T.G. Seroprevalence of Murine Typhus and Fievre Boutonneuse in Certain Human Populations in Egypt. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 92:373-378, 1989.

- Boucaud-Maitre, Y., Cloppet, H. and Quenin, P. Seroepidemiology of rickettsiosis in center-east French departements from 1984 to 1986. *Sci.Vet.Med.Comp.* 90:109-116, 1988.
- Bourgeade, A., Jean-Pastor, M.J. and Raoult, D. Notes sur la fièvre boutonneuse méditerranéenne (A propos de 40 cas récents, à Marseille). *Bull.Soc.Path.Exot.* 308-314, 1979.
- Bovarnick, M.R., Schneider, L. and Walter, H. The incorporation of labeled methionine by typhus rickettsiae. *Bioch.Bioph.Acta* 33:414-422, 1959.
- Brill, N. A study of seventeen cases of diseases clinically resembling typhoid fever, but without the Widal reaction. *N. Y. Med. J.* 1898.
- Brill, N.E. An acute infectious disease of unknown origin: a clinical study based on 221 cases. 1910.
- Brosch, R., Buchrieser, C. and Rocoirt, J. Subtyping of *Listeria monocytogenes* serovar 4b by use of low-frequency-cleavage restriction endonucleases and pulsed-field gel electrophoresis. *Res.Microbiol.* 142:667-675, 1991.
- Brouqui, P., Dupont, H.T., Drancourt, M., Bourgeade, A. and Raoult, D. Spotless boutonneuse fever. *Clin.Infect.Dis.* 14:114-116, 1992.
- Burgdorfer, W. A review of Rocky Mountain spotted fever (tick-borne typhus), its agent, and its tick vectors in the United States. *J. Med. Entomol.* 12: 269-78, 1975.
- Burgdorfer, W., Aeschlimann, A., Peter, O., Hayes, S.F. and Philip, R.N. *Ixodes ricinus* vector of a hitherto undescribed spotted fever group agent in Switzerland. *Acta Trop.* 36:357-367, 1979.
- Caminopetros, J. and Contos, B. Transmission de la fièvre boutonneuse au cobaye. Extrait des Comptes Rendus des Seances de la Societe de Biologie 195(12):1932.
- Carl, M., Tibbs, C.W., Dobson, M.E., Paparello, S., Dasch, G. A. Diagnosis of acute typhus infection using the polymerase chain reaction. *J. Infect. Dis.* 161: 791-793, 1990.
- Carle, G.F. and Olson, M.V. An electrophoretic karyotype for yeast. *Proc.Nat'l.Acad.Sci.* 82:3756-3760, 1985.
- Carle, G.F., Frank, M. and Olson, M.V. Electrophoretic separations of large DNA molecules by periodic inversion of the electric field. *Science* 232:65-68, 1986.
- Chu, G., Vollrath, D. and Davis, W. Separation of large DNA molecules by contour-clamped homogeneous electric fields. *Science* 234:1582-1585, 1986.
- Churilla, A., Dasch, G.A. and Carl, M. Recognition of synthetic peptides by Rickettsia specific human T lymphocytes. In: Rickettsiae and Rickettsial diseases, edited by Kazar, J. and Raoult, D. Bratislava: Slovak Academy of Sciences, 1991, p. 296.
- Conor, A. and Bruch, A. Une fièvre éruptive observée en Tunisie. *Extr.Bul.Soc.Pathol.Exot.* III(8):492-496, 1910a.
- Conor, A. and Hayat, A. Nouveaux faits concernant la fièvre boutonneuse de Tunisie. *Bull.Soc.Path.Exot.* 10:759-764, 1910b.
- Coolbaugh, J.C., Progar, J.J. and Weiss, E. Enzymatic activities of cell-free extracts of *Rickettsia typhi*. *Infect.Immun.* 14(1):298-305, 1976.
- Cox, H.R. Cultivation of rickettsia of the Rocky Mountain Spotted Fever Typhus and Q fever groups in the embryonic tissues of developing chicks. *Sciences*, 94:399-403, 1942.

- Cracea, E., Raducanu, S., Boboc, F. and Totescu, E. Observatii in legatura cu o serie de cazuri recente de febra butonoasa aparute in tara noastra. *Bact.Vir.Par.Epid.* XXXII(2):111-114, 1987.
- DeMico, C., Raoult, D. and Toga, M. Diagnosis of Mediterranean spotted fever by using an immunofluorescence technique. *J.Infect.Dis.* 153(1):136-138, 1986.
- Demmler, G.J., Buffone, G.J., Schimbor, C.M. and May, R.A. Detection of cytomegalovirus in urine from newborns by using polymerase chain reaction DNA amplification. *J.Infect.Dis.* 158(6):1177-1184, 1988.
- Dobson, M.E., Azad, A. F., Dasch, G. A., Webb, L., Olson, J. G. Detection of murine typhus infected fleas with an enzyme-linked immunosorbent assay. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 40(5): 521-528, 1989.
- Douka-Segditsa, I., Stoforos, E., Mastroyanni-Korkolopoulou, M. and Dragonas, P.N. L'infection de l'homme par des rickettsies et neo-rickettsies en Grece Depistage d'anticorps contre *R.prowazeki*, *R.mooseri*, *R.conori*, *R.burneti* et neo-rickettsie Q. *Bull.Soc.Path.Exot.* 46-50, 1993.
- Drancourt, M. and Raoult, D. In vitro susceptibilities of *Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia conorii* to roxithromycin and pristinamycin. *Antimicrob.Agents Chemother.* 33(12):2146-2148, 1989.
- Drancourt, M., Alessi, M.C., Levy, P.Y., Johan-Vague, I. and Raoult, D. Secretion of tissue-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor by *Rickettsia conorii* and *Rickettsia rickettsii* infected cultured endothelial cells. *Infect. Immun.* 58(8):2459-2463, 1990.
- Drancourt, M., Beati, L., Tarasevich, I.V. and Raoult, D. Astrakhan fever *Rickettsia* is identical to Israel tick typhus *Rickettsia*, a genotype of the *Rickettsia conorii* complex. *J.Infect.Dis.* 165:1167-1168, 1992.
- Drancourt, M., Brouqui, P., Chiche, G. and Raoult, D. Acute pericarditis in mediterranean spotted fever. *Trop.Med.Hyg.* 85:799, 1991.
- Drancourt, M., George, F., Brouqui, P., Sampil, J. and Raoult, D. Diagnosis of mediterranean spotted fever by indirect immunofluorescence of *Rickettsia conorii* in circulating endothelial cells isolated with monoclonal antibody-coated immunomagnetic beads. *J.Infect.Dis.* 166:660-663, 1992.
- Drancourt, M., Raoult, D., Harle, J.R., Chaudet, H., Janbon, F., Charrel, C. and Gallais, H. Biological variations in 412 patients with Mediterranean spotted fever. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 590:39-50, 1990.
- Drancourt, M., Regnery, R.L. and Raoult, D. Identification of tick-isolates by centrifugation-shell vial assay by polymerase chain reaction and restriction endonuclease length polymorphism analysis. In: *Rickettsiae and Rickettsial Diseases*, edited by Kazar, J. and Raoult, D. Bratislava: Slovak Academy of Sciences, p. 232, 1991.
- Dzelalija, B., Morovic, M. and Novakovic, S. Rickettsial antibody in north Dalmatia: Antibodies to *R.conorii*, *Rakari*, *R.typhi*, *R.slovaica*, and *C.burneti* among urban and rural population. In: *Rickettsiae and Rickettsial Diseases*, edited by Kazar, J. and Raoult, D. Bratislava: Slovac Academy of Sciences, p. 457, 1991.
- Editorial. Bitten, hot, and mostly spotty. *Lancet* 337:143-144, 1991.
- Edlinger, E. and Navarro, P., Les Rickettsioses: Une Morbidite du Tourisme. *Sem. Hop. Paris* 59(27-28):2053-2054, 1983.

- Edlinger, E. Serological diagnosis of Mediterranean spotted fever. *Ann. Microbiol.* 130 A:203-211, 1979.
- Eisemann, C. S., Nypaver, M. J., Osterman, J. V. Susceptibility of inbred mice to rickettsia of the spotted fever group. *Infect. Immun.* 43: 143-148, 1984.
- Eisemann, C.S. and Osterman, J.V. Proteins of typhus and spotted fever group rickettsiae. *Infect.Immun.* 14(1):155-162, 1976.
- Eremeeva, M.E., Roux, V. and Raoult, D. Determination of genome size and restriction pattern polymorphism of *Rickettsia prowazekii* and *Rickettsia typhi* by pulsed field gel electrophoresis. *FEMS Microbiol.Lett.* 112:105-112, 1993.
- Espejo-Arenas, E. and Raoult, D. First isolates of *Rickettsia conorii* in Spain using a centrifugation-shell vial assay. *J.Infect.Dis.* 159(6):1158-1159, 1989.
- Espejo-Arenas, E., Creus, B.F., Cueto, F.B. and Porta, F.S. Climatic Factors in Resurgence of Mediterranean Spotted Fever. *Lancet* 1333, 1986.
- Espejo-Arenas, E., Rodriguez, M., Martinez, A., Uriz, S. and Bella, F. Spotless boutonneuse fever. *Clin.Infect.Dis.* 15:373-374, 1992.
- Fan, M.Y., Walker, D.H., Yu, S.R., Liu, Q.H. Epidemiology and ecology of rickettsial diseases in the Peoples' Republic of China. *Rev. Inf. Dis.* 9:823-840, 1987.
- Fan, M.Y., Yu, X.J. and Walker, D.H. Antigenic analysis of chinese strains of spotted fever group rickettsiae by protein immunoblotting. *Am J Trop Med Hyg* 39(5):497-501, 1988.
- Fishbein, D.B., Frontini, M.G., Giles, R. and Vernon, L.L. Fatal cases of Rocky Mountain spotted fever in the United States, 1981-1988. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 590:246-247, 1990.
- Font-Creus, B., Bella, F., Espejo-Arenas, E., Vidal-Sanahuja, R., Munoz-Espin, T., Nolla-Salas, M., Casagran-Font-Creus, B., Bella, F., Espejo-Arenas, E., Vidal-Sanahuja, R., Munoz-Espin, T., Nolla-Salas, M., Casagran-Borrell, A., Mercade-Cuesta, J. and Segura-Porta, F. Mediterranean spotted fever: a cooperative study of 227 cases. *Rev.Infect.Dis.* 7(5):635-642, 1985.
- Fox, G.E., Stackebrandt, E., Hespell, R.B., Gibson, J., Maniloff, J., Dyer, T.A., Wolfe, R.S., Balch, W.E., Tanner, R.S., Magrum, L.J., Zablen, L.B., Blakemore, R., Gupta, R.S., Bonen, L., Lewis, B.J., Stahl, D.A., Luehrsén, K.R., Chen, K.N. and Woese, C.R. The phylogeny of prokaryotes. *Science* 209: 457-463, 1980.
- Frutos, R., Pages, M., Bellis, M., Roizes, G. and Bergoin, M. Pulsed-field gel electrophoresis determination of the genome size of obligate intracellular bacteria belonging to the genera chlamydia, rickettsiella, and porochlamydia. *J.Bacteriol.* 171(8):4511-4513, 1989.
- Gage, K.L., Gilmore, R.D., Karstens, R.H. and Schwan, T.G. Detection of *Rickettsia rickettsii* in saliva, hemolymph and triturated tissues of infected *Dermacentor andersoni* ticks by polymerase chain reaction. *Mol.Cel.Prob.* 6:333-341, 1992.
- Gear, J.H.S., Wagner, J.M., Dyssell, J.C., Hulton, S.A. and Wehde, S.D. Severe tick-bite fever in young children. A report of 3 cases. *S.Afr.Med.J.* 77(8):422-424, 1990.
- Giallaly, E., Payen, D., Huet, Y., Pilorget, A., Roujeau, J.C. and Rapin, M. Fievre Boutonneuse Mediterranee Contractee en Region Parisienne. *La Pres.Med.* 13(8):506, 1984.
- Gilmore, R.D. Characterization of the 120-kDa surface protein gene of *Rickettsia rickettsii*. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 590:459-467, 1990.

- Gilmore, R.D., Joste, N. and McDonald, G.A. Cloning, expression and sequence analysis of the gene encoding the 120KD surface-exposed protein of *Rickettsia rickettsii*. *Mol.Microbiol.* 3(1):1579-1586, 1989.
- Gilot, B., Laforge, M.L., Pichot, J. and Raoult, D. Relationships between the *Rhipicephalus sanguineus* complex ecology and mediterranean spotted fever epidemiology in France. *Eur.J.Epidemiol.* 6(4):357-362, 1990.
- Gimenez, D.F. Staining rickettsiae in yolk-sac cultures. *Stain Technol.* 39:135-141, 1964.
- Giroud, P., Capponi, M. and Dumas, N. Au sujet des lesions oculaires au cours des rickettsioses et des neo-rickettsioses. *Bull.Soc.Path.Exot.* 55:60-63, 1962.
- Giroud, P., Ciaccio, G. and Dumas, N. Influence of ortsione on local and general reactions. *Bull.Soc.Path.Exot.* 52(5):568-571, 1959.
- Giroud, P., LeGac, P.P., Roger, F., LeHenaff, A. and Lemaigre, C. Les pneumopathies des rickettsioses du groupe boutonneuse pourpre. *Bull.Soc.Path.Exot.* 655-659, 1953.
- Goldwasser, R.A., Klingberg, M.A., Klingberg, W., Steiman, Y. and Swartz, T.A. Laboratory and epidemiologic studies of rickettsial spotted fever in Israel. *Front.Int.Med.* 270-275, 1974.
- Gross, E.M. and Goldwasser, R.A. Spotted fever and murine typhus in the Negev desert region of Israel, 1981. *Bull.W.H.O.* 62(2):301-306, 1984.
- Gross, E.M., Goldwasser, R.A., Bearman, J.E., Sarov, I., Sarov, B., Torok, V. and Naggan, L. Rickettsial antibody prevalence in southern Israel: IgG Antibodies to *Coxiella burnetii*, *Rickettsia typhi*, and Spotted Fever Group Rickettsiae among urban and rural dwelling and Bedwin Women. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 32(6):1387-1391, 1983.
- Guardia, J., Martinez-Vazquez, J.M., Moragas, A., Rey, C., Vilaseca, J., Tornos, J., Beltran, M. and Bacardi, R. The liver in boutonneuse fever. *Gut* 15:549-551, 1974.
- Gutman, A., Schreiber, H. and Taragan, R. An outbreak of tick typhus in the coastal plain of Israel 13 cases from the Sharon area. *Trop.Med.Hyg.* 67(1):112-121, 1973.
- Hattwick, M.A.W., O'Brien, R.J. and Hanson, B.F. Rocky Mountain spotted fever: Epidemiology of an increasing problem. *Ann.Intern.Med.* 84:732-739, 1976.
- Hebert, G.A., Tzianabos, T., Gamble, W.C. and Chappell, W.A. Development and characterization of high-titered, group-specific fluorescent-antibody reagents for direct identification of Rickettsiae in clinical specimens. *J.Clin.Microbiol.* 11(5):503-507, 1980.
- Hechemy, K.E. Laboratory diagnosis of Rocky Mountain spotted fever. *N.Engl.J.Med.* 300(15):859-860, 1979.
- Hechemy, K.E., Raoult, D., Eisemann, C.S., Han, Y. and Fox, J.A. Detection of antibodies to *Rickettsia conorii* with a latex agglutination test in patients with mediterranean spotted fever. *J.Infect.Dis.* 153(1):132-135, 1986.
- Hechemy, K.E., Raoult, D., Fox, J.A., Han, Y., Elliott, L.B. and Rawlings, J.A. Cross-reaction of immune sera from patients with rickettsial diseases. *J.Med.Microbiol.* 29:199-202, 1989.
- Hechemy, K.E., Stevens, R.W., Sasowski, S., Michaelson, E.E., Casper, E.A. and Philip, R.N. Discrepancies in Weil-Felix and microimmunofluorescence test results for Rocky Mountain spotted fever. *J.Clin.Microbiol.* 9(2):292-293, 1979.

- Heinzen, R.A., Hayes, S.F., Peacock, M.G. and Hackstadt, T. Directional actin polymerization associated with spotted fever group Rickettsia infection of VERO cells. *Am.Soc.Rick.Rick.Dis.* 1992.
- Heinzen, R.A., Stiegler, G.L., Whiting, L.L., Schmitt, S.A., Mallavia, L.P. and Frazier, M.E. Use of pulsed field gel electrophoresis to differentiate *Coxiella burnetii* strains. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 590:504-513, 1990.
- Herrero, C., Pelaz, C., Alvar, J., Molina, R., Vazquez, J., Anda, P., Casal, J. and Martin-Bourgon, C. Evidence of the presence of spotted fever group rickettsiae in dogs and dog ticks of the central provinces in Spain. *Eur.J.Epidemiol.* 8(4):575-579, 1992.
- Herrero-Herrero, J.I., Beltran, R.R. and Sanchez Martin, A.M. Naturally Acquired Immunity: A Means of Resistance to Mediterranean Spotted Fever? *J.Infect.Dis.* 164(September):618-619, 1991.
- Herrero-Herrero, J.I., Ruiz-Beltran, R., Martin-Sanchez, A.M. and Garcia, E.J. Mediterranean spotted fever in Salamanca, Spain. Epidemiological study in patients and serosurvey in animals and healthy human population. *Acta Trop.* 46:335-350, 1989.
- Higuchi, R. Simple and rapid preparation of samples for PCR. In *PCR Technology-Principles and Applications for DNA Amplification* (Erlich, H. A., ed.) pp. 31-8. New York: Stockton Press. 1989.
- Holland, S.M., Gaydos, C.A. and Quinn, T.C. *Detection and differentiation of Chlamydia trachomatis, Chlamydia psittaci, and Chlamydia pneumoniae* by DNA amplification. *J.Infect.Dis.* 162:984-987, 1990.
- Jerrells, T.R., Jarboe, D.L. and Eisemann, C.S. Cross-reactive lymphocyte responses and protective immunity against other spotted fever group Rickettsiae in mice immunized with *Rickettsia conorii*. *Infect.Immun.* 51(3):832-837, 1986.
- Johnson, J.W. and Pedersen, C.E. Plaque formation by strains of spotted fever rickettsiae in monolayer cultures of various cell types. *J.Clin.Microbiol.* 7(4):389-391, 1978.
- Kaplan, J.E. and Schonberger, L.B. The sensitivity of various serologic tests in the diagnosis of Rocky Mountain spotted fever. *Am J Trop Med Hyg* 35(4):840-844, 1986.
- Kaplowitz, L.G., Lange, J.V., Fischer, J.J. and Walker, D.H. Correlation of Rickettsial titers, circulating endotoxin, and clinical features in Rocky Mountains spotted fever. *Arch.Intern.Med.* 143:1149-1151, 1983.
- Kelly, D.J., Dasch, G.A., Smoak, B.L., McClain, B., Brundage, J.F., Broadhurst, L., Chan, C.T. and Miller, R.N. Etiology of a rickettsial diseases outbreak in us troops returning from deployment to Botswana. *Am.Soc.Ric.Ric.Dis.* 1992.
- Kelly, D.J., Marana, D.P., Stover, C.K., Oaks, E.V. and Carl, M. Detection of *Rickettsia tsutsugamushi* by gene amplification using polymerase chain reaction techniques. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 590:564, 1990.
- Kelly, P.J. and Mason, P.R. Serological typing of spotted fever group Rickettsia isolates from Zimbabwe. *J.Clin.Microbiol.* 28(10):2302-2304, 1990.
- Kelly, P.J. and Mason, P.R. Transmission of a spotted fever group Rickettsia by *Amblyomma hebraeum* (Acari: Ixodidae). *J.Med.Entomol.* 598-600, 1991.
- Kelly, P.J., Mason, P.R., Matthewman, L.A. and Raoult, D. Seroepidemiology of spotted fever group rickettsial infections in humans in Zimbabwe. *J.Trop.Med.Hyg.* 94:1-6, 1991.

- Kennou, M.F., Edlinger, E. Donnes actuelles sur les rickettsioses en Tunisie. Arch Inst Pasteur Tunis 61: 427-33, 1984.
- Kenyon, R. H., and Pedersen, C. E., Jr. Immune responses to *Rickettsia akari* infection in congenitally athymic nude mice. Infect. Immun. 28: 310-313, 1980.
- Key Fiset, P., Ormsbee, R.A., Silberman, R., Peacock, M.G. and Spielman, S.H. A microagglutination technique for detection and measurement of rickettsial antibodies. Acta virol. 13:60-66, 1969.
- Keysary, A., McCaul, T.F. and Winkler, H.H. Roles of the Fc receptor and respiratory burst in killing of *Rickettsia prowazekii* by macrophagelike cell lines. Infect.Immun. 57(8):2390-2396, 1989.
- Kocianova, E., Rehacek, J., Urvolgyi, J., Jedlicka, L. and Bazlikova, M. Antibody response of wild rodents to experimental infection with *Coxiella burnetii* and spotted fever group rickettsiae. In: Rickettsiae and Rickettsial diseases, edited by Kazar, J. and Raoult, D. Bratislava: Slovak Academy of Sciences, 1991, p. 423.
- Kokorin, I. N., Kabanova, E. A., Shirokova, E. M., Abrosimova, G. E., Rybkina, N. N., Pushkareva, V. I. Role of T lymphocytes in *Rickettsia conorii* infection. Acta Virol. (Prague) (Engl. Ed.) 26: 91-97, 1982.
- Ladefoged, S.A. and Christiansen, G. Physical and genetic mapping of the genomes of five mycoplasma hominis strains by Pulsed-Field Gel Electrophoresis. J.Bacteriol. 174(7):2199-2207, 1992.
- Lambert, M., Dugerner, T., Bigaignon, G., Rahier, J. and Piot, P. Mediterranean Spotted Fever in Belgium. Lancet 1038, 1984.
- Lange, J.V. and Walker, D.H. Production and characterization of monoclonal antibodies to *Rickettsia rickettsii*. Infect.Immun. 46(2):289-294, 1984.
- LeGac, P.P. Importance du role du lapin de Garenne (*Oryctolagus cuniculus*) dans l'epidemiologie des rickettsioses. Bull.Soc.Path.Exot. 261-266, 1974.
- Li, H. and Walker, D.H. Biological characterization of major polypeptides on the surface of spotted fever group Rickettsiae. Ann.N.Y.Acad.Sci. 590:389-394, 1990.
- Li, H., Lenz, B. and Walker, D.H. Protective monoclonal antibodies recognize heat-labile epitopes on surface proteins of spotted fever group Rickettsiae. Infect.Immun. 56(10):2587-2593, 1988.
- Maniatis, T., Fritsch, E., Sambrook, J. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor, N. Y. Cold Spring Harbor Laboratory 1990.
- Manor, E. and Sarov, I. Tumor necrosis factor alpha and prostaglandin E2 production by human monocyte-derived macrophages infected with spotted fever group Rickettsiae. Ann.N.Y.Acad.Sci. 590:157-167, 1990.
- Manor, E. The effect of monocyte-derived macrophages on the growth of *Rickettsia conorii* in permissive cells. In: Rickettsiae and Rickettsial diseases, edited by Kazar, J. and Raoult, D. Bratislava: Slovak Academy of Sciences, p. 312, 1991.
- Manor, E., Ighbarieh, J., Sarov, B., Kassis, I. and Regnery, R.L. Human and tick spotted fever group Rickettsia isolates from Israel: a genotypic analysis. J.Clin.Microbiol. 30(10):2653-2656, 1992.

- Mansueto, S., Tringali, G. and Walker, D.H. Widespread, Simultaneous Increase in the Incidence of Spotted Fever Group Rickettsioses. *The Journal of Infectious Diseases* 154(3):539-540, 1986.
- Mansueto, S., Vitale, G., Bentivegna, M., Tringali, G. and DeLeo, R. Persistence of antibodies to *Rickettsia conorii* after an acute attack of boutonneuse fever. *J.Infect.Dis.* 151(2):377, 1985.
- Mansueto, S., Vitale, G., Miceli, M.D., Tringali, G., Quartararo, P., Picone, D.M. and Occhino, C. A sero-epidemiological survey of asymptomatic cases of Boutonneuse fever in western Sicily. *Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg.* 78:16-18, 1984.
- Mansueto, S., Vitale, G., Mocciano, C., Librizzi, R., Friscia, I., Usticino, G., Reina, G. Laboratory diagnosis of boutonneuse fever by enzyme-linked immunosorbent assay. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 83: 855-857, 1989.
- Marrero, M. and Raoult, D. Centrifugation-shell vial technique for rapid detection of mediterranean spotted fever *Rickettsia* in blood culture. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 40(2):197-199, 1989.
- McDade, J.E. Diagnosis of Rickettsial diseases. In: *Rickettsiae and Rickettsial diseases*, edited by Kazar, J. and Raoult, D. Bratislava: Slovak Academy of Sciences, 1991, p. 561.
- McDade, J.E. Diagnosis of Rickettsial diseases a perspective. *Eur.J.Epidemiol.* 7(3):270-275, 1991.
- McDade, J.E., Black, C.M., Roumillat, L.F., Redus, M.A. and Spruill, C.L. Addition of monoclonal antibodies specific for *Rickettsia acari* to the rickettsial diagnostic panel. *J.Clin.Microbiol.* 26(10):2221-2223, 1988.
- McDade, J.E., Newhouse, V. F. Natural history of *Rickettsia rickettsii*. *An. Rev. Microbiol.* 40: 287-309, 1986.
- McDonald, G.A., Anacker, R.L. and Garjlan, K. Cloned gene of *Rickettsia rickettsii* surface antigen: candidate vaccine for Rocky Mountain spotted fever. *Science* 235:83-85, 1987.
- Monchârmont, D., Miro, I., Simonin, R. and DeMicco, C. Hepatite granulomateuse a *Rickettsia conori*. *Nouv.Pres.Medic.* 10(44):3651, 1981.
- Morel, P.C. and Vassiliades, G. Les Rhipicéphalus du groupe sanguineux: espèces Africaines (Acariens: Ixodoidea). *Vig.Prer.Edit.* XV(4):343-386, 1962.
- Morovic, M., Dzelalija, B., Novakovic, S., Stankovic, S. and Dujella, J. Clinical spectrum of rickettsioses in the north-Dalmatian subregion. In: *Rickettsiae and Rickettsial diseases*, edited by Kazar, J. and Raoult, D. Bratislava: Slovak Academy of Sciences, p. 540, 1991.
- Murata M., Yoshida, Y., Osono, M., Ohashi, N., Oyanagi, M., Urakami, H., Tamura, A., Nogami, S., Tanaka, H., Kawamura, A.Jr. Production and characterization of monoclonal strain-specific antibodies against prototype strains of *Rickettsia tsutsugamushi*. *Microbiol.Immunol.* 30(7):599-610, 1986.
- Newhouse, V.F., Shepard, C.C., Redus, M.D., Tzianabos, T. and McDade, J.E. A comparison of the complement fixation, indirect fluorescent antibody, and microagglutination test for the serological diagnosis of Rickettsial diseases. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 28(2):387-395, 1979.
- Novakovic, S., Morovic, M., Dzelalija, B., Crocquet-Valdes, P., Feng, H.M. and Walker, D.H. Serological typing of spotted fever group rickettsial ticks isolates from the Adriatic coast of Croatia. *Am.Soc.Rick.Rick.Dis.* 1992.

- Novakovic, S., Morovic, M., Dzelalija, B., Feng, H.M. and Walker, D.H. Identification of spotted fever group Rickettsia of human origin in the Adriatic coast of Croatia. *Am.Soc.Rick.Rick.Dis.* 1992b.
- Objeski J.F., Palmer E.L., Tzianabos T. Proteins of purified rickettsiae. *Microbiol.* 11:61-76, 1974.
- Okada, T., Tange, Y. and Kobayashi, Y. Causative agent of spotted fever group Rickettsiosis in Japan. *Infect.Immun.* 58(4):887-892, 1990.
- Olmer, D. Sur une infection epidemique, avec exantheme, de nature indeterminee. *Marseille Med.* 22: 1291-1293, 1925.
- Ormsbee, R.A. Rickettsiae. In: Principles and practice of infectious diseases, edited by Mandele, G.L., Douglas, R.G. and Bennett, J.E. New York: Churchill Livingstone: 845-855, 1990
- Ormsbee, R.A., Peacock, M.G., Philip, R.N., Casper, E., Plorde, J., Gabre-Kidan, T. and Wright, L. Antigenic relationships between the typhus and spotted fever groups of Rickettsiae. *Am.J.Epidemiol.* 108(1):53-59, 1978.
- Osterman, J.V. and Eisemann, C.S. Rickettsial indirect hemagglutination test: isolation of erythrocyte-sensitizing substance. *J.Clin.Microbiol.* 8(2):189-196, 1978.
- Papadopoulos, B., Les tiques des animaux domestiques et les hematozoaires qu'elles transmettent en Macedoine (Grece). PhD thesis, University of Neuchatel (Switzerland) viii 248 pp. p.214. 1990
- Paretsky, D. Biochemistry of rickettsiae and their infected hosts, with special reference to *Coxiella burnetii*. *Zentralbl. Bacteriol. Parasitenk. Infectionskr. Hyg. Abt. I Orig.* 1968. 206: 284-291.
- Pateraki, E. and Papakyriakou, H. An epidemiological survey on the rickettsial and neorickettsial antibodies among men, sheep and goats in Greece, during 1971-1972. *Arch.Inst.Pasteur Hellen* 19:55-64, 1973.
- Pateraki, E., Tselentis, Y., Papakyriakou, H., Buttiker, W. and Bruneau, J. Contribution to the study of rickettsial infections in Greece. *Arch.Inst.Pasteur Hellen* 16:23-29, 1970.
- Paya, C. V., Wold, A. D., Smith, T. F. Detection of cytomegalovirus infections in specimens other than urine by the shell vial assay and conventional tube cell cultures. *J. Clin. Microbiol.* 25: 755-757, 1987.
- Pedersen, C.E. and Walters, V.D. Comparative electrophoresis of spotted fever group rickettsial proteins. *Life Sciences* 22(7):583-588, 1978.
- Peter, J.B. The polymerase chain reaction: amplifying our options. *Rev.Infect.Dis.* 13:166-171, 1991.
- Peter, O., Raoult, D. and Gilot, B. Isolation by a sensitive centrifugation cell culture system of 52 strains of spotted fever group Rickettsiae from ticks collected in France. *J.Clin.Microbiol.* 28(7):1597-1599, 1990.
- Peter, O., Williams, J.C. and Burgdorfer, W. Rickettsia helvetica, a new spotted fever group rickettsiae: immunochemical analysis of the antigens of 5 spotted fever group rickettsiae. In: Rickettsia and Rickettsial diseases, edited by Kazar, J. Bratislava: Slovak Academy of Sciences. 99-108, 1985.
- Petzetakis, M. Un cas de fievre exanthematique observe a Alexandrie. *Arch.Inst.Pasteur Hellen* 356-358, 1931.

- Philip, R. N., Casper, E. A., Anacker, R. L. et al. *Rickettsia bellii* sp. nov.: a tick - borne rickettsia, widely distributed in the United States, that is distinct from the spotted fever and typhus biogroups. *Int. J. System. Bacteriol.* 33: 94-106, 1983.
- Philip, R.N., Casper, E., Burgdorfer, W., Gerloff, R.K., Hughes, L.E. and Bell, E.J. Serologic typing of rickettsiae of the spotted fever group by microimmunofluorescence. *J.Immunol.* 121(5):1961-1968, 1978.
- Philip, R.N., Casper, E.A., Ormsbee, R.A., Peacock, M.G. and Burgdorfer, W. Microimmunofluorescence test for the serological study of Rocky Mountain spotted fever and typhus. *J.Clin.Microbiol.* 3(1):51-61, 1976.
- Pickens, E.G., Bell, E.J., Lackman, D.B. and Burgdorfer, W. Use of mouse serum in identification and serologic classification of *Rickettsia akari* and *Rickettsia australis*. *J.Immunol.* 94(6):883-889, 1965.
- Pieri, J. and Mosinger, M. De anatomo-pathologique de papule boutonneuse. *La Pres.Med.* 1425-1428, 1935.
- Piras, M.A., Calia, G., Saba, F., Gakis, C. and Andreoni, G. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in male patients with mediterranean spotted fever in Sardinia. *J.Infect.Dis.* 607-608, 1983.
- Plazy, L. and Marcandier, A. A propos d'un essai de classification des fievres typho-exanthematiques. *Bull.Soc.Path.Exot.* 5:560-562, 1930.
- Plotz, H., Reagan, R.L. and Wertman, K. Differentiation between fievre boutonneuse and rocky mountain spotted fever by means of complement fixation. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* 55:173-176, 1944.
- Policastro, P.F., Anderson, B.E. and McDonald, G.A. Promoter structure and expression of the 155-kDa surface antigen Gene of *Rickettsia rickettsii*. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 590:468-477, 1990.
- Policastro, P.F., Anderson, B.E. and McDonald, G.A. Promoter structure and expression of the 155-kDa surface antigen Gene of *Rickettsia rickettsii*. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 590:468-477, 1990.
- Pistakis, M., Vitale, G., Tringali, G., Robberto, D., Pintagro, C. and Mansueto, S. Ricerca di anticorpi anti R.conorii in sieri umani e canini di Canea (Isola di Creta). *Acta Medit.Patol.Inf.Trop.* 2(3):135-138, 1983.
- Punda, V., Milas, I., Bradaric, N., Kacic, A. and Klismanic, Z. Mediterranean spotted fever in Yugoslavia. *Lij.Vjcs.* 106(7-8):286-288, 1984.
- Ralph, D., Pretzman, C., Daugherty, N. and Poetter, K.F. Genetic relationships among the members of the family Rickettsiaceae as shown by DNA restriction fragment polymorphism analysis. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 590:541-552, 1990.
- Ranque, J. Le role des tiques dans la transmission des rickettsioses humaines. *Mais.Med.* 84:548-569, 1947.
- Rao, A.K., Schapira, M., Clements, M.L., Niewiarowski, S., Budzynski, A.Z., Schmaier, A.H., Harpel, P.C., Blackwelder, W.C., Scherrer, J.R., Sobel, E. and Colman, R.W. A prospective study of platelets and plasma proteolytic systems during the early stages of Rocky Mountain spotted fever. *N.Engl.J.Med.* 318(16):1021-1028, 1988.
- Raoult, D. and Dasch, G.A. Line blot and western blot immunoassays for diagnosis of mediterranean spotted fever. *J.Clin.Microbiol.* 27(9):2073-2079, 1989a.

- Raoult, D. and Dasch, G.A. The line blot: an immunoassay for monoclonal and other antibodies. Its application to the serotyping of Gram-negative bacteria. *J.Immunol.Meth.* 125:57-65, 1989b.
- Raoult, D. and Drancourt, M. Antimicrobial therapy of rickettsial diseases. *Antimicrob.Agents Chemother.* 35(12):2457-2462, 1991.
- Raoult, D. and Walker, D.H. *Rickettsia rickettsii* and other spotted fever group rickettsiae (rocky mountain spotted fever and other spotted fevers). In: Principles and practice of infectious diseases, edited by Douglas, R.G., Bennett, J.E. and Mandell, G.L. New York: Churchill Livingstone. 1465-1471, 1990.
- Raoult, D. Antibiotic treatment of rickettsiosis, recent advances and current concepts. In: Rickettsiae and Rickettsial diseases, edited by Kazar, J. and Raoult, D. Bratislava: Slovak Academy of Sciences. 652, 1991.
- Raoult, D. La fièvre boutonneuse méditerranéenne. *Mediterr.Med.* 393:24-26, 1990.
- Raoult, D. Rickettsioses en dehors de la fièvre Q. *Mal.Infect.* 1-18, 1988.
- Raoult, D. Rickettsioses in the mediterranean - à problème for travellers. *Rev.Medic.Microb.* 2:115-120, 1991.
- Raoult, D., DeMicco, C., Gallais, H. and Toga, M. Laboratory diagnosis of Mediterranean spotted fever by immunofluorescent demonstration of *Rickettsia conorii* in cutaneous lesions. *J.Infect.Dis.* 150(1):145-148, 1984.
- Raoult, D., Gallais, H., Ottomani, A., Resch, J.P., Tichadou, D., DeMicco, P. and Casanova, P. La forme maligne de la fièvre boutonneuse méditerranéenne. *La Pres.Med.* 12(38):2375-2378, 1983.
- Raoult, D., Hechemy, K.E. and Chaudet, H. Serologie de la fièvre boutonneuse méditerranéenne. Kinetique des anticorps detectes par trois methodes: L'immunofluorescence indirecte, l'hemagglutination indirecte, et l'agglutination latex. *Path.Biol.* 33(8):839-841, 1985.
- Raoult, D., Lena, D., Perrimont, H., Gallais, H., Walker, D.H. and Casanova, P. Haemolysis with mediterranean spotted fever and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Trop.Med.Hyg.* 80:961-962, 1986.
- Raoult, D., Lepeu, G., Guibout, M., SanMarco, J.L., Chaudet, H., Charrel, C., Barralis-Negrelli, S., Gallais, H. and Casanova, P. La fièvre boutonneuse méditerranéenne: Aspects épidémiologiques propos d'une enquête réalisée en 1982 en Provence. *Sem.Hop.Paris* 61(3):139-142, 1985.
- Raoult, D., Nicolas, D., DeMicco, P., Gallais, H. and Casanova, P. Aspects Epidémiologiques de la Fièvre Boutonneuse Méditerranéenne en Corse du Sud. *Bull.Soc.Path.Exot.* 78:446-451, 1985.
- Raoult, D., Pastor, J., Xeridat, B., Garnier, J.M., Weiller, P.J., Garcin, G., Privat, Y., Gallais, H. and Casanova, P. La fièvre boutonneuse méditerranéenne A propos de 154 cas récents. *Ann.Dermatol.Venerol.* 110:909-914, 1983.
- Raoult, D., Rousseau, S., Toga, B., Tamalet, C., Gallais, H., DeMicco, P. and Casanova, P. Diagnostic serologique de la fièvre boutonneuse Méditerranéenne. *Path.Biol.* 32(7):791-794, 1984.

- Raoult, D., Tissot-Dupont, H., Caraco, P., Brouqui, P., Drancourt, M. and Charrel, C. Mediterranean spotted fever in Marseille: descriptive epidemiology and the influence of climatic factors. *Eur.J.Epidemiol.* 8(2):192-197, 1992.
- Raoult, D., Tissot-Dupont, H., Chiche-Portice, C., Peter, O., Gilot, B. and Drancourt, M. Mediterranean spotted fever in Marseille, France: Correlation between prevalence of hospitalized patients, seroepidemiology, and prevalence of infected ticks in three different areas. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 48(2):249-256, 1993.
- Raoult, D., Toga, B., Chaudet, H. and Chiche-Portice, C. Rickettsial antibody in southern France: antibodies to *Rickettsia conorii* and *Coxiella burnetii* among urban, suburban and semi-rural blood donors. *Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg.* 81:80-81, 1987.
- Raoult, D., Weiller, P.J., Chagnon, A., Chaudet, H., Gallais, H. and Casanova, P. Mediterranean spotted fever: clinical, laboratory and epidemiological features of 199 cases. *Am J Trop Med Hyg* 35(4):845-850, 1986.
- Raoult, D., Zuchelli, P., Weiller, P.J., Charrel, C., SanMarco, J.L., Gallais, H. and Casanova, P. Incidence, clinical observations and risk factors in the severe form of mediterranean spotted fever among patients admitted to hospital in Marseilles 1983-1984. *J.Infect.* 12:111-116, 1986.
- Regnery, R.L. Rickettsia identification by polymerase chain reaction of DNA and restriction endonuclease fragment polymorphism analysis. In: Rickettsiae and Rickettsial diseases, edited by Kazar, J. and Raoult, D. Bratislava: Slovak Academy of Sciences, 1991, p. 175.
- Regnery, R.L., Spruill, C.L. and Plikaytis, B.D. Genotypic identification of Rickettsiae and estimation of intraspecies sequence divergence for portions of two Rickettsial genes. *J.Bacteriol.* 173(5):1576-1589, 1991.
- Rehacek, J. and Tarasevich, I.V. Acari-borne rickettsiae and rickettsiosis in Eurasia, Veda, Publishing House of the Slovak Academy of Sciences, Bratislava, 1988.
- Rehacek, J. and Tarasevich, I.V. Ecological questions concerning rickettsiae. In: Rickettsiae and Rickettsial diseases, edited by Kazar, J. and Raoult, D. Bratislava: Slovak Academy of Sciences, 351, 1991.
- Rehacek, J. Ecological relationships between ticks and Rickettsiae. *Eur.J.Epidemiol.* 5(4):407-413, 1989.
- Rehacek, J., Palanova, A., Zupancicova, M., Urvolgyi, J., Kovacova, E., Jarabek, L. and Brezina, R. Study of rickettsioses in Slovakia I. *Coxiella burnetii* and rickettsiae of the spotted fever (SF) group in ticks and serological surveys in animals and humans in certain selected localities in the Lucenec and V.Krtis Districts. *J.Hyg.Epid.Micr.* 1:105-115, 1975.
- Robertson, R.G. and Wisseman, C.L. Tick - borne Rickettsiae of the Spotted Fever group in west Pakistan II. Serological classification of isolates from west Pakistan and Thailand: Evidence for two new species. *Am.J.Epidemiol.* 97(1):55-64, 1973.
- Roux, V. and Raoult, D. Genotypic identification and phylogenetic analysis of the spotted fever group rickettsiae by pulsed-field gel electrophoresis. *J.Bacteriol.* 175(15):4895-4909, 1993.
- Roux, V., Drancourt, M. and Raoult, D. Determination of genome sizes of Rickettsia spp. within the spotted fever group, using pulsed-field gel electrophoresis. *J.Bacteriol.* 174(22):7455-7457, 1992.

- Ruiz-Beltran, R. and Herrero-Herrero, J.I. New quinolones in the treatment of mediterranean spotted fever (MSF): A comparative study with other antibiotic regimens. In: *Rickettsiae and Rickettsial diseases*, edited by Kazar, J. and Raoult, D. Bratislava: Slovak Academy of Sciences, 701, 1991.
- Ruiz-Beltran, R., Herrero-Herrero, J.I., Martin-Sanchez A.M, Martin-Gonzalez JA. Prevalence of antibodies to *Rickettsia conorii*, *Coxiella burnetii* and *Rickettsia typhi* in Salamanca Province (Spain). Serovurvey in the human population. *Eur J Epidemiol* 6: 293-9.1990.
- Ruiz-Beltran, R., Herrero-Herrero, J.I., Walker, D.H. and Cunado-Rodriguez, A. Mechanism of upper gastrointestinal hemorrhage in mediterranean spotted fever. *Trop.Geogr.Medic.* 42(1):78-82, 1990.
- Saah, A.J. *Rickettsia acari* (Rickettsialpox). In: *Principles and practice of infections diseases*, edited by Mandele, G.L., Douglas, R.G. and Bennett, J.E. New York: Churchill Livingstone, 1471, 1990.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. and Erlich, H.A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239:487-491, 1988.
- Scaffidi, V. Commento conclusivo alle relazioni sulle rickettsiosi. *Gior.Mal.Infet.Paras.* 23(11):1032-1035, 1971.
- Schramek, S., Brezina, R. and Kazar, J. Some biological properties of an endotoxic lipopolysaccharide from the typhus group rickettsiae. *Acta virol.* 21:439-441, 1977.
- Schramek, S., Radziejewska-Lebrecht, J. and Mayer, H. 3-C-Branched aldoses in lipopolysaccharide of phase I *Coxiella burnetii* and their role as immunodominant factors. *Eur.J.Biochem.* 148:455-461, 1985.
- Segura-Porta, F. and Font-Creus, B. Resurgence of mediterranean Spotted Fever in Spain. *Lancet* 280-280, 1982.
- Segura-Porta, F., Font-Creus, B., Espejo-Arenas, E. and Bella, F. New trends in mediterranean spotted fever. *Eur.J.Epidemiol.* 5(4):438-443, 1989.
- Sexton, D.J. and Corey, G.R. Rocky mountain spotless and almost spotless fever: a wolf in sheep's clothing. *Clin.Infect.Dis.* 15:439-448, 1992.
- Sexton, D.J., Corey, G.R., Breitschwerdt, E.B., Hegarty, B.C., Muniz, M., Dietze, R., Dumler, J.S. and Walker, D.H. Brazilian spotted fever in Espirito Santo, Brazil: description of a focus of infection in a new endemic region. *Am.Soc.Rick.Rick.Dis.* 1992.
- Sexton, D.J., Dwyer, B., Kemp, R. and Graves, S. Spotted fever group rickettsial infections in Australia. *Rev.Infect.Dis.* 13:876-886, 1991.
- Sexton, D.J., King, G. and Dwyer, B. Fatal Queensland tick typhus. *J.Infect.Dis.* 162(3):779-780, 1990.
- Shaked, Y., Samra, Y., Maeir, M.K. and Rubinstein, E. Murine typhus and spotted fever in Israel in the Eighties: retrospective analysis. *Infection* 16(5):283-287, 1988.
- Shibata, D., Martin, W.J., Appleman, M.D., Causey, D.M., Leedom, J.M. and Arnheim, N. Detection of cytomegalovirus DNA in peripheral blood of patients infected with human immunodeficiency virus. *J.Infect.Dis.* 158(6):1185-1192, 1988.

- Shirai, A., Dietel, J.W. and Osterman, J.V. Indirect hemagglutination test for human antibody to typhus and spotted fever group rickettsiae. *J.Clin.Microbiol.* 2(5):430-437, 1975.
- Silverman, D.J. Adherence of platelets to human endothelial cells infected by *Rickettsia rickettsii*. *J.Infect.Dis.* 153(4):694-700, 1986.
- Silverman, D.J. and Bond, S.B. Infection of human vascular endothelial cells by *Rickettsia rickettsii*. *J.Infect.Dis.* 149:201-206, 1984.
- Šilverman, D.J. Ultrastructure of *Rickettsiae* and *Rickettsia*-infected cells. In: *Rickettsiae and Rickettsial Diseases*, edited by Kazar, J. and Raoult, D. Bratislava: Slovak Academy of Sciences, 17, 1991.
- Silverman, D.J., Santucci, L.A. and Sekeyova, Z. Heparin protects human endothelial cells infected by *Rickettsia rickettsii*. *Infect.Immun.* 59(12):4505-4510, 1991.
- Silverman, D.J., Santucci, L.A., Meyers, N. and Sekeyova, Z. Penetration of host cells by *Rickettsia rickettsii* appears to be mediated by a phospholipase of rickettsial origin. *Infect.Immun.* 60(7):2733-2740, 1992.
- Smith, D.K. and Winkler, H.H. Characterization of a lysine-specific active transport system in *Rickettsia prowazekii*. *J.Bacteriol.* 129(3):1349-1355, 1977.
- Soliman, A.K., Botros, B.A.M., Ksiazek, T.G., Hoogstraal, H., Helmy, I. and Morrill, J.C. Seroprevalence of *Rickettsia typhi* and *Rickettsia conorii* infection among rodents and dogs in Egypt. *J.Trop.Med.Hyg.* 92:345-349, 1989.
- Sompolinsky, D., Boldur, I., Goldwasser, R. A., Kahana, H., Kazak, R., Keysary, A., Pik, A. Serological cross-reactions between *Rickettsia typhi*, *Proteus vulgaris* OX19, and *Legionella bozemanii* in a series of febrile patients. *Isr. J. Med. Sci.* 22: 745-52, 1986.
- Staszewski, S., Helm, E.B. and Stille, W. Autochthonic Mediterranean Spotted Fever in West Germany. *Lancet* 1466, 1984.
- Stenos, J., Baird, R.W. and Dwyer, B. Comparison of Australian spotted fever group rickettsial isolates. *Am.Soc.Rick.Dis.* 1992.
- Stephen, S., Laxminarayana, R.H. and Achyutha Rao, K.N. Serological evidence of infection by spotted fever group rickettsiae in Karnataka state. *Indian J.Med.Res* 72:352-354, 1980.
- Stoenner, H.G., Lackman, D.B. and Bell, E.J. Factors affecting the growth of *Rickettsias* of the spotted fever group in fertile hens' eggs. pp 121-128, 1961.
- Tamura, A. A comparative view of *Rickettsia* on the chemical aspect: In *Rickettsiae and Rickettsial Diseases*, edited by Kazar, J. and Raoult, D. Bratislava: Slovak Academy of Sciences, 36, 1991.
- Tarasevich, I.V. and Kazar, J. *Rickettsiae* and *Rickettsial* diseases in Eurasia. Bratislava: Slovak Academy of Sciences, 1988.
- Tarasevich, I.V., Makarova, V.A., Fetisova, N.F., Stepanov, A.V., Miskarova, E.D. and Raoult, D. Studies of "New" rickettsiosis "Astrakhan"spotted fever. In: *Rickettsiae and Rickettsial diseases*, edited by Kazar, J. and Raoult, D. Bratislava: Slovak Academy of Sciences, 465, 1991.
- Tarasevich, I.V., Makarova, V.A., Fetisova, N.F., Stepanov, A.V., Miskarova, E.D., Balayeva, N.M. and Raoult, D. Astrakhan fever, a spotted fever rickettsiosis. *Lancet* 337:172-173, 1991.

- Telenti, A., Aksamit, A.J., Proper, J. and Smith, T.F. Detection of JC virus DNA by polymerase chain reaction in patients with progressive multifocal leukoencephalopathy. *J.Infect.Dis.* 162:858-861, 1990.
- Teyssie, N. and Raoult, D. Comparison of western immunoblotting and microimmunofluorescence for diagnosis of Mediterranean spotted fever. *J.Clin.Microbiol.* 30(2):455-460, 1992.
- Teyssie, N., Arnoux, D., George, F., Sampol, J. and Raoult, D. Von Willebrand Factor Release and Thrombomodulin and Tissue Factor Expression in *Rickettsia conorii*-Infected Endothelial Cells. *Infect.Immun.* 60(10):4388-4393, 1992.
- Teyssie, N., Chiche-Portice, C. and Raoult, D. Intracellular movements of *Rickettsia conorii* and *R.typhi* based on actin polymerization. *Res.Microbiol.* 143:821-829, 1992.
- Tissot-Dupont, H. and Raoult, D. Epidemiologie de la fièvre boutonneuse mediterraneenne en France. *Med. Mal. Infect.* 23:485-490, 1993.
- Toullec, F. Essai nosographique des fièvres typho-exanthematiques. *Bull.Soc.Path.Exot.* 2:152-153, 1930.
- Τριχόπουλος, Α. *Επιδημιολογία: Αρχές, μέθοδοι, εφαρμογές*, Αθήνα: Παριζιάνος, Γ., 1982.
- Tringali, G., Intonazzo, V., Perna, A.M., Mansueto, S., Vitale, G. and Walker, D.H. Epidemiology of Boutonneuse Fever in Western Sicily. Distribution and Prevalence of Spotted Fever Group Rickettsial Infection in Dog Ticks (*Rhipicephalus sanguineus*). *Am.J.Epidemiol.* 123(4):721-727, 1986.
- Turco, J. and Winkler, H.H. Inhibition of the growth of *Rickettsia prowazekii* in cultured fibroblasts by lymphokines. *J.Exp.Med.* 157:974-986, 1983.
- Turco, J. and Winkler, H.H. Interferon and *Rickettsia prowazekii*. In: *Rickettsiae and Rickettsial diseases*, edited by Kazar, J. and Raoult, D. Bratislava: Slovak Academy of Sciences, 306, 1991.
- Tzianabos, T., Anderson, B.E. and McDade, J.E. Detection of *Rickettsia rickettsii* DNA in clinical specimens by using polymerase chain reaction technology. *J.Clin.Microbiol.* 27(12):2866-2868, 1989.
- Uchida, T., Uchiyama, T., Kumano, K. and Walker, D.H. *Rickettsia japonica* sp. nov., the etiological agent of spotted fever group rickettsiosis in Japan. *Int.J.Syst.Bact.* 42(2):303-305, 1992.
- Uchida, T., Yu, X.J., Uchiyama, T. and Walker, D.H. Identification of a unique spotted fever group Rickettsia from humans in Japan. *J.Infect.Dis.* 159(6):1122-1126, 1989.
- Uchiyama, T., Uchida, T. and Walker, D.H. Species-specific monoclonal antibodies to *Rickettsia japonica*, a newly identified spotted fever group Rickettsia. *J.Clin.Microbiol.* 28(6):1177-1180, 1990.
- Veron, M. and LeMinor, L. Rickettsiales. In: *Bacteriologie Medicale*, edited by Flammarion, Paris: Flammarion Medicine-Sciences, 1069-1071, 1989.
- Vicente, V., Alberca, I., Ruiz-Beltran, R., Herrero-Herrero, J.I., Gonzalez, R. and Portugal, J. Coagulation abnormalities in patients with mediterranean spotted fever. *J.Infect.Dis.* 153(1):128-131, 1986.

- Vicente, V., Alegre, A., Ruiz-Beltran, R., Herrero-Herrero, J.L., Portugal, J. and Alberca, I. Kinin-prekallikrein system in mediterranean spotted fever. *J.Infect.Dis.* 154(3):541, 1986.
- Vicente, V., Espana, F., Tabernero, D., Estelles, A., Aznar, J., Hendi, S. and Griffin, J. Evidence of Activation of the Protein C Pathway During Acute Vascular Damage Induced by Mediterranean Spotted Fever. *Blood* 78(2):416-422, 1991.
- Vishwanath, S. Antigenic relationships among the rickettsiae of the spotted fever and typhus groups. *FEMS Microbiol. Lett.* 81:341-344, 1991.
- Vishwanath, S., McDonald, G.A. and Watkins, N.G. A recombinant *Rickettsia conorii* vaccine protects guinea pigs from experimental Boutonneuse fever and Rocky Mountain spotted fever. *Infect.Immun.* 58(3):646-653, 1990.
- Walker, D.H. and Fishbein, D.B. Epidemiology of rickettsial diseases. *Eur.J.Epidemiol.* 7(3):237-245, 1991.
- Walker, D.H. and Gear, J.H.S. Correlation of the distribution of *Rickettsia conorii*, microscopic lesions, and clinical features in South African tick bite fever. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 34(2):361-371, 1985.
- Walker, D.H. *Biology of Rickettsial Diseases*, pp. 51-61, 1982.
- Walker, D.H. The role of host factors in the severity of spotted fever and typhus rickettsioses. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 590:10-19, 1990.
- Walker, D.H., Firth, W.T., Glen Ballard, J. and Hegarty, B.C. Role of phospholipase-associated penetration mechanism in cell injury by *Rickettsia rickettsii*. *Infect.Immun.* 40(2):840-842, 1983.
- Walker, T.S. Rickettsial interactions with human endothelial cells in vitro: adherence and entry. *Infect.Immun.* 44(2):205-210, 1984.
- Wang, G. and Walker, D.H. Identification of spotted fever group rickettsiae from human and tick-sources in the People's Republic of China. *J.Infect.Dis.* 156(4):665-669, 1987.
- Webb, L., Carl, M., Malloy, D.C., Dasch, G.A. and Azad, A.F. Detection of murine typhus infection in fleas by using the polymerase chain reaction. *J.Clin.Microbiol.* 28(3):530-534, 1990.
- Weil, E. and Felix, A. (1916): Zur serologischen Diagnose des Fleckfiebers (On serological diagnosis of spotted fever) - *Wien. Klin. Wochenschrift* 29:33-35.
- Weisburg, W.G., Tully, J.G., Rose, D.L., Petzel, J.P., Oyaizu, H., Yang, D., Mandelco, L., Sechrest, J.E., Lawrence, T.G., Van Etten, J., Maniloff, J. and Woese, C.R. A phylogenetic analysis of the mycoplasmas: basis for their classification. *J.Bacteriol.* 171(12):6455-6467, 1989.
- Weisburg, W.G., Woese, C.R., Dobson, M.E. and Weiss, E. A common origin of Rickettsiae and certain plant pathogens. *Science* 230:556-558, 1985.
- Weiss, E. The biology of Rickettsiae. *Ann.Rev.Microbiol.* 36:345-370, 1982.
- Weiss, E. and Dressler, H.R. Centrifugation of rickettsiae and viruses onto cells and its effect on infection. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* 103:691-695, 1960.
- Weiss, E. and Moulder, J.W. The rickettsia and chlamydia. In: *Bergeys manual of determinative bacteriology*, edited by Buchanan, R.E. and Gilson, N.E. Baltimore: William and Wilkins, 687-728, 1984.

- Weiss, E. and Strauss, B.S. The life and career of Howard Taylor Ricketts. *Rev.Infect.Dis.* 13:1241-1242, 1991.
- Weiss, E., Coolbaugh, J.C. and Williams, J.C. Separation of viable *Rickettsia typhi* from yolk sac and L cell host components by renografin density gradient centrifugation. *Appl.Microbiol.* 30(3):456-463, 1975.
- Weiss, L.M., Udem, S.A., Salgo, M., Tanowitz, H.B. and Wittner, M. Sensitive and specific detection of toxoplasma DNA in an experimental murine model: Use of toxoplasma gondii-specific cDNA and the polymerase chain reaction. *J.Infect.Dis.* 163:180-186, 1991.
- Welsh, J. and McClelland, M. PCR-amplified length polymorphisms in tRNA intergenic spacers for categorizing staphylococci. *Mol.Microbiol.* 6(12):1673-1680, 1992.
- Whelton, C.A., Donadio, J.V. and Elisberg, B.L. Acute renal failure complicating rickettsial infections in glucose-6-phosphate dehydrogenase-deficient individuals. *Ann.Intern.Med.* 69(2):323-328, 1968.
- WHO Working Group, Rickettsioses: a continuing disease problem. *Bull.W.H.O.* 60(2):157-164, 1982.
- Wike, D.A. and Burgdorfer, W. Plaque formation in tissue cultures by *Rickettsia rickettsii* isolated directly from whole blood and tick hemolymph. *Infect.Immun.* 6(5):736-738, 1972.
- Wilfert, C.M., MacCormack, J.N., Kleeman, K., Philip, R.N., Austin, E., Dickinson, V. and Turner, L. Epidemiology of rocky mountain spotted fever as determined by active surveillance. *J.Infect.Dis.* 150(4):469-479, 1984.
- Williams, J.C., Walker, D.H., Peacock, M.G. and Stewart, S.T. Humoral immune response to rocky mountain spotted fever in experimentally infected guinea pigs: immunoprecipitation of lactoperoxidase 125I-labeled proteins and detection of soluble antigens of *Rickettsia rickettsii*. *Infect.Immun.* 52(1):120-127, 1986.
- Williamson, L.R., Plano, G.V., Winkler, H.H., Krause, D.C. and Wood, D.O. Nucleotide sequence of the *Rickettsia prowazekii* ATP/ADP translocase-encoding gene. *Gene* 80:269-278, 1989.
- Winkler, H.H. and Daugherty, R.M. Regulatory role of phosphate and other anions in transport of ADP and ATP by *Rickettsia prowazekii*. *J.Bacteriol.* 160(1):76-79, 1984.
- Winkler, H.H. and Miller, E. Phospholipase A and the interaction of *Rickettsia prowazekii* and mouse fibroblasts (L-929 cells). *Infect.Immun.* 38(1):109-113, 1982.
- Winkler, H.H. Rickettsial permeability: an ADP-ATP transport system. *J.Biol.Chem.* 251(2):389-396, 1976.
- Wiseman, C.L. and Waddell, A. Interferonlike factors from antigen - and mitogen-stimulated human leukocytes with antirickettsial and cytolytic actions on *Rickettsia prowazekii*. *J.Exp.Med.* 157:1780-1793, 1983.
- Woese, C.R. Bacterial Evolution. *Microbiol.Rev.* 51(2):221-271, 1987.
- Wood, D.O., Williamson, L.R., Winkler, H.H. and Krause, D.C. Nucleotide sequence of the *Rickettsia prowazekii* citrate synthase gene. *J.Bacteriol.* 169(8):3564-3572, 1987.
- Yagupsky, P., Sarov, B., Naggan, L., Sarov, I., Keysary, A. and Goldwasser, R.A. The prevalence of IgG antibodies to spotted fever group rickettsiae among urban and rural dwelling children in southern Israel. *Scand. J. Infect. Dis.* 22(1):1990.

Zinsser, H. Varieties of typhus virus and the epidemiology of the american form of european typhus fever (Brill's Disease). pp 115-133, 1934.