

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΙΑΤΡΙΚΟ ΤΜΗΜΑ

ΤΟΜΕΑΣ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

Εργαστήριο Βακτηριολογίας Παρασιτολογίας
Ζωονόσων Τροπικής και Γεωγραφικής Ιατρικής

ΜΕΛΕΤΗ ΑΝΤΟΧΗΣ

ΤΗΣ *Coxiella burnetii*

ΣΤΙΣ ΚΙΝΟΛΟΝΕΣ

ΙΩΑΝΝΑ ΣΠΥΡΙΔΑΚΗ

Βιολόγος

Διδακτορική διατριβή

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2000

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

Στους γονείς μου
Μιχάλη και Γαρεφαλιά

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Βακτηριολογίας-Παρασιτολογίας Ζωονόσων και Γεωγραφικής Ιατρικής του Ιατρικού Τμήματος του Πανεπιστημίου Κρήτης, κάτω από την επίβλεψη και την καθοδήγηση του διευθυντή του εργαστηρίου καθηγητή Γιάννη Τσελέντη.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους συνετέλεσαν στην εκπόνηση της διατριβής:

-Τον καθηγητή κ. Γιάννη Τσελέντη για την ανεκτίμητη βοήθεια, το ενδιαφέρον και τις πολύτιμες συμβουλές του στην περάτωση της παρούσας μελέτης.

-Τον επίκουρο καθηγητή κ. Αχιλλέα Γκίκα, λοιμωξιολόγο, για τη σημαντική βοήθεια στη συγγραφή της εργασίας αυτής και τη συλλογή του κλινικού υλικού.

-Την στενή συνεργάτιδα κ. Άννα Ψαρουλάκη, βιολόγο, για τις συμβουλές της στο εργαστηριακό μέρος και στη συγγραφή της εργασίας αυτής.

-Τον κ. Βύρωνα Χανιώτη, εντομολόγο, για την συνεισφορά του στην συγκέντρωση και ταξινόμηση των κροτώνων.

-Τον κ. Διαμαντή Κοφτερίδη, ιατρό παθολόγο, για τη συλλογή του κλινικού υλικού.

-Την επίκουρο καθηγήτρια κ. Μαρία Αντωνίου για τη βοήθεια στη συγγραφή της εργασίας αυτής.

-Τον κ. Εμμανουήλ Κοκκινάκη, Δρ. βιοχημικό μηχανικό, για τη βοήθεια και συμβολή του στη στατιστική ανάλυση και συγγραφή της εργασίας αυτής.

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΓΙΑΝΝΗΣ	ΤΣΕΛΕΝΤΗΣ
ΝΙΚΟΣ	ΑΝΑΓΝΟΥ
ΑΧΙΛΛΕΑΣ	ΓΚΙΚΑΣ

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΓΙΑΝΝΗΣ	ΤΣΕΛΕΝΤΗΣ
ΝΙΚΟΣ	ΑΝΑΓΝΟΥ
ΑΧΙΛΛΕΑΣ	ΓΚΙΚΑΣ
ΜΑΡΙΑ	ΑΝΤΩΝΙΟΥ
ΓΕΩΡΓΙΟΣ	ΗΛΙΟΠΟΥΛΟΣ
ΝΙΚΟΣ	ΤΣΑΠΑΡΑΣ
ΧΑΡΑΛΑΜΠΟΣ	ΣΑΒΒΑΚΗΣ

ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΤΗΝ ΕΛΛΗΝΙΚΗ

- 1) Α. Ψαρουλάκη, Ι. Μανιατάς, **Ι. Σπυριδάκη**, Θ. Μπαμπάλης, Β. Χανιώτης, Θ. Γοζαδίνος, Ι. Τσελέντης.
Οικολογική μελέτη του Ενδημικού Τύφου στη Χαλκίδα.
20^ο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο, Αθήνα, Μάιος 1994.
- 2) **Ι. Σπυριδάκη**, Δ. Κοφτερίδης, Α. Γκίκας, Α. Ψαρουλάκη, Ι. Μανιατάς, Θ. Μπαμπάλης, Ι. Τσελέντης.
Ανίχνευση, Απομόνωση και Καλλιέργεια στελεχών *C. burnetii* με την τεχνική των shell vials.
21^ο Ετήσιο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο, Αθήνα, Μάιος 1995.
- 3) Α. Ψαρουλάκη, Ι. Μανιατάς, **Ι. Σπυριδάκη**, Μ. Αντωνίου, Θ. Μπαμπάλης, Ι. Τσελέντης.
Ανίχνευση και Γενοτυπική Τυποποίηση Ελληνικών Στελεχών *R. typhi*.
21^ο Ετήσιο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο, Αθήνα, Μάιος 1995.
- 4) Α. Ψαρουλάκη, Φ. Λουκαΐδης, Ι. Μανιατάς, **Ι. Σπυριδάκη**, Χ. Χατζηχριστοδούλου, Σ. Ζερβός, Α. Χατζηπαναγής, Ι. Τσελέντης.
Ανίχνευση και Τυποποίηση ρικετσιακών στελεχών σε κρότωναes από την Κύπρο με την τεχνική PCR-RFLP.
22^ο Ετήσιο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο, Μάιος 1996.
- 5) Δ. Κοφτερίδης, Λ. Μπούρος, Ι. Παπαδάκης, Ι. Μπαρμπουνάκης, **Ι. Σπυριδάκη**, Α. Γκίκας, Ι. Τσελέντης.
Q Fever Πνευμονία και Ακτινολογικά Ευρήματα.
8^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος, 1996.

Βραβευμένες εργασίες

Απονομή Επαίνου καλύτερης εργασίας του συνεδρίου από την Ιατρική Εταιρεία Αθηνών στη θεματική ενότητα Εφαρμοσμένη Έρευνα για την ερευνητική εργασία: Ανίχνευση και Τυποποίηση ρικετσιακών στελεχών σε κρότωναes από την Κύπρο με την τεχνική PCR-RFLP.
22^ο Ετήσιο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο, Μάιος 1996.

- 1) A. Psaroulaki, A. Gikas, S. Doukakis, **I. Spyridaki**, D. Kofteridis, S. Kastanakis, Y. Tselentis.
Molecular epidemiology of murine typhus in a focus in Greece.
European Society of Chemotherapy. 4th Scientific Meeting, 1996.
- 2) F. Loukaidis, C. Hadjichristodoulou, Y. Maniatis, A. Psaroulaki, T. Babalis, **I. Spyridaki**, P. Economidis, Y. Tselentis.
Serological and molecular epidemiology of Mediterranean Spotted Fever in Cyprus.
European Society of Chemotherapy. 4th Scientific Meeting, 1996.
- 3) A. Gikas, **I. Spyridaki**, D. Kofteridis, A. Charvalou, A. Psaroulaki, Y. Tselentis.
Isolation and genotypic identification of *Coxiella burnetii* in 158 cases of Q fever.
European Society of Chemotherapy. 4th Scientific Meeting, 1996.
- 4) A. Psaroulaki, CH. Hadjichristodoulou, F. Loukaides, **I. Spyridaki**, Y. Tselentis.
Seroepidemiological survey of murine typhus in the island of Cyprus.
FEMS Supported Meeting, 1998.
- 5) A. Psaroulaki, **I. Spyridaki**, CH. Hadjichristodoulou, F. Loukaides, Y. Tselentis.
Identification of rickettsiae from 1888 ticks, collected from 50 regions of Cyprus, using polymerase chain reaction.
FEMS Supported Meeting, 1998.
- 6) F. Loukaides, A. Psaroulaki, **I. Spyridaki**, CH. Hadjichristodoulou, Y. Tselentis.
Coxiella burnetii in ticks, goats, sheep and humans in Cyprus: Detection, Isolation, and Molecular Identification of Six Strains.
American Society for Rickettsiology (ASR), joint Meeting, Marseille 1999.
- 7) D. Kofteridis, A. Gikas, **I. Spyridaki**, A. Psaroulaki, L. Vamvakas, I. Tselentis.
Clinical Response of Q Fever Infection to Makrolides.
The fourth international conference on the macrolides, azalides, streptogramins and ketolides, Barcelone 1998.
- 8) **I. Spyridaki**, A. Gikas, D. Kofteridis, A. Psaroulaki, L. Vamvakas, Y. Tselentis.
In vitro susceptibility of *Coxiella burnetii* to clarithromycin.
The fourth international conference on the macrolides, azalides, streptogramins and ketolides, Barcelone 1998.
- 9) **I. Spyridaki**, A. Psaroulaki, T. Babalis, Y. Tselentis.
Isolation and identification of spotted fever group rickettsiae from ticks collected in central Greece.
FEMS Supported Meeting, 1998.
- 10) **I. Spyridaki**, A. Gikas, D. Kofteridis, A. Psaroulaki, Y. Tselentis.
Q fever in the Greek island of Crete: Molecular identification of eight strains of *Coxiella burnetii* from clinical samples.
FEMS Supported Meeting, 1998.
- 11) A. Gikas, **I. Spyridaki**, D. Kofteridis, A. Psaroulaki, Y. Tselentis.
In vitro susceptibility of *Coxiella burnetii* to trovafloxacin and its comparison with five other antibiotics.
FEMS Supported Meeting, 1998.
- 12) **I. Spyridaki**, A. Psaroulaki, A. Aransay, E. Scoulica, Y. Tselentis.
Transformation of *Coxiella burnetii* to Quinolone-Resistant strain. Detection of a new pefloxacin resistance mutation in *Coxiella burnetii* *gyrA* by direct DNA sequencing and PCR-RFLP.
American Society for Rickettsiology (ASR), joint Meeting, Marseille 1999.

ΑΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

- 1) E. Charvalos, E. Peteinaki, **I. Spyridaki**, S. Manetas, Y. Tselentis. Detection of ciprofloxacin resistance mutations in *Campylobacter jejuni gyrA* by Nonradioisotopic Single-Strand Conformation Polymorphism and direct DNA sequencing. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* 10:129-133, 1996.
- 2) Y. Tselentis, A. Psaroulaki, J. Maniatis, **I. Spyridaki**, T. Babalis. Genotypic identification of Murine Typhus rickettsia in rats and their fleas in a endemic area of Greece by the Polymerase Chain Reaction and Restriction Fragment Length Polymorphism. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 54(4): 413-417, 1996.
- 3) **I. Spyridaki**, A. Gikas, D. Kofteridis, A. Psaroulaki, Y. Tselentis. Q fever in the Greek island of Greece: Detection, isolation, and molecular identification of eight strains of *Coxiella burnetii* from clinical samples. *Journal of Clinical Microbiology.* 36(7): 2063-2067, 1998.
- 4) A. Gikas, **I. Spyridaki**, A. Psaroulaki, D. Kofteridis, Y. Tselentis. In vitro susceptibility of *Coxiella burnetii* to trovafloxacin in comparison with susceptibilities to pefloxacin, ciprofloxacin, ofloxacin, doxycycline, and clarithromycin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 42(10): 2747-2748, 1998.
- 5) **I. Spyridaki**, A. Psaroulaki, A. Aransay, E. Scoulica, Y. Tselentis. Diagnosis of Quinolone Resistant *Coxiella burnetii* strains by PCR-RFLP. *Journal Clinical Laboratory Analyses.* 14: 59-63, 2000.
- 6) B. Chaniotis, **I. Spyridaki**, Efi Scoulika, M. Antoniou. Colonization of *Phlebotomus neglectus* (Diptera: Psychodidae), the major vector of visceral leishmaniasis in Greece. *Journal of Medical Entomology.* 37(3):346-348.
- 7) M. Antoniou, I. Economou, X. Wang, A. Psaroulaki, **I. Spyridaki**, B. Papadopoulos, A. Christidou, Y. Tselentis. A 14 year seroepidemiological study of zoonoses in a Greek village. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* (accepted for publication).
- 8) **I. Spyridaki**, A. Psaroulaki, F. Loukaides, M. Antoniou, C. Hadjichristodoulou, Y. Tselentis. Isolation of *Coxiella burnetii* by a centrifugation shell vial assay from ticks collected in Cyprus: Detection by “nested” PCR and identification by PCR-RFLP. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* (accepted for publication).

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ-----	5
ΠΡΟΛΟΓΟΣ-----	6
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ-----	8
Ιστορική παρουσίαση-----	9
Ταξινομία-----	9
ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΗΣ <i>C. burnetii</i>.12	
ΒΑΚΤΗΡΙΟΛΟΓΙΑ-----	12
Μορφολογία και χρώσεις-----	12
Δομή της κυτταρικής μεμβράνης-----	13
Μεταβολισμός-----	14
Παράγοντες ανάπτυξης-----	14
ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ-----	15
Συστήματα καλλιέργειας-----	15
Είσοδος και ενδοκυττάρια ζωή της <i>C. burnetii</i> -----	15
Πολλαπλασιασμός-----	16
Φάση I και II της <i>C. burnetii</i> -----	18
ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ-----	20
Γενωμικό DNA <i>C. burnetii</i> -----	20
Πλασμίδιο QpH1-----	20
Πλασμίδιο QpRS-----	20
Πλασμίδιο QpDG-----	20
Πλασμίδιο QpDV-----	20
ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ-----	21
ΟΙΚΟΛΟΓΙΑ - ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ-----	22
ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΗ ΑΛΥΣΙΔΑ ΤΗΣ <i>C. burnetii</i> ΣΤΗ ΦΥΣΗ-----	22
ΜΕΤΑΔΟΣΗ ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ-----	23
Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΘΗΛΑΣΤΙΚΩΝ-----	25
Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΑΡΘΡΟΠΟΔΩΝ-----	25
Ο ρόλος του κρότωνα στη μετάδοση-----	27
Ο ρόλος του κρότωνα στη λοιμογόνο δύναμη της <i>C. Burnetii</i> -----	28
ΠΥΡΕΤΟΣ Q-----	29
ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ-----	29
Οξεία Λοίμωξη-----	30
Χρόνια Λοίμωξη-----	31
Πυρετός Q στα παιδιά-----	32
Πυρετός Q στα ζώα-----	32
ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΤΟΥ ΠΥΡΕΤΟΥ Q-----	33
Γεωγραφική Κατανομή του πυρετού Q-----	33
Εποχιακή Κατανομή-----	34
ΔΙΑΓΝΩΣΗ-----	35
Εμμεση Διάγνωση <i>C. burnetii</i> -----	35
Ορολογική Διάγνωση -----	35
Άμεση Διάγνωση <i>C. burnetii</i> -----	36

Απομόνωση (shell viall)-----	36
Ανίχνευση (nested PCR, PCR)-----	36
Ταυτοποίηση PCR-RFLP-----	37
ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΤΟΥ ΠΥΡΕΤΟΥ Q -----	38
Οξεία Λοίμωξη-----	38
Χρόνια Λοίμωξη-----	39
ΠΡΟΛΗΨΗ -----	40
Πρόληψη του πυρετού Q-----	40
Εμβόλια-----	40
ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑ ΤΗΣ <i>C. burnetii</i> ΑΠΕΝΑΝΤΙ ΣΤΑ	
ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ. -----	41
ΕΛΕΓΧΟΣ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ -----	42
Ζωικό μοντέλο-----	42
Χρήση εμβρυοφόρων αυγών-----	42
Μοντέλο κυτταρικής καλλιέργειας-----	42
Μοντέλο βακτηριοστατικής δράσης-----	42
Μοντέλο βακτηριοκτόνου δράσης-----	42
ΕΤΕΡΟΓΕΝΕΙΑ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ ΤΗΣ <i>C. burnetii</i> -----	43
Οξεία λοίμωξη-----	43
Χρόνια λοίμωξη-----	44
ΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΚΙΝΟΛΟΝΩΝ -----	44
Κινολόνες και ενδοκυττάρια βακτήρια-----	47
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ -----	48
ΕΙΣΑΓΩΓΗ-----	49
ΓΕΝΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΤΗΣ ΕΡΕΥΝΑΣ-----	51
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ -----	52
ΜΕΡΟΣ ΠΡΩΤΟ -----	53
ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ, ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΣΤΕΛΕΧΩΝ <i>C. burnetii</i>. -----	54
ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ <i>C. burnetii</i> -----	54
Ορολογικός έλεγχος -----	54
Έμμεσος ανοσοφθορισμός-----	54
Συλλογή και ταξινόμηση κροτώνων -----	55
Δοκιμασία της αιμολέμφου σε κρότωνα-----	56
Χρώση Gimenez-----	57
Άμεσος ανοσοφθορισμός-----	58
Τεχνική της PCR-----	59
Τεχνική της nested PCR-----	64
ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ <i>C. burnetii</i> -----	65
Τεχνική των shell- vials-----	65
Απομόνωση από buffy coat -----	66
Απομόνωση από αιμόλεμφο-----	66
Απομόνωση από σώμα κρότωνα-----	67
ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ -----	70
ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ -----	73
Τεχνική PCR- RFLP-----	73

Έλεγχος πλασμιδίων με τη χρήση της PCR.	76
ΜΕΡΟΣ ΔΕΥΤΕΡΟ	78
ΜΕΛΕΤΗ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ ΤΗΣ <i>C. burnetii</i> ΣΤΑ	
ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ.	78
ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΗΣ MIC	80
ΕΛΕΓΧΟΣ ΒΑΚΤΗΡΙΟΚΤΟΝΟΥ ΔΡΑΣΗΣ	87
ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ in vitro ΑΝΘΕΚΤΙΚΩΝ ΣΤΗ pefloxacin ΣΤΕΛΕΧΩΝ <i>C. burnetii</i>	90
ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΜΗΧΑΝΙΣΜΩΝ ΑΝΤΟΧΗΣ ΣΤΙΣ ΚΙΝΟΛΟΝΕΣ	91
ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ DNA ΓΥΡΑΣΗ A	91
Έλεγχος της περιοχής QRDR	92
Καθαρισμός της <i>C. burnetii</i> από το κύτταρο ξενιστή (Renografin Gradient Centrifugation)	92
Τεχνική της PCR	94
Τεχνική του Sequencing	95
Τεχνική της PCR-RFLP	95
ΜΕΛΕΤΗ ΑΔΙΑΒΑΤΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΠΟΡΙΝΩΝ	96
Τεχνική του SDS-PAGE	96
ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΗΣ ΕΝΔΟΚΥΤΤΑΡΙΑΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΤΗΣ Pefloxacin (uptake)	101
Vero κύτταρα μολυσμένα με το ευαίσθητο ή ανθεκτικό στέλεχος <i>C. burnetii</i>	104
Βακτηριακά κύτταρα <i>C. burnetii</i> (ευαίσθητα-ανθεκτικά)	107
ΕΛΕΓΧΟΣ ΕΝΕΡΓΟΥ ΕΚΡΟΗΣ ΤΟΥ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΟΥ	109
Πρόσληψη της pefloxacin παρουσία CCCP	109
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	110
ΜΕΡΟΣ ΠΡΩΤΟ	111
ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ, ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΣΤΕΛΕΧΩΝ <i>C. burnetii</i>.	111
Αποτελέσματα ορολογικού ελέγχου	111
Ταξινόμηση των κροτώνων	112
Αποτελέσματα ανίχνευσης <i>C. burnetii</i> με τη δοκιμασία της αιμολέμφου σε κρότωνα	113
Ανίχνευση <i>C. burnetii</i> με τη χρήση της nested PCR	114
Απομόνωση <i>C. burnetii</i>	117
Καλλιέργεια των απομονωθέντων στελεχών	122
Ταυτοποίηση των απομονωθέντων στελεχών	124
PCR-RFLP	124
Sequencing	130
Έλεγχο πλασμιδίων με τη χρήση της PCR	131
ΜΕΡΟΣ ΔΕΥΤΕΡΟ	132
ΜΕΛΕΤΗ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ ΣΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ	132
MICs των απομονωθέντων στελεχών στις κινολόνες, τετρακυκλίνες και μακρολίδες.	132
Αποτελέσματα βακτηριοκτόνου δράσης (MBC) της	

trovafloxacin.-----	134
Σύγκριση της ευαισθησίας στα αντιβιοτικά-----	135
ΜΕΛΕΤΗ ΑΝΤΟΧΗΣ ΣΤΙΣ ΚΙΝΟΛΟΝΕΣ -----	136
MICs των in vitro ανθεκτικών στις κινολόνες στελεχών <i>C. burnetii</i> -----	137
Ρόλος της DNA γυράσης -----	139
PCR-Sequencing της περιοχής QRDR του γονιδίου GyrA-----	139
Ανίχνευση της μετάλλαξης με τη χρήση της PCR- RFLP-----	143
Μελέτη αδιαβατότητας των πορινών -----	151
Πρωτείνες εξωτερικής μεμβράνης ευαίσθητων και ανθεκτικών στελεχών-----	151
Πρότυπη γραφική παράσταση της refloxacin -----	152
Υπολογισμός της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης της Pefloxacin -----	154
Vero κύτταρα μολυσμένα με <i>C. burnetii</i> -----	154
Βακτηριακά κύτταρα-----	161
Έλεγχος ενεργού εκροής της refloxacin -----	168
Ενδοκυττάρια συγκέντρωση της Pefloxacin παρουσία CCCP.-----	168
Επίδραση της θερμοκρασίας και του pH στην πρόσληψη της refloxacin. -----	168
 ΣΥΖΗΤΗΣΗ -----	169
 ΠΕΡΙΛΗΨΗ -----	179
 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ -----	182

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

⁰C: βαθμοί κελσίου
Ag: αντιγόνο
bp: ζεύγοι βάσεων
DNA: δεσοξυριβονουκλεϊκό οξύ
IgA: ανοσοσφαιρίνη A
IgM: ανοσοσφαιρίνη M
IgG: ανοσοσφαιρίνη G
IFA: ανοσοφθορισμός
kDa: κιλodalton
ΛΠΣ: λιποπολυσακχαρίτης
MIC: minimum inhibitor concentration
MBC: minimum bactericide concentration
PBS: ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών
PCR: Polymerase Chain Reaction (Αλυσιδωτή αντίδραση της Πολυμεράσης
LMP: Agarose Low Metting Point
P: P value.
QRDR: Quinolone Resistance Determing Region
RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism
SDS-PAGE: Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis
UV: υπεριώδες

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Οι ρικέτσιες είναι Gram αρνητικά βακτήρια, τα οποία είναι υποχρεωτικά ενδοκυττάρια παράσιτα (1, 59, 61).

Το γένος *Coxiella* περιλαμβάνει ένα μοναδικό εκπρόσωπο, την *Coxiella burnetii*, η οποία όμως εμφανίζει μεγάλη φαινοτυπική ποικιλομορφία ως προς την λοιμογόνο της δύναμη, την κυτταροπαθογόνο δράση και την ευαισθησία στα αντιβιοτικά (1, 141). Η *Coxiella burnetii* προκαλεί τον πυρετό Q, μια ανθρωποζωνόσο με παγκόσμια εξάπλωση (9, 75, 99, 141).

Ο μικροοργανισμός διατηρείται στη φύση μέσα από πολύπλοκους κύκλους, στους οποίους εμπλέκονται αρθρόποδα, τρωκτικά πουλιά, άγρια και κατοικίδια ζώα (1, 90, 134). Έχει αποδειχθεί ότι, οι κρότωνα εμπλέκονται στον κύκλο σαν μεταβιβαστές αλλά και σαν ξενιστές της *Coxiella burnetii*. Η μετάδοση του παθογόνου παράγοντα στα ζώα και από τα ζώα στον άνθρωπο γίνεται κυρίως με την εισπνοή μολυσμένης σκόνης ή σταγονιδίων που δημιουργούνται σε χώρους όπου συχνάζουν ζώα (σφαγεία, στάβλοι κ.λ.π.) και με κατανάλωση μολυσμένου κρέατος και γάλακτος (1, 93, 141). Η μετάδοση διευκολύνεται από την δυνατότητα της *Coxiella burnetii* να παράγει ενδοσπόρια με αποτέλεσμα να είναι πιο ανθεκτική σε διάφορους φυσικούς και χημικούς παράγοντες και στο περιβάλλον (1, 84). Ο μικροοργανισμός βρίσκεται στο γάλα, στα ούρα, στα κόπρανα και στα λόχεια των μολυσμένων ζώων χωρίς να υπάρχει κλινικά εμφανής λοίμωξη σε αυτά (1, 141).

Η προσβολή του ανθρώπου από *Coxiella burnetii* μπορεί να εμφανιστεί σαν οξεία ή χρόνια λοίμωξη (1, 15, 18, 47, 141). Η οξεία λοίμωξη συνήθως χαρακτηρίζεται με διάμεση πνευμονία, υψηλό πυρετό και ισχυρούς πονοκεφάλους. Οι περισσότερες περιπτώσεις του οξέος πυρετού Q είναι αυτοιάσιμες. Η τετρακυκλίνη είναι το φάρμακο που συνιστάται σήμερα για την αντιμετώπιση της λοίμωξης. Τελευταία οι φλουοροκινολόνες χρησιμοποιούνται με ικανοποιητικά αποτελέσματα στη θεραπεία του πυρετού Q, γιατί έχουν καλή διάχυση στους ιστούς, έχουν μεγάλο χρόνο ημιζωής και λίγες ή καθόλου παρενέργειες. Η μόλυνση μπορεί να έχει χρόνια εξέλιξη και σε σπάνιες περιπτώσεις να καταλήξει σε ενδοκαρδίτιδα (χρόνια λοίμωξη) (1, 8, 127, 141). Για την αντιμετώπιση του χρόνιου πυρετού Q, η θεραπεία με αντιβιοτικά αποτελεί ένα πραγματικό πρόβλημα που παραμένει άλυτο, καθώς ο χρόνιος πυρετός Q απαιτεί μια παρατεταμένη αντιβιοτική αγωγή. Η τετρακυκλίνη, η χλωραμφενικόλη, οι κινολόνες, η ριφαμπικίνη ή ο συνδυασμός τους αποτελούν το κύριο στήριγμα της θεραπείας του χρόνιου πυρετού Q. Παρόλο που τα παραπάνω αντιβιοτικά φαίνονται αποτελεσματικά για τον έλεγχο της νόσου, δεν εξαλείφουν εντελώς το λοιμογόνο παράγοντα αλλά αναστέλλουν την ανάπτυξη του. Δεν υπάρχει ομοφωνία όσον

αφορά την χρονική διάρκεια της αντιβιοτικής αγωγής για την ενδοκαρδίτιδα από *Coxiella burnetii* (1, 135, 141).

Η εργαστηριακή διάγνωση του μικροοργανισμού γίνεται με ορολογικές μεθόδους. Αντισώματα φάσης I και φάσης II μπορούν να ανιχνευτούν με την μέθοδο της συγκόλλησης του συμπληρώματος (CF), τον έμμεσο ανοσοφθορισμό (IFA) και τη μέθοδο ELISA (1, 114, 127, 159). Σήμερα οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται περισσότερο είναι ο IFA και η ELISA.

Η *Coxiella burnetii* αναπτύσσεται εύκολα σε εμβρυοφόρα αυγά όρνιθας, σε πειραματόζωα και σε κυτταρικές καλλιέργειες (1, 141).

Η πολυμορφία των κλινικών εκδηλώσεων του πυρετού Q, καθιστά απαραίτητο τον έλεγχο σε κάθε παρατεταμένο εμπύρετο στις ενδημικές ζώνες.



ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ

Η πρώτη περιγραφή της νόσου έγινε το 1935 από τον Derrick ο οποίος παρατήρησε ότι 20 από τους 800 εργαζόμενους σε σφαγείο στο Brisbane, στην Αυστραλία παρουσίασαν ένα εμπύρετο αυτοιόξιμο νόσημα αγνώστου αιτιολογίας. Ο Derrick ονόμασε το νόσημα Q fever (querry fever), λόγω έλλειψης αιτιολογικών και φυσιολογικών πληροφοριών της νόσου (37, 141).

Το 1937 οι Burnet και Freeman απομόνωσαν σε ινδικά χοιρίδια και ταυτοποίησαν έναν μικροοργανισμό ο οποίος έμοιαζε με ρικέτσια (21, 141). Τα πειραματόζωα είχαν μολυνθεί με αίμα από νοσούντες εργάτες σφαγείων και ο μικροοργανισμός που απομονώθηκε ονομάστηκε αρχικά *Rickettsia burnetii* (38, 39, 186), και στη συνέχεια *Coxiella burnetii* (141, 186).

Το 1938 έγινε η πρώτη απομόνωση *Coxiella burnetii* από κρότωνα (*Dermacentor andersoni*) από τους Davis και Cox (34, 141).

Το 1948 ο Phillip πρότεινε τη δημιουργία του γένους *Coxiella* με ένα μοναδικό εκπρόσωπο, την *Coxiella burnetii* (141, 186).

Στην Ελλάδα κατά την διάρκεια του δευτέρου παγκοσμίου πολέμου, ο Καμινόπετρος ανίχνευσε *C. burnetii* σε στρατιώτες και το 1943 απομόνωσε *Coxiella burnetii* σε ινδικά χοιρίδια από ασθενή με εμπύρετο νόσημα (25).

ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ

Ο όρος ρικέτσια χρησιμοποιήθηκε στο παρελθόν για να προσδιορίσει είτε την ευρύτερη τάξη των *Rickettsiales* είτε την οικογένεια *Rickettsiaceae* είτε την φυλή *Rickettsiae*. Σήμερα χρησιμοποιείται για να προσδιορίσει τα είδη του γένους *Rickettsia* (141).

Αρχικά στην ευρεία τάξη των *Rickettsiales* κατατάχτηκαν οι ρικέτσιες και τα χλαμύδια με κριτήριο τον υποχρεωτικά ενδοκυττάριο παρασιτισμό τους και τη στενή σχέση τους (στις περισσότερες περιπτώσεις) με αρθρόποδα.

Αργότερα, τα χλαμύδια αποτέλεσαν την τάξη των *Chlamydiales* και η τάξη των *Rickettsiales* περιέλαβε τρεις οικογένειες: *Anaplasmataceae* (δεν περιλαμβάνει είδη παθογόνα για τον άνθρωπο), *Bartonellaceae* και *Rickettsiaceae*.

Ο διαχωρισμός των οικογενειών έγινε με κριτήριο το αν καλλιεργούνται και σε ερυθροκύτταρα (*Anaplasmataceae*, *Bartonellaceae*) ή μόνο σε εμπύρηννα κύτταρα (*Rickettsiaceae*).

Η οικογένεια των *Rickettsiaceae* διαιρείται σε τρεις φυλές: *Rickettsiae*, *Ehrlichiae* και *Wolbachiae* (δεν περιλαμβάνει είδη παθογόνα για τον άνθρωπο).

Η φυλή *Rickettsiae* υποδιαιρείται σε δύο γένη: *Coxiella* και *Rickettsia*. Το γένος *Coxiella* περιλαμβάνει ένα μοναδικό εκπρόσωπο, την *C. burnetii*.

Χρήσιμα χαρακτηριστικά για την ταυτοποίηση του γένους *Coxiella*, σε σχέση με το γένος *Rickettsia*, φαίνονται στον πίνακα που ακολουθεί (πιν. 1).

Πίνακας 1.

Χαρακτήρες	<i>Rickettsia</i>	<i>Coxiella</i>
1) Καλλιέργεια σε θρεπτικά υλικά	-	-
2) Ανάπτυξη σε ευκαρυωτικά κύτταρα	+	+
3) Σχηματισμός φαγολυσοσωμάτων	-	+
4) Σχηματισμός ενδοσπορίων	-	+
5) Άριστο pH	7	4,5
6) Μεταβολισμός Γλυκόζης	-	ασθενείς
γλουταμινικού οξέος	+	+
σουκινικού οξέος	ασθενείς	+
7) Mol% G+C του DNA	29-33	43

Το γένος *Rickettsia* διαιρείται σε τρεις ομάδες:

- Ομάδα των εξανθηματικών τύφων
- Ομάδα των κηλιδωδών πυρετών
- Ομάδα του τύπου των θάμνων (βλέπε πίνακα 2).

Πίνακας 2. Ταξινόμηση των βακτηρίων της οικογένειας των *Rickettsiaceae*.

Οικ/νεια	φυλή	Γένος	Ομάδα	Είδος		
R i c k e t t s i a c e a e	R i c k e t t s i e a e	R i c k e t t s i a	Τύφου	R. prowazekii R. typhi R. canada		
			Κηλιδωδών	R. acari R. australis R. belli R. conorii R. helvetica R. japonoca R. montana		
				Πυρετών	R. parkeri R. rhipicephali R. rickettsii R. sibirica R. slovac R. israeli R. africae R. massilia R. Astrakhan fever	
			Θάμνων		R. tsutsugamushi	
			Coxiella		C. burnetii	
			Ehrlichiaeeae		Ehrlichia	E. canis E. chaffaensis E. sennetsu E. phagocytophila
					Cowdria Neorickettsia	C. ruminantium
			Wolbachieae		Wolbachia	W. pipientis W. melophagi W. persica
				Rickettsiella	R. popilliae R. grylli R. chironomi	

ΧΑΡΑΚΗΤΗΡΙΣΤΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΗΣ *C. burnetii*.

1. ΒΑΚΤΗΡΙΟΛΟΓΙΑ

Η *C. burnetii* είναι ένα υποχρεωτικά ενδοκυττάριο βακτήριο, το οποίο ολοκληρώνει τον κύκλο της ανάπτυξης του στο φαγολυσόσωμα του ευκαρυωτικού κυττάρου. Μοιάζει με τα άλλα μέλη του γένους *Rickettsia* ως προς το ότι είναι αυστηρά ενδοκυττάριο παράσιτο, διαφέρει όμως στους βιοχημικούς μηχανισμούς, στην είσοδο και στην επιβίωση της στα ευκαρυωτικά κύτταρα.

Μορφολογία και χρώσεις.

Το κύτταρο της *C. burnetii* είναι μικρότερο από άλλα κύτταρα του γένους *Rickettsia*, με διαστάσεις που κυμαίνονται από 0,2 χ 0,4 έως 0,4 χ 1 μm (1).

Κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης της μέσα στα φαγολυσόσωμα των κυττάρων-ξενιστών (ζώων, κυττάρων λεκιθικού σάκου εμβρυοφόρων αυγών και ευκαρυωτικών κυττάρων καλλιέργειας), παρατηρείται σχηματισμός πλειομορφικών βακτηριακών κυττάρων (1, 26, 87, 110, 141, 188).

Η **κυτταρική παραλλαγή SCV (μικροκυτταρική)** εμφανίζεται σε βακτηριακά κύτταρα με ραβδόμορφο σχήμα.

Η **κυτταρική παραλλαγή LCV (μακροκυτταρική)** είναι μεγαλύτερη και περισσότερο πλειομορφική σε σχέση με την μικροκυτταρική. Τα βακτηριακά κύτταρα έχουν ωοειδές σχήμα ή σχήμα κοκκοβάκιλλου.

Παρόλο που ανάμεσα σ' αυτές τις πλειομορφικές παραλλαγές της *C. burnetii*, έχουν καταγραφεί θεμελιώδεις διαφορές ως προς το κυτταρικό τους μέγεθος, την μικροσκοπική τους δομή αλλά και ως προς την φυσιολογία τους, δεν έχουν βρεθεί διαφορές ως προς τα αντιγόνα.

Για να εξηγηθεί το παραπάνω φαινόμενο έχουν προταθεί δύο υποθέσεις:

- Τα μεγάλα βακτηριακά κύτταρα προέρχονται από την εκφύλιση των μικρών βακτηριακών κυττάρων.
- Και οι δύο αυτοί βακτηριακοί κυτταρικοί τύποι αντιπροσωπεύουν μορφές ενός πολύπλοκου κύκλου ζωής.

Στην μορφολογία του βακτηρίου αναφέρεται επίσης η περιγραφή της δομής **ενδοσπορίου** η οποία εξηγεί την αντοχή που παρουσιάζει ο μικροοργανισμός έναντι μιας μεγάλης ποικιλίας δυσμενών φυσικών και χημικών παραγόντων (1, 87, 141).

Όταν χρωματισθεί ο μικροοργανισμός, είναι εύκολα ορατός κάτω από το οπτικό μικροσκόπιο. Ως ειδική χρώση

χρησιμοποιείται η *Gimenez*, η οποία τον χρωματίζει κόκκινο σε αντίθεση με το κυτταρόπλασμα του κυττάρου ξενιστή το οποίο χρωματίζεται πράσινο (1, 58).

Δομή της κυτταρικής μεμβράνης.

Η *C. burnetii* είναι ένα τυπικό προκαρυστικό κύτταρο το οποίο περιβάλλεται από πλασματική μεμβράνη. Η δομή της μοιάζει με αυτή των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων. Μερικά κύτταρα *C. burnetii* έχουν μία εξωτερική μη ευκρινή στιβάδα η οποία έχει πάχος 20 nm. Έχει προταθεί ότι αυτή η στιβάδα μπορεί να οφείλεται σε έναν βλεννοπολυσαχαρίτη με πολλές πλευρικές αλυσίδες. Το κυτταρικό τοίχωμα (εξωτερική μεμβράνη) έχει πάχος 70-100nm και αποτελείται από 3 στιβάδες. Κάτω από αυτό βρίσκεται η τρίστιβη πλασματική μεμβράνη (εσωτερική μεμβράνη) με πάχος 60-80nm. Στον περιπλασματικό χώρο υπάρχει μία λεπτή ενδιάμεση ζώνη πάχους 5nm η οποία έρχεται σε κοντινή σχέση με την εσωτερική επιφάνεια της εξωτερικής μεμβράνης πολλών κυττάρων (22, 23, 141).

Σχήμα 1.



Διάγραμμα επιφανειακής κατασκευής της *C. burnetii* σύμφωνα με το Dr. Burton (22, 23, 141).

Μεταβολισμός

Η *C. burnetii* έχει ενζυμικά συστήματα που είναι ανεξάρτητα από κείνα του ξενιστή. Τα ενδιάμεσα προϊόντα του κύκλου του τρικαρβοξυλικού οξέος φαίνεται ότι είναι η πρωταρχική πηγή άνθρακα και ενέργειας για τον μικροοργανισμό. Η οξειδωση του γλουταμινικού οξέος, αποτελεί μία εμφανώς προτιμητέα πηγή ενέργειας και οδηγεί στην ενδογενή σύνθεση ATP και στη συσσώρευση ενεργειακού φορτίου που επαρκεί για την αύξηση του μικροοργανισμού (60, 61, 67, 115, 141).

Διαθέτει ένα σύστημα μεταφοράς του L-γλουταμινικού οξέος το οποίο εξαρτάται από το pH. Το βέλτιστο pH για την μεταφορά και χρησιμοποίηση του L-γλουταμινικού οξέος και της γλυκόζης βρίσκεται μεταξύ 3 και 5, ενώ στην τιμή 7 ο μεταβολισμός και των δύο είναι ελάχιστος (60).

Παράγοντες ανάπτυξης

Η *C. burnetii* σε αντίθεση με το γένος *Rickettsia* παρουσιάζει αξιοσημείωτη αντοχή σε φυσικούς και χημικούς παράγοντες. Η βιωσιμότητα της εξαρτάται από τη θερμοκρασία και από τα χαρακτηριστικά του υποστρώματος.

Η θερμοκρασία αποτελεί παράγοντα αποφασιστικής σημασίας για τη βιωσιμότητα της *C. burnetii*. Οι χαμηλές θερμοκρασίες από 4 έως 6⁰ C ευνοούν την επιβίωση της, ενώ υψηλότερες θερμοκρασίες σε συνδυασμό με υψηλό pH στο υγρό μέσο επιταχύνουν την ανενεργοποίηση της. Σε θερμοκρασία **60⁰ C** επιβιώνει για 1 ώρα (141).

Στα **αποξηραμένα κόπρανα** των κροτώνων και των σπονδυλωτών ζώων επιβιώνει για περίπου 2 χρόνια. Στο **αποξηραμένο αίμα** για 6 μήνες, στα **αποξηραμένα ούρα** για πάνω από 1 μήνα, στο **μολυσμένο κρέας** σε θερμοκρασία ψυγείου για 30 ημέρες ενώ στο αλατισμένο κρέας για 5 μήνες. Στο **γάλα**, η *C. burnetii* επιβιώνει σε θερμοκρασία 63⁰ C για 30 λεπτά και σε θερμοκρασία 74⁰ C για 15 δευτερόλεπτα. Στο **τρίχωμα** των ζώων επιβιώνει στους 4-6⁰ C για ένα χρόνο, στους 15-20⁰ C για 7 μήνες και στους 34-36⁰ C για 2 μήνες. Στην **άμμο** ή στο **έδαφος** διατηρείται στους 4-6⁰ C για 7 μήνες, στους 15-20⁰ C για 4 μήνες και στους 34-36⁰ C για 2 μήνες. Η επιβίωση της στο **νερό** της βρύσης ή στο φυσικό νερό φτάνει στα 2-3 χρόνια (141).

2. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ

A) Συστήματα καλλιέργειας

Ο πολλαπλασιασμός της *C. burnetii* είναι αυστηρά ενδοκυττάριος. *In vivo* προσβάλλει μια μεγάλη ποικιλία κυττάρων. Σ' αυτά περιλαμβάνονται τα μακροφάγα, τα επιθηλιακά κύτταρα, τα κύτταρα του συνδετικού ιστού και άλλα μη ειδικά κύτταρα του αιμοποιητικού και λεμφικού ιστού (1, 166).

Έχουν αναπτυχθεί τριών ειδών συστήματα καλλιέργειας και απομόνωσης (1, 35, 130, 141):

- 1) **Τα πειραματόζωα.** Σαν πειραματόζωα έχουν χρησιμοποιηθεί τα ινδικά χοιρίδια τα οποία εμφανίζουν ευαισθησία στη μόλυνση με *C. burnetii*.
- 2) **Εμβρυοφόρα αυγά όρνιθας** και
- 3) **Κυτταρικές σειρές.** Οι κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιούνται είναι:
 - Τα Hel (Human embryonic lung), διπλοειδή κύτταρα μορφής ινοβλαστών,
 - Τα Vero, επιθηλιακά νεφρικά κύτταρα πιθήκου, και
 - Τα L929, ακτινοβολημένα κύτταρα ποντικού.

Η διαδικασία απομόνωσης της *C. burnetii* είναι επικίνδυνη και γι' αυτό γίνεται μόνο σε εξειδικευμένα εργαστήρια. Μια λιγότερο επικίνδυνη τεχνική για την ταχεία απομόνωση της *C. burnetii* προτάθηκε από τους Rault και συνεργάτες (130). Η τεχνική αυτή, των **shell vials**, συνίσταται σε φυγοκέντρηση του δείγματος (βιολογικό υλικό από ασθενή ή ξενιστή) πάνω σε μια στοιβάδα κυττάρων Hel. Η κυτταρική σειρά βρίσκεται πάνω σε ένα μικρό υάλινο δίσκο, μέσα σε σωλήνα φυγοκέντρησης.

Η προσπάθεια απομόνωσης πολλές φορές είναι ανεπιτυχής, είτε γιατί το δείγμα έχει μολυνθεί και από άλλους βακτηριακούς παράγοντες, είτε γιατί η ποσότητα *C. burnetii* μέσα σ' αυτό είναι πολύ μικρή.

B) Είσοδος και ενδοκυττάρια ζωή της *C. burnetii*.

Τα περισσότερα ενδοκυττάρια παράσιτα καταφέρνουν να ξεφύγουν από το μικροβιοκτόνο περιβάλλον των φαγολυσσοσωμάτων με διάφορους τρόπους. Αντίθετα, η *C. burnetii* προσκολλάται στην επιφάνεια των κυττάρων-ξενιστών, φαγοκυτταρώνεται, πολλαπλασιάζεται μέσα στα φαγολυσσοσώματα και παραμένει μέσα σ' αυτά δια βίου. Η βιοχημική φύση της θέσης προσκόλλησης παραμένει αδιευκρίνιστη. Μελέτες στην επιφάνεια των L929 κυττάρων έδειξαν ότι υπάρχουν ειδικές πρωτεΐνες στη θέση προσκόλλησης ή κοντά σ' αυτήν. Επάση των L929 κυττάρων με πρωτεάσες, είχε ως αποτέλεσμα την αναστολή της προσκόλλησης του βακτηρίου (22, 94).

Τα προσβεβλημένα κύτταρα από την *C. burnetii* περιέχουν πολλά κυτταροπλασματικά κενοτόπια με λίγους μικροοργανισμούς ή πιο συχνά παρατηρείται ένα μεγάλο κενοτόπιο, το οποίο καταλαμβάνει ολόκληρο σχεδόν το κύτταρο και περιέχει πολυάριθμους μικροοργανισμούς. Τα μολυσμένα από *C. burnetii* κύτταρα είναι μεγαλύτερα από τα φυσιολογικά κύτταρα. Σ' αυτές τις περιπτώσεις, ο πυρήνας του κυττάρου-ξενιστή ωθείται σε μία πλευρά και το υπόλοιπο περιεχόμενο του κυττάρου γύρω από το μεγάλο κενοτόπιο σχηματίζοντας μία λεπτή στιβάδα κυτταροπλάσματος (87, 110, 130).

Οι όξινες συνθήκες του φαγολυσοσώματος ενεργοποιούν τη μεταφορά, τον καταβολισμό και την ενσωμάτωση της γλυκόζης και του γλουταμινικού οξέως καθώς και τον πολλαπλασιασμό της *C. burnetii* (59, 60, 61).

Γ. Πολλαπλασιασμός

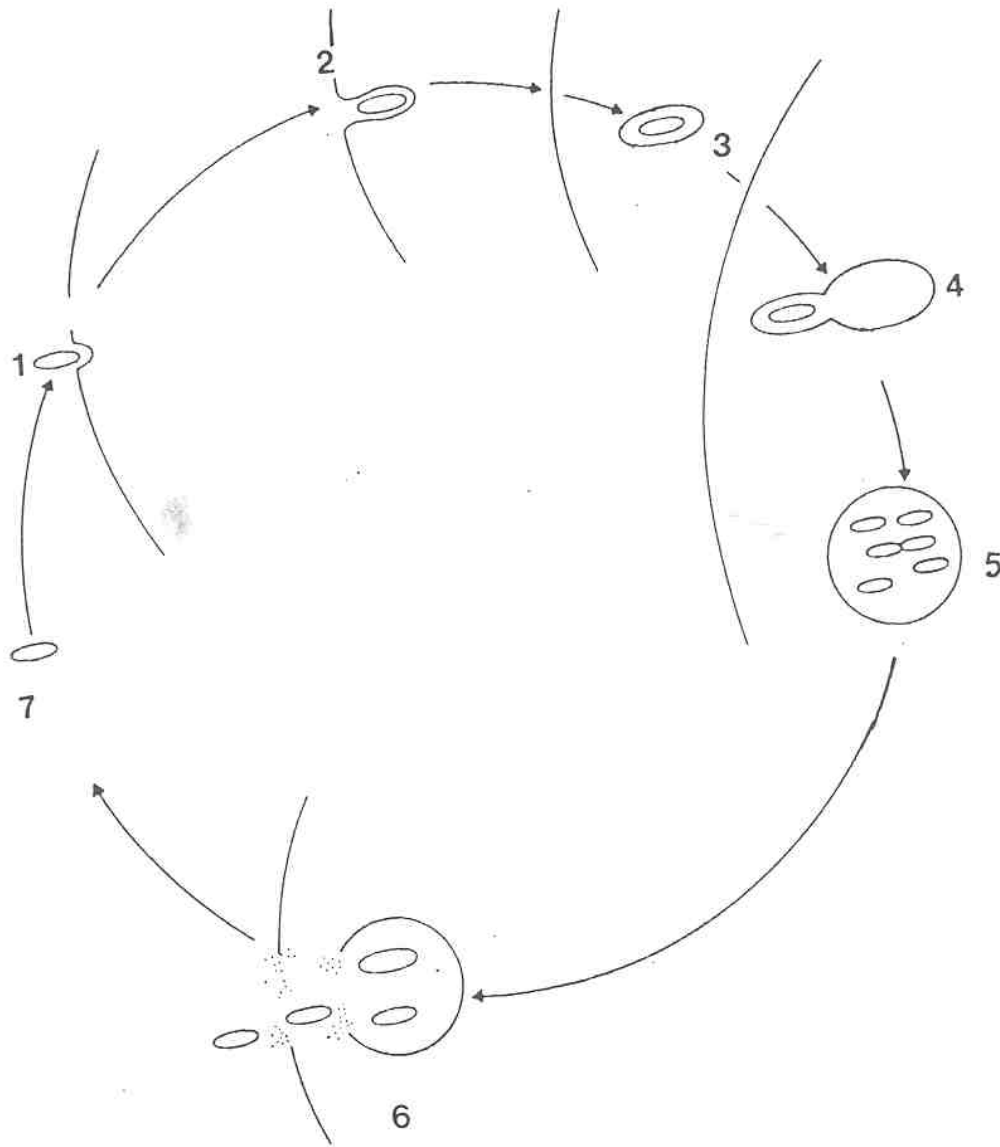
Η *C. burnetii* εισέρχεται στο κύτταρο-ξενιστή με φαγοκυττάρωση και επιβιώνει μέσα στο φαγολυσόσωμα παρουσία των λυσοσωμικών υδρολασών και του όξινου περιβάλλοντος (pH 4,5), για όλη τη διάρκεια του κύκλου της ζωής της. Αυτό οφείλεται στην αντοχή του μικροοργανισμού στα υδρολυτικά ένζυμα ή στο γεγονός ότι ο ρυθμός πολλαπλασιασμού ξεπερνά κατά πολύ το ρυθμό καταστροφής του βακτηρίου από τις λυσοσωμικές υδρολάσες. Ο οργανισμός πολλαπλασιάζεται μέσα σ' αυτά και τελικά οδηγεί στο θάνατο του κυττάρου-ξενιστή (12, 87, 166).

Η κυτταρική διαίρεση μπορεί να γίνει με:

- 1) **Διχοτόμηση.** Ο μικροοργανισμός πολλαπλασιάζεται με κυτταρική διχοτόμηση. Δημιουργείται περίσφιξη στη ζώνη του ισημερινού με αποτέλεσμα τη δημιουργία δύο ισομεγέθων θυγατρικών κυττάρων με τον ίδιο προορισμό.
- 2) **Διεργασία κυτταρικής διαφοροποίησης.** Συνίσταται στον ασύμμετρο σχηματισμό διαφραγμάτων και στην ασύμμετρη κατανομή του κυτταροπλασματικού DNA. Το αποτέλεσμα είναι η δημιουργία ενός λειτουργικά διαφοροποιημένου θυγατρικού κυττάρου και η λύση του μητρικού κυττάρου. Μερικές μεγαλοκυτταρικές μορφές υφίστανται εγκάρσια κυτταρική διχοτόμηση με ασύμμετρη διαίρεση του κυττάρου, η οποία χαρακτηρίζεται από σχηματισμό ενδοσπορίων (87).

Μερικές φορές η *C. burnetii* προκαλεί επίμονη λοίμωξη στους φυσικούς ξενιστές της αλλά και στις κυτταροκαλλιέργειες που διατηρούνται μολυσμένες χωρίς την προσθήκη φυσιολογικών κυττάρων. Σ' αυτές τις περιπτώσεις, οι προσβεβλημένοι πληθυσμοί κυττάρων με υψηλό βαθμό μόλυνσης, υφίστανται μίτωση, με αποτέλεσμα, από τα δύο θυγατρικά κύτταρα, το ένα να είναι μολυσμένο ενώ το άλλο να είναι ελεύθερο παρασίτων αλλά επιρρεπές στη μόλυνση (12, 87, 166).

Σχήμα 2. Διάγραμμα μολυσματικού και αναπτυξιακού κύκλου της *C. burnetii*.



1. Η *C. burnetii* προσκολλάται στην επιφάνεια του κυττάρου ξενιστή. 2. Προσροφάται και περικλείεται στο εσωτερικό μιας εγκόλπωσης, που δημιουργείται από τη πλασματική μεμβράνη του κυττάρου ξενιστή. 3. Η πλασματική μεμβράνη περισφίγγεται στο σημείο που έχει δημιουργηθεί η εγκόλπωση με αποτέλεσμα το σχηματισμό ενός φαγοσώματος που περιέχει την *C. burnetii*. 4. Τα φαγοσώματα συντήκονται με τα λυσοσώματα του κυττάρου ξενιστή. 5. Η *C. burnetii* πολλαπλασιάζεται και αναπτύσσεται στο εσωτερικό του φαγολυσοσώματος. 6. Οι *C. burnetii* εξέρχονται με λύση του κυττάρου ξενιστή. 7. Τα εξωκυττάρια βακτήρια μπορούν να μολύνουν καινούργια κύτταρα ξενιστή.

Δ. Φάση I και Φάση II της *C. burnetii*

Η *C. burnetii* είναι η μόνη ανάμεσα στις ρικέτσιες που παρουσιάζει δύο αντιγονικές μορφές, τη φάση I και II (1, 112, 141, 188). Στη φύση και στα πειραματόζωα η *C. burnetii* βρίσκεται στη Φάση I. Μετά από επαναλαμβανόμενα περάσματα των οργανισμών φάσης I σε λεκιθικό σάκο εμβρύων όρνιθας ή διαδοχικές ανακαλλιέργειες, παρατηρείται σταδιακή μετάπτωση στη Φάση II. Η πλήρης μετατροπή μπορεί να χρειαστεί μέχρι και 100 περάσματα σε αυγά, αλλά τα περισσότερα από τα χαρακτηριστικά της φάσης II αποκτούνται μετά το δέκατο πέρασμα (1)

Η Φάση II μπορεί να μετατραπεί σε Φάση I με ένα μόνο πέρασμα σε εργαστηριακά πειραματόζωα. Υπάρχει επίσης η δυνατότητα της λήψης της φάσης I μέσω περάσματος της φάσης II σε κρότωνα (Dermacentor marginatus, Hyalomma asiaticum) (1).

Έχουν διατυπωθεί δύο υποθέσεις που εξηγούν την ύπαρξη των διαφορετικών φάσεων στην *C. burnetii* (141):

- Τα στελέχη *C. burnetii* συνιστούν ετερόλογους πληθυσμούς με τις δύο φάσεις παρούσες και με επικράτηση της μιας ή της άλλης φάσης. Κατά το πέρασμα ενός ετερόλογου πληθυσμού βακτηρίων σε έμβρυα της όρνιθας επιλέγονται οι ισχυρά λοιμογόνες μορφές, ενώ κατά το πέρασμα σε πειραματόζωα επιλέγονται μορφές με χαμηλή παθογονικότητα. Κατά τη διαδικασία του περάσματος στα ζώα, τα στελέχη της φάσης II, επιστρέφουν στη λοιμογόνο φάση I, εξαιτίας της επιλεκτικής συσσώρευσης της λοιμογόνου μορφής, η οποία παραμένει στον πληθυσμό μετά τα περάσματα αυτά. Φαίνεται λοιπόν, ότι η μετάπτωση από τη φάση II στη φάση I γίνεται στις περιπτώσεις εκείνες που η δεξαμενή με τα βακτήρια έχει μικτή σύνθεση, δηλαδή αποτελείται από φάσης I και II μικροοργανισμούς. Όταν ο πληθυσμός είναι αμιγής φάσης II, τότε δεν παρατηρείται καμμία μεταβολή από τη φάση II στη Φάση I. Στελέχη που έχουν υποστεί πάνω από 100 περάσματα σε λεκιθικούς σάκκους, δεν αναπτύσσονται στα ποντίκια και η μετατροπή τους σε φάση I είναι αδύνατη. Επομένως τα στελέχη αυτά θεωρούνται ότι βρίσκονται σε 'αμιγή' φάση II.
- Οι διαφορετικές φάσεις οφείλονται σε φυσικοχημικές μεταβολές της επιφάνειας των βακτηρίων. Οι διαφορές θα πρέπει να συνδέονται άμεσα με την ηλεκτροχημική κατάσταση του κυτταρικού τοιχώματος των μικροοργανισμών αυτών, π.χ. με το καθαρό αρνητικό φορτίο των οργανισμών της φάσης II.

Διαφορές φάσης I και II

Η *C. burnetii* φάσης I διαφέρει από τη φάση II στη συγκέντρωση πρωτεϊνών και υδατανθράκων (83, 141, 161). Ο λιποπολυσακχαρίτης (ΛΠΣ) και των δύο φάσεων είναι ο τυπικός για τους Gram-αρνητικούς μικροοργανισμούς. Ωστόσο, παρατηρούνται συγκεκριμένες ποσοτικές και ποιοτικές διαφορές όσον αφορά τη σύνθεση σε σάκχαρα και το συνολικό περιεχόμενο του ΛΠΣ (10, 62). Οι μικροοργανισμοί φάσης II περιέχουν το ένα δέκατο της ποσότητας του τοξικού ΛΠΣ της κυτταρικής επιφάνειας που περιέχουν οι μικροοργανισμοί της φάσης I (6, 11, 62). Αυτό μπορεί να εξηγήσει τη μικρότερη λοιμογόνο δύναμη και τη μεγαλύτερη ευαισθησία στη φαγοκυττάρωση που χαρακτηρίζουν τους μικροοργανισμούς φάσης II (63, 78). Οι Schramek και Mayer ανακοίνωσαν ότι ο ΛΠΣ της φάσης II έχει μόνο 2 από τα 9 σάκχαρα που ανιχνεύονται στον ΛΠΣ της φάσης I (150). Η φάση I διαφέρει επίσης από τη φάση II στη συγκέντρωση των πρωτεϊνών (73).

Φαγοκυττάρωση. Η φάση II φαγοκυτταρώνεται πιο εύκολα από την φάση I. Φαίνεται ότι ο ΛΠΣ συνιστά έναν καθοριστικό παράγοντα για τη λοιμογόνο δύναμη της *C. burnetii*. Πιθανόν η ύπαρξη του ΛΠΣ σε μεγαλύτερη ποσότητα στη φάση I, παίζει κάποιο ρόλο στην παρεμπόδιση της εισόδου της *C. burnetii* φάσης I (141).

Αντιγονικές ιδιότητες. Βάσει των κλασσικών ορολογικών μεθόδων, η *C. burnetii* έχει δύο βασικά αντιγονικά συστατικά. Το ένα εντοπίζεται στην κυτταρική επιφάνεια, είναι λίγο ενεργό από ανοσολογική άποψη και είναι χαρακτηριστικό της φάσης I. Το άλλο βρίσκεται βαθύτερα, είναι πολύ ενεργό από ανοσολογική άποψη και χαρακτηρίζει τη φάση II. Το συστατικό της φάσης I, το οποίο καλύπτει το αντιγόνο της φάσης II, εξαφανίζεται κατά την ανάπτυξη στα εμβρυοφόρα αυγά της όρνιθας. Σ' αυτές τις περιπτώσεις η υψηλή ορολογική ενεργότητα του στελέχους καθορίζεται από το ακάλυπτο πλέον συστατικό της φάσης II. Τα πρωτοεμφανιζόμενα αντισώματα στρέφονται κατά της φάσης II, και μόνο αργότερα παράγονται αντισώματα εναντίον της φάσης I (141).

Τα βακτηριακά κύτταρα της φάσης I είναι υδρόφιλα ενώ τα κύτταρα της φάσης II είναι υδρόφοβα (141).

Αν και οι δύο φάσεις αναπτύσσονται αρκετά καλά σε εμβρυοφόρα αυγά όρνιθας, μόνο μικροοργανισμοί της φάσης II πολλαπλασιάζονται με ευκολία σε κυτταρικές σειρές όπως ακτινοβολημένα κύτταρα ποντικού (L929) ή ανθρώπινους ινοβλάστες HEL (141).

3. ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

Το γένωμα της *C. burnetii* έχει μέγεθος 1.1×10^8 daltons. Το περιεχόμενο σε G + C του DNA της, βρέθηκε να είναι 43% (109).

Μέχρι πρόσφατα, επικρατούσε η αντίληψη ότι η οξεία και χρόνια λοίμωξη οφείλονται στον ίδιο μικροοργανισμό. Όμως, πρόσφατες βιοχημικές και γενετικές μελέτες υποστηρίζουν ότι οι μικροοργανισμοί που απομονώνονται από περιπτώσεις χρόνιας ενδοκαρδίτιδας διαφέρουν από εκείνες που προκαλούν οξείες λοιμώξεις. Στην *C. burnetii* σε αντίθεση με τις ρικέτσιες έχει παρατηρηθεί η παρουσία πλασμιδίων. Διαφορετικά πλασμίδια έχουν βρεθεί σε *C. burnetii* που έχουν απομονωθεί από ανθρώπους και ζώα (88).

Πλασμίδιο QpH1. Στελέχη *C. burnetii* που έχουν απομονωθεί από περιπτώσεις οξείας νόσου, από κρότνες και από οικιακά ζώα (αγελάδες, κασίκες, πρόβατα) έχουν το πλασμίδιο QpH1 μεγέθους 36 Kb (γενωμικές ομάδες I, II, III). Το πλασμίδιο αυτό συχνά φέρει γονίδια τα οποία επιτρέπουν στους μικροοργανισμούς να επιβιώνουν στο κύτταρο ξενιστή. Έχει βρεθεί ότι το πλασμίδιο κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη, η οποία καθιστά το κυτταρικό περιβάλλον ανθεκτικό στα υδρολυτικά ένζυμα των φαγολυσοσωμάτων. Άλλες μελέτες έχουν δείξει ότι το πλασμίδιο παρέχει κάποιες μεταβολικές λειτουργίες με τις οποίες ο μικροοργανισμός αξιοποιεί τα μοναδικά υποστρώματα που υπάρχουν στο περιβάλλον των φαγολυσοσωμάτων (145, 147).

Πλασμίδιο QpRS. Ο πλασμιδιακός τύπος QpRS, βρέθηκε σε στελέχη *C. burnetii* που απομονώθηκαν από περιπτώσεις ενδοκαρδίτιδας (στελέχη γενωμικής ομάδας IV) και από εκτρωτικό υλικό κασίκας. Επίσης, πλασμιδιακές αλληλουχίες QpRS ενσωματωμένες στο χρωμόσωμα της *C. burnetii* βρέθηκαν σε στελέχη που απομονώθηκαν από περιπτώσεις χρόνιας ενδοκαρδίτιδας (στελέχη γενωμικής ομάδας V). Το πλασμίδιο QpRS είναι μεγαλύτερο σε μέγεθος από το QpH1 κατά 2 με 3 Kb και περιέχει αλληλουχίες DNA που δεν υπάρχουν στο QpH1 (100, 101, 102, 148).

Πλασμίδιο QpDG. Το πλασμίδιο QpDG, μεγέθους 51Kb, δεν έχει ακόμα βρεθεί σε απομονωθέντα στελέχη *C. burnetii* από άνθρωπο. Έχει απομονωθεί από στελέχη *C. burnetii* προερχόμενα από έμβρυα τρωκτικών κοντά στο Dugway, στη Utah. Σήμερα τα στελέχη αυτά θεωρούνται ως μολυσματικά αλλά χωρίς λοιμογόνο δύναμη (157).

Πλασμίδιο QpDV. Το πλασμίδιο QpDV, βρέθηκε σε απομονώσεις *C. burnetii* στη Ρωσία. Έχει μέγεθος 33Kb και παρουσιάζει ομολογία με το πλασμίδιο QpRS (177).

Πρόσφατα, ένα άλλο πλασμίδιο, μεγέθους 56Kb απομονώθηκε από ένα στέλεχος *C. burnetii*, προερχόμενο από ασθενή με χρόνια πυρετό Q, στην Κίνα (177).

Παρόλο που το πλασμιδιακό DNA στα απομονωθέντα στελέχη *C. burnetii* είναι συντηρημένο κατά το 90%, σε κάθε

πλασμιδιακό τύπο παρατηρούνται αλληλουχίες οι οποίες είναι μοναδικές.

4. ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ

Στον πυρετό Q, οι ανοσοσφαιρίνες τύπου IgM είναι οι πρώτες που εμφανίζονται και συνήθως ανιχνεύονται για λίγες εβδομάδες ή μερικούς μήνες, ενώ οι ανοσοσφαιρίνες τύπου IgG εμφανίζονται αργότερα και μπορεί να είναι ανιχνεύσιμες για έτη ή για όλη την διάρκεια της ζωής.

Τα ειδικά αντισώματα τύπου IgM έναντι της φάσης I, εμφανίζονται κατά την διάρκεια της αποδρομής της οξείας νόσου μαζί με τα αντισώματα IgG, IgA έναντι της φάσης II. Το στάδιο της νόσου μπορεί να καθοριστεί από την αναλογία αντισωμάτων της Φάσης I σε σχέση με την Φάση II. Αν η σχέση των αντισωμάτων της Φάσης II ως προς αυτά της Φάσης I είναι >1 , τότε πρόκειται για οξεία λοίμωξη, αν είναι $>/$ πρόκειται για υποξεία (συνήθως με ηπατίτιδα) και αν είναι <1 πρόκειται για χρόνια λοίμωξη (1, 63, 76, 78, 141).

ΜΕΤΑΔΟΣΗ ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ

Η *C. burnetii* προκαλεί τον πυρετό Q, μια ζωνόσο με παγκόσμια εξάπλωση. Ομάδες υψηλού κινδύνου είναι κυρίως οι γεωργοί, οι κτηνοτρόφοι, οι κτηνίατροι, οι ερευνητές καθώς και το προσωπικό των εργαστηρίων.

Προσβολή δια μέσου του γαστρεντερικού σωλήνα

Η μετάδοση της νόσου δια μέσου του γαστρεντερικού σωλήνα, με την κατανάλωση μολυσμένου γάλακτος ή προϊόντων γάλακτος, είναι πιο σπάνια εξαιτίας της παστερίωσης των γαλακτομικών προϊόντων (1, 93, 141).

Προσβολή δια μέσου της αναπνευστικής οδού

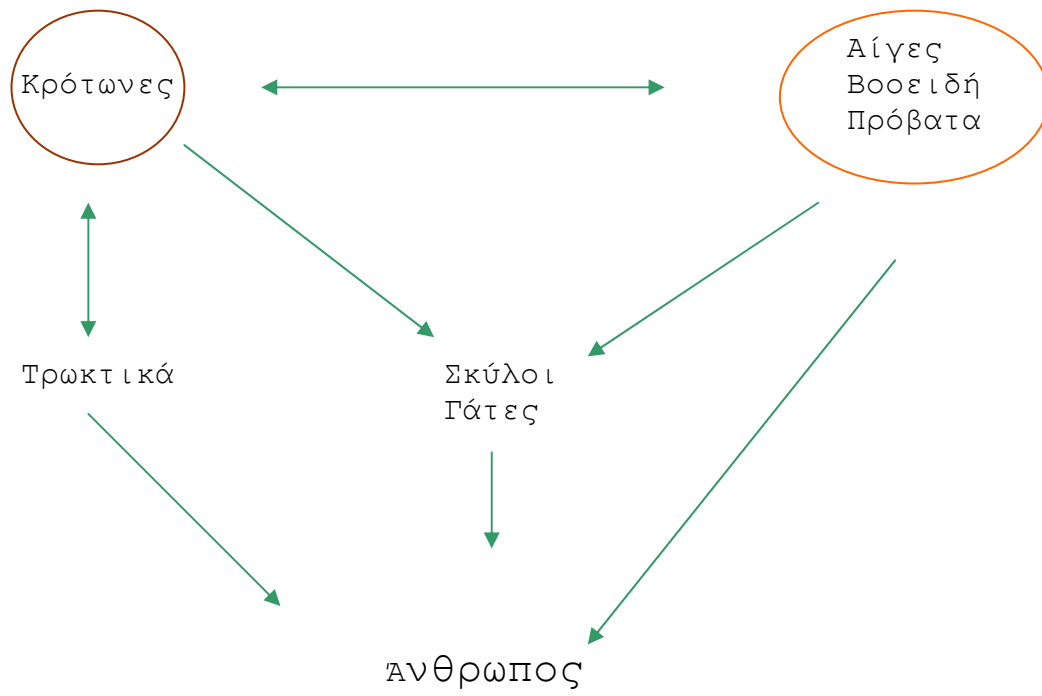
Ο συχνότερος τρόπος μετάδοσης της *C. burnetii*, είναι η εισπνοή μολυσμένων σταγονιδίων (aerosols).

Η *C. burnetii* βρίσκεται στον πλακούντα, στο αμνιακό υγρό, στα ούρα και τα κόπρανα των μολυσμένων ζώων. Κατά τη διάρκεια του τοκετού και με τα απορρίμματα τους ο μικροοργανισμός αποβάλλεται στο έδαφος. Η *C. burnetii* αντέχει στην αποξήρανση και μπορεί να παραμείνει ζωντανή για αρκετά χρόνια στο έδαφος που μολύνθηκε. Η μολυσματική σκόνη μπορεί να μεταφερθεί και να μολύνει ανθρώπους και ζώα (1, 18, 20, 84, 93, 126, 139, 141, 168, 187).

Μετάδοση της νόσου από άνθρωπο σε άνθρωπο

Έχει αναφερθεί η μετάδοση *C. burnetii* από άνθρωπο σε άνθρωπο, αλλά θεωρείται σπάνιος. Κίνδυνος μετάδοσης *C. burnetii* από άνθρωπο υπάρχει κατά τον τοκετό μολυσμένης γυναίκας, από τη συμμετοχή σε νεκροψία μολυσμένων πτωμάτων ή από τη μετάγγιση μολυσμένου αίματος. Ο κίνδυνος αυτός αυξάνεται στις περιπτώσεις που ο πυρετός Q δεν έχει κλινικά διαγνωστεί. Πρόσφατα το βακτήριο ανιχνεύτηκε επίσης κολλημένο και στα σπερματοζώαρια, γεγονός που συνηγορεί υπέρ της σεξουαλικής μετάδοσης της νόσου (1, 136, 141).

Σχήμα 6. Σχηματική αλυσίδα λοίμωξης του ανθρώπου από *C. burnetii*.



ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΘΗΛΑΣΤΙΚΩΝ

Στα ζώα, η μόλυνση γίνεται μέσω του κρότωνα ή μετά από επαφή με κόπρανα κρότωνα που είναι μολυσμένα. Στις περισσότερες χώρες, τα οικιακά ζώα (βοοειδή και αιγοπρόβατα) αποτελούν τις πρωταρχικές πηγές μετάδοσης του πυρετού Q (93, 141).

Η *C. burnetii* πολλαπλασιάζεται με γρήγορους ρυθμούς στον πλακούντα και το αμνιακό υγρό των ζώων και κατά τη διάρκεια του τοκετού μολύνει το έδαφος. Στη συνέχεια, η μολυσματική σκόνη μπορεί να μεταφερθεί και να μολύνει ανθρώπους και ζώα. Αδέσποτα σκυλιά και γάτες μπορεί να μολυνθούν από κρότωνα ή από βρώση μολυσμένου πλακουντικού υλικού. Ο μικροοργανισμός περνά από τον πεπτικό τους σωλήνα και με τα περιττώματα μολύνεται το έδαφος, με αποτέλεσμα να συντηρείται ένας κύκλος ανεξάρτητος από τους κρότωνα, με μεγαλύτερη επίπτωση της νόσου την εποχή της γέννας των ζώων. Η *C. burnetii* ανευρίσκεται επίσης στο γάλα, σε τίτλους μεγαλύτερους από $10^5/\text{ml}$ (93, 141).

Άλλος τρόπος μόλυνσης στα ζώα, είναι η σεξουαλική μετάδοση της νόσου, η οποία έχει επιβεβαιωθεί σε ποντίκια (141).

Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΑΡΘΡΟΠΟΔΩΝ

Κρότωνα

Οι κρότωνα εμπλέκονται στον κύκλο σαν μεταβιβαστές αλλά και σαν ξενιστές της *C. burnetii*. Σχεδόν κάθε φυσική εστία μετάδοσης του πυρετού Q συσχετίζεται με τους κρότωνα, μέσω των οποίων εξασφαλίζεται η κυκλοφορία του παθογόνου παράγοντα στη φύση. Η *C. burnetii* προσβάλλει πάνω από 40 είδη (12 γένη) κροτώνων. Τα αποξηραμένα εκκρίματα τους περιέχουν μεγάλο αριθμό λοιμογόνων και πολύ ανθεκτικών βακτηρίων. Έχει αναφερθεί πειραματική μόλυνση άλλων αρθροπόδων, όπως οι ψύλλοι, οι ψείρες και οι κατσαρίδες. Ο ρόλος τους όμως στη διατήρηση του πυρετού Q στη φύση δεν έχει αποδειχτεί (1, 93, 141).

Στην κεντρική Ευρώπη και Βοημία εμπλέκονται, οι κρότωνα *Ixodes ricinus*, στη Σλοβακία και Γερμανία, οι κρότωνα *Dermacentor marginatus*, στην Νότια Ευρώπη και Βουλγαρία, τα είδη *Hyalomma plumbeum*, *Rhipicephalus bursa*, στην Τουρκία ο *Ornithodoros lahorensis* και τέλος στην Ασία πολλά είδη κροτώνων όπως για παράδειγμα ο *Dermacentor nuttalli* και ο *Argas persicuw* (141).

Η μόλυνση των κροτώνων από *C. burnetii* έχει σχέση με τις βιολογικές ιδιομορφίες των κροτώνων, την οικολογία τους και τη σχέση τους με τα ζώα-ξενιστές.

Οι κρότωνες συμβάλλουν στη διατήρηση του πυρετού Q στη φύση:

- μεταδίδοντας την *C. burnetii* μεταξύ των οικιακών και άγριων ζώων και αντίστροφα,
- διατηρώντας και συντηρώντας το μικροοργανισμό διαμέσου της διαωθηκτικής μετάδοσης (π.χ. αυγό, προνύμφη, νύμφη, κρότωνας) και
- διασπέρνοντας τον μικροοργανισμό μέσω των κοπράνων τους (93, 141).

Ο βαθμός μόλυνσης των κροτώνων εξαρτάται από:

- 1) το βαθμό ρικετσιαιμίας στο αίμα του ξενιστή και
- 2) τον όγκο του αίματος που αντλήθηκε κατά τη χρονική διάρκεια του παρασιτικού γεύματος (141).

Από τη στιγμή που ένας κρότωνας μολύνεται, φαίνεται ότι διατηρεί το μικροοργανισμό δια βίου (141). Τα βακτήρια διαπερνούν τον πεπτικό σωλήνα και προσβάλλουν τα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου. Σ'αυτά τα κύτταρα πολλαπλασιάζονται με έντονο ρυθμό κατά τις επόμενες ημέρες χωρίς να προκαλέσουν σημαντική βλάβη στα κύτταρα. Ο πολλαπλασιασμός γίνεται στα επιθηλιακά κύτταρα του μέσου εντέρου κυρίως, τα οποία εξαιτίας του έντονου ρυθμού πολλαπλασιασμού, διογκώνονται με αποτέλεσμα τη ρήξη τους. Το περιεχόμενο τους διασκορπίζεται στον αυλό του εντέρου και περνά στην αιμόλεμφο. Στη φάση αυτή είναι δυνατό να βρούμε μεμονωμένα βακτήρια στον αυλό του εντέρου, τα οποία προέρχονται είτε από το αρχικό γεύμα αίματος είτε από τη φυσιολογική διεργασία της διάσπασης των μολυσμένων επιθηλιακών κυττάρων. Μερικά βακτήρια μετά τη μόλυνση διαπερνούν το τοίχωμα του εντέρου, εισβάλλουν στα αιμοκύτταρα και προσβάλλουν σταδιακά άλλα κύτταρα και ιστούς μέχρι που να προσβάλλουν όλα σχεδόν τα εσωτερικά όργανα (141).

Ο χρόνος της παραμονής των βακτηρίων στους κρότωνες εξαρτάται από το είδος του κρότωνα και από τον τρόπο της μόλυνσης. Συνήθως κυμαίνεται από λίγους μήνες έως λίγα χρόνια. Στον *O. parillipes* φτάνει στα 6-10 χρόνια (141).

Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΚΡΟΤΩΝΑ ΣΤΗ ΜΕΤΑΔΟΣΗ

Διαωοθηκική. Η *C. burnetii* μεταδίδεται από τα θηλυκά άτομα του κρότωνα διαμέσου των αυγών τους στις επόμενες θυγατρικές γενιές. Η ικανότητα διαωοθηκικής μετάδοσης ποικίλει ανάλογα με το είδος του κρότωνα. Η μόλυνση μεταφέρεται από τις προνύμφες στις νύμφες, από τις νύμφες στα ενήλικα άτομα κλπ. Ο τύπος μετάδοσης μεταξύ των διαφόρων σταδίων ανάπτυξης εξαρτάται από ποιο στάδιο του κρότωνα πρωτομολύνεται. Όταν η μόλυνση γίνεται στο στάδιο της προνύμφης, σε μερικά είδη κροτώνων η μετάδοση φτάνει μόνο μέχρι τις νύμφες (*Ixodes persulcatus*) (141). Πιο αποτελεσματική μετάδοση είναι όταν η μόλυνση γίνεται στα τελικά στάδια του κύκλου του κρότωνα στα οποία η ποσότητα του μολυσμένου αίματος που προσλαμβάνεται είναι και η μεγαλύτερη.

Αδιευκρίνιστη παραμένει η σεξουαλική μετάδοση της *C. burnetii* στους κρότωνα. Η *C. burnetii* δεν έχει ανιχνευτεί στο αρσενικό γεννητικό σύστημα των κροτώνων (141).

Κόπρανα κρότωνα. Μέσα στον κρότωνα η *C. burnetii* πολλαπλασιάζεται σε πολύ υψηλούς τίτλους. Οι μολυσμένοι κρότωνα αποβάλλουν άφθονες *C. burnetii* με τα κόπρανα τους. Περισσότερη από 10^{10} μικροοργανισμοί ανιχνεύονται στα κόπρανα, πειραματικά μολυσμένων κροτώνων.

Με το τσίμπημα. Έχει αποδειχθεί ότι η μετάδοση της *C. burnetii* από τους κρότωνα στα ζώα-ξενιστές γίνεται με το τσίμπημα. Αυτό εξηγεί τις μεγάλες συγκεντρώσεις βακτηρίων που υπάρχουν στους σιελογόνους αδένες του κρότωνα. Μόνο τρεις δημοσιεύσεις, κατά τα έτη 1941-49, δείχνουν πιθανή μετάδοση της *C. burnetii* στον άνθρωπο από μόλυνση του μέσω του τσιμπήματος κρότωνα (93, 141). Ωστόσο, είναι αδύνατο να εξακριβωθεί εάν η μετάδοση έγινε όντως από το τσίμπημα του κρότωνα, καθώς οι λοιμώξεις αυτές από *C. burnetii* εμφανίστηκαν σε ένα μολυσμένο από *C. burnetii* περιβάλλον (πιθανή οδός μόλυνσης και η αναπνευστική). Επίσης δεν είναι εύκολο να εξακριβωθεί εάν η μετάδοση έγινε από τα κόπρανα του κρότωνα ή από τη σύνθλιψη του σώματος του κρότωνα πάνω στο δέρμα, γεγονός που θα μπορούσε να μολύνει τον οργανισμό μέσω αμυχών στο δέρμα ή μέσω του επιπεφυκότα (141).

Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΚΡΟΤΩΝΑ ΣΤΗ ΛΟΙΜΟΓΟΝΟ ΔΥΝΑΜΗ ΤΗΣ *C. burnetii*

Η *C. burnetii* που μεταφέρεται από τα πρόβατα στα βοοειδή ή από βοοειδή σε βοοειδή χωρίς τη διαμεσολάβηση των κροτώνων, πιθανόν χάνει τη λοιμογόνο δύναμη της και τελικά γίνεται ανίκανη να προκαλέσει λοίμωξη (1, 93, 141). Αυτή η υπόθεση θα μπορούσε να εξηγήσει την πειραματική μόλυνση και παραμονή της *C. burnetii* στα ινδικά χοιρίδια. Αυτά τα ζώα απαντούν στην πρωτοπαθή μόλυνση με το μικροβιακό αυτό παράγοντα, με πυρετό, απώλεια βάρους και σπληνομεγαλία. Τα συμπτώματα αυτά επιμένουν για 2-3 περάσματα και έπειτα ελαττώνονται αντιστοίχως με τα περαιτέρω περάσματα, μέχρι που εξαφανίζονται εντελώς (141).

ΠΥΡΕΤΟΣ Q

ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ

Ο επιπολασμός της μόλυνσης από *C. burnetii* στον άνθρωπο είναι κατά μεγάλο μέρος άγνωστος εξαιτίας του γεγονότος ότι η κλινική εικόνα παρουσιάζει ποικιλομορφία και η διάγνωση βασίζεται αποκλειστικά σε ορολογικές δοκιμασίες.

Οι κλινικές εκδηλώσεις της νόσου, διαφέρουν στα διάφορα μέρη του κόσμου με αποτέλεσμα αλλού να είναι επικρατέστερη η ηπατίτιδα (46), σε άλλη περιοχή ο πυρετός αγνώστου αιτιολογίας (168) και αλλού η πνευμονία (47, 168). Το γεγονός αυτό μπορεί να οφείλεται:

- *στη διαφορετική οδό της μόλυνσης
- *στην ποσότητα του μικροοργανισμού που ενέχεται στη λοίμωξη
- *στην πλασμιδιακή διαφορά των στελεχών
- *στο αμυντικό σύστημα του ξενιστή.

Ο Babudieri (9) έδωσε μία κλινική ταξινόμηση του πυρετού Q στον άνθρωπο, η οποία περιλαμβάνει 4 κατηγορίες:

- 1) ανενεργή, ασυμπτωματική μορφή,
- 2) αμιγής εμπύρετη μορφή
- 3) μορφή με πνευμονικές εντοπίσεις και
- 4) μορφή με εξωπνευμονική συμμετοχή (ηπατίτιδα και ενδοκαρδίτιδα).

Ο Raoult (126, 135, 137, 141) προτείνει την ταξινόμηση της νόσου σε δύο κύριες μορφές: την οξεία και τη χρόνια.

Τα τελευταία χρόνια αναπτύχθηκαν δύο μείζονες θεωρίες για την εξήγηση του ευρέου φάσματος των κλινικών εκδηλώσεων της νόσου που παρατηρούνται στους ανθρώπους με πυρετό Q. Η **πρώτη θεωρία** προτείνει ότι τόσο η οξεία, όσο και η χρόνια μορφή, προκαλούνται από τον ίδιο μικροοργανισμό και ότι η χρόνια μορφή είναι το αποτέλεσμα περισσότερο μιας ανοσολογικής καταστολής του ξενιστή παρά κάποιας ειδικής ιδιότητας του παθογόνου μικροοργανισμού (134). Η **δεύτερη θεωρία** προτείνει ότι υπάρχει γενετική ετερογένεια μεταξύ των απομονωθέντων στελεχών *C. burnetii*. Σύμφωνα μ'αυτή τη θεωρία, οι μικροοργανισμοί που προκαλούν χρόνιο πυρετό Q θα πρέπει να διαφέρουν γενετικά από εκείνους που προκαλούν οξεία νόσο (141).

A) Οξεία Λοίμωξη.

Το φάσμα των εκδηλώσεων της οξείας νόσου είναι μεγάλο και η συμπτωματολογία μπορεί να διαφέρει από άτομο σε άτομο. Η περίοδος επώασης του πυρετού Q κυμαίνεται από 14 έως 39 ημέρες (1, 137, 141).

Η κλινική εικόνα με την οποία εμφανίζεται η λοίμωξη από *C. burnetii* είναι: το οξύ εμπύρετο επεισόδιο, η πνευμονία, η ηπατίτιδα και η μηνιγγοεγκεφαλίτιδα (1, 43, 46, 47, 49, 168). Συνηθέστερα ο πυρετός Q εκδηλώνεται με κεφαλαλγία, πυρετό άνω των 38,5⁰ C, με ρίγη, αδυναμία, μυαλγίες και ανορεξία. Άλλα συνοδά συμπτώματα είναι: θωρακικό άλγος, βήχας, αρθραλγίες και διάρροια. Μερικές φορές μπορεί να παρατηρηθεί πνευματική σύγχυση.

Κλινικά ευρήματα του πυρετού Q είναι η βραδυκαρδία, η ηπατομεγαλία και η σπληνομεγαλία που συνήθως δεν συνυπάρχουν στον ίδιο ασθενή. Σε αντίθεση με τις άλλες ρικετσιακές λοιμώξεις, στον πυρετό Q σχεδόν ποτέ δεν εμφανίζεται εξάνθημα.

Οι περισσότερες περιπτώσεις πυρετού Q είναι αυτοιάσιμες, με υποχώρηση των συμπτωμάτων σε 1 με 2 εβδομάδες (135). Μέσα στα πλαίσια της αρχικής εικόνας, σπανίως εμφανίζονται επιπλοκές όπως η εγκεφαλίτιδα, η περικαρδίτιδα, η μυοκαρδίτιδα και η αιμολυτική αναιμία.

Πίνακας 3. Κλινικές εκδηλώσεις οξείας λοίμωξης πυρετού Q:

- ψευδογριππώδης συνδρομή
- αυτοιάσιμο εμπύρετο
- πνευμονία
- ηπατίτιδα
- λοίμωξη ΚΝΣ
- περικαρδίτιδα
- μυοκαρδίτιδα

B) Χρόνια Λοίμωξη

Ένας μικρός αριθμός ασθενών, πιθανότατα λιγότερος του 1% επί του συνόλου των ασθενών με λοίμωξη από *C. burnetii*, δεν αποβάλλουν εντελώς το μικροοργανισμό και εκδηλώνουν χρόνια νόσο. Η χρόνια νόσος ακολουθεί μία αρχική οξεία εκδήλωση της μόλυνσης ή εκδηλώνεται αμέσως μετά από την έκθεση του ασθενή στο μικρόβιο. Στον άνθρωπο, έχουν αναφερθεί περιπτώσεις χρόνιου πυρετού Q σε ασθενείς με ιστορικό βαλβιδοπάθειας της καρδιάς και σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς όπως πάσχοντες από λευχαιμία, καρκίνο και AIDS (1, 135, 137, 141).

Η ενδοκαρδίτιδα αποτελεί μία σπάνια αλλά βαριά και συχνά μοιραία επιπλοκή του πυρετού Q (8, 15, 18, 51, 64, 81, 117, 142, 172, 179, 191). Μπορεί να εμφανιστεί μήνες ή χρόνια μετά την αρχική οξεία λοίμωξη. Οι βλάβες της ενδοκαρδίτιδας του πυρετού Q λαμβάνουν χώρα στην αορτική και στην μητροειδή βαλβίδα, αλλά και στις προσθετικές βαλβίδες. Σε περιπτώσεις ενδοκαρδίτιδας, η *C. burnetii* έχει απομονωθεί σε υψηλές συγκεντρώσεις από τις προσβεβλημένες βαλβίδες, ενώ σε χαμηλές συγκεντρώσεις από το σπλήνα, τους πνεύμονες, το μυελό των οστών και από τους νεφρούς (1).

Η ενδοκαρδίτιδα από πυρετό Q παρουσιάζει μεγάλη δυσκολία στη διάγνωση, κυρίως γιατί οι αιμοκαλλιέργειες βγαίνουν αρνητικές και απουσιάζουν η αιματοουρία και λευκοκυττάρωση, που αποτελούν συχνά γνωρίσματα της κοινής βακτηριακής ενδοκαρδίτιδας (141).

Ενώ η οξεία λοίμωξη σπάνια είναι θανατηφόρα, η χρόνια λοίμωξη, που αντιπροσωπεύεται κυρίως από την ενδοκαρδίτιδα του χρόνιου πυρετού Q, είναι βαρεία κατάσταση και συχνά έχει μοιραία κατάληξη ιδιαίτερα όταν δεν εφαρμοστεί έγκαιρα η κατάλληλη θεραπευτική αγωγή. Η πρόγνωση του χρόνιου πυρετού Q είναι φτωχή. Τα ποσοστά θνητότητας φτάνουν το 37% για την ενδοκαρδίτιδα του πυρετού Q (141).

Εκτός από την ενδοκαρδίτιδα, η οποία αποτελεί την πιο συχνή μορφή του χρόνιου πυρετού Q, έχουν περιγραφεί και λοιμώξεις των αγγείων και των οστών αλλά και χρόνια ηπατίτιδα. Επίσης έχει αναφερθεί η απομόνωση *C. burnetii* από τον πλακούντα γυναικών που είχαν εμφανίσει πυρετό Q αρκετά χρόνια νωρίτερα (141).

Πίνακας 4. Κλινικές εκδηλώσεις πυρετού Q χρόνιας λοίμωξης:

- ενδοκαρδίτιδα
- οστεομυελίτιδα
- χρόνια ηπατίτιδα
- Λοιμώξεις σε αγγειακές προθέσεις

Γ). Πυρετός Q στα παιδιά.

Η νόσος είναι σπάνια στα παιδιά. *C. burnetii* έχει απομονωθεί από τον πλακούντα και το γάλα γυναικών που εμφάνισαν πυρετό Q 3 χρόνια έως 2 μήνες πριν από τον τοκετό. Οι κλινικές εκδηλώσεις του πυρετού Q στα παιδιά περιλαμβάνουν πνευμονία, πυρετό άγνωστης αιτιολογίας, κακουχία και μηνιγγικό ερεθισμό. Έχουν περιγραφεί περιπτώσεις εγκεφαλίτιδας, καθώς και ενδοκαρδίτιδας σε παιδιά με συγγενή διγλώχινια αορτική βαλβίδα (141).

Δ). Πυρετός Q στα ζώα

Πειραματόζωα

Στα μολυσμένα (ποντίκια, ινδικά χοιρίδια και χάμστερ), ο μικροοργανισμός πολλαπλασιάζεται ταχύτατα, ιδιαίτερα στο ήπαρ και στο σπλήνα, αλλά τα ζώα δεν πεθαίνουν από τη μόλυνση, εκτός αν λάβουν μία μεγάλη δόση μικροοργανισμού. Στα ζώα αυτά έχει περιγραφεί ηπατομεγαλία και σπληνομεγαλία (141).

Οικιακά ζώα

Η μόλυνση από *C. burnetii* είναι ασυμπτωματική. Δεν επηρεάζει την ανάπτυξη των ζώων ή την παραγωγή γάλακτος. Η *C. burnetii* συνήθως εγκαθίσταται στον πλακούντα των μηρυκαστικών ζώων καθώς και στους αδένες των μαστών και για μεγάλες περιόδους εκκρίνεται στο γάλα και μάλιστα σε υψηλές συγκεντρώσεις. Επίσης σε υψηλές συγκεντρώσεις βρίσκεται στον πλακούντα και στα υγρά που αποβάλλονται κατά τον τοκετό. Συχνά η μόλυνση στα ζώα συνοδεύεται από αυτόματες εκτρώσεις ή προβλήματα στειρότητας (141).

ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΤΟΥ ΠΥΡΕΤΟΥ Q

A) Γεωγραφική κατανομή του πυρετού Q

Υπάρχουν αναφορές της νόσου από ολόκληρο τον κόσμο (93, 141).

Ευρώπη

Η Ευρώπη μπορεί να χωριστεί σε τρεις ζώνες:

I) Ενδημική ζώνη του πυρετού Q. Περιλαμβάνονται η Πορτογαλία, η Ισπανία, οι νότιες περιοχές της Γαλλίας, η Ιταλία, μερικές περιοχές της Ελβετίας, η Γερμανία, η Σλοβακία και η Μεγάλη Βρετανία, καθώς επίσης και όλες οι βαλκανικές χώρες. Η κύρια πηγή μόλυνσης είναι τα οικιακά ζώα, π.χ. βόδια στην κεντρική Ευρώπη και στα νότια κυρίως πρόβατα και αίγες. Οι αγρότες στις περιοχές αυτές ανοσοποιούνται στην παιδική τους ηλικία μετά από επαφή με *C. burnetii* από μολυσμένα ζώα και τα απορρίμματα τους (141).

II) Μη ενδημική ζώνη. Αντιπροσωπεύεται από τις περιοχές με σποραδικά περιστατικά πυρετού Q σε ανθρώπους και ζώα. Αυτή η ζώνη περιλαμβάνει την κεντρική και βόρεια Γαλλία, μερικές περιοχές από την Γερμανία, Τσεχοσλοβακία, Ουγγαρία, Αυστρία και πολλές περιοχές από την Αγγλία και την βόρεια Ιρλανδία. Οι οικολογικές συνθήκες, δηλαδή η θερμοκρασία και κυρίως το είδος των ξενιστών ζώων περιορίζουν την κυκλοφορία και εξάπλωση της *C. burnetii* στη φύση (141).

III) Βόρεια Ευρώπη, και ορεινές περιοχές της Ευρώπης με υψόμετρο άνω των 1000m. Σ' αυτή τη ζώνη οι οικολογικές συνθήκες δεν επιτρέπουν τη μόνιμη διατήρηση της *C. burnetii* στη φύση. Αυτή η ζώνη καλύπτει τη Γερμανία, Πολωνία, τη βόρεια Σοβιετική Ένωση, Σκανδιναβικές χώρες όπως επίσης και ορεινές περιοχές της Ευρώπης (141).

Η νόσος έχει αναφερθεί σε όλες σχεδόν τις ευρωπαϊκές χώρες. Υπάρχουν αναφορές από Αυστρία, Βέλγιο, Βουλγαρία, Κύπρο, Τσεχοσλοβακία, Γερμανία, Φιλανδία, Γαλλία, Μεγάλη Βρετανία, Ελλάδα, Ουγγαρία, Ιταλία, Πολωνία, Πορτογαλία, Ιρλανδία, Ρουμανία, Ισπανία, Ελβετία, Τουρκία, Γιουγκοσλαβία και Σουηδία (93, 141).

Ασία

Ο πυρετός Q είναι ενδημικός στη κεντρική, δυτική και νότια Ασία. Η πλειοψηφία των ντόπιων κατοίκων έρχεται συχνά σε επαφή με πρόβατα, αίγες, βόδια και καμήλες ή με προϊόντα από αυτά τα ζώα. Οι περισσότερες αναφορές της νόσου προέρχονται από τη Κίνα, την Ινδία, Ιράν, Ιράκ, Ισραήλ, Ιαπωνία και Σαουδική Αραβία (141).

Αμερική.

Στον Καναδά, υπάρχει μεγάλη επίπτωση της νόσου, σε άτομα κυρίως που ασχολούνται με την κτηνοτροφία, σε εργάτες σφαγείων και σε κτηνιάτρους από ότι στο γενικό πληθυσμό. Στη κεντρική Αμερική φαίνεται από ορολογικές μελέτες ότι η νόσος είναι ενδημική στη Γουατεμάλα, Ονδούρα, Νικαράγουα και στον Παναμά. Στη νότια Αμερική η νόσος είναι ενδημική στη Βραζιλία, Κολομβία και Ουρουγουάη (141).

Αφρική.

Η νόσος είναι ενδημική κυρίως στην Βόρειο-Ανατολική, Δυτική και Κεντρική Αφρική. Αποτελέσματα ορολογικών μελετών στη διώρυγα του Σουέζ, στην κοιλάδα και στο δέλτα του Νείλου, στην Αίγυπτο, στο Σουδάν, στη Σομαλία και στη Νιγηρία έδειξαν ότι η κύρια δεξαμενή της νόσου είναι τα κατοικίδια ζώα (141).

Ωκεανία

Η πρώτη περιγραφή της νόσου χρονολογείται το 1935 στην Αυστραλία από τον Derrick. Από τότε διάφορες μελέτες αναφέρουν ορολογικά στοιχεία και κλινικές εκδηλώσεις του πυρετού Q (141).

Β) Εποχιακή κατανομή

Ως προς την εποχιακή κατανομή, τα περισσότερα κρούσματα εμφανίζονται κατά τους μήνες Μάρτιο-Απρίλιο και Μάιο, ελάχιστα δε τον Ιανουάριο και τον Ιούνιο. Η αυξημένη συχνότητα κρουσμάτων συμπίπτει με την περίοδο του τοκετού των διχήλων ζώων. Παρ'όλα αυτά μικροεπιδημίες αναφέρονται και κατά τους φθινοπωρινούς μήνες.

ΔΙΑΓΝΩΣΗ

1. ΕΜΜΕΣΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ

Ορολογική Διάγνωση

Η έμμεση διάγνωση πυρετού Q βασίζεται στην αναζήτηση ειδικών αντισωμάτων έναντι της *C. burnetii* σε δείγματα ορού ασθενών, των οποίων ο τίτλος αυξάνεται καθώς η νόσος προχωρεί (1, 35, 141, 183). Σημαντικός παράμετρος στην επιτυχία της ορολογικής διάγνωσης είναι η ποσότητα και η ποιότητα των χρησιμοποιούμενων αντιγόνων.

Αμέσως μετά την έναρξη της νόσου, θα πρέπει να λαμβάνεται ένα δείγμα αίματος και στη συνέχεια, δύο διαδοχικά δείγματα κατά τη διάρκεια της δεύτερης και τέταρτης εβδομάδας της νόσου.

Για την ορολογική διάγνωση, έχουν χρησιμοποιηθεί οι παρακάτω τεχνικές:

- **καθήλωση του συμπληρώματος (CF)**
- ο **έμμεσος ανοσοφθορισμός (IFA)** καθώς και
- ο **ενζυματικός ανοσοπροσροφητικός προσδιορισμός (ELISA)**.

Όλες οι τεχνικές που έχουν χρησιμοποιηθεί στην ορολογική διάγνωση του πυρετού Q εμφανίζουν πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα, η γνώση των οποίων είναι σημαντικό στοιχείο στην αξιολόγηση και την ερμηνεία των αποτελεσμάτων (1, 35). Από αυτές τις μεθόδους η διαδικασία του CF είναι πολύ ειδική αλλά έχει χαμηλή ευαισθησία ενώ η ELISA μπορεί να χρησιμοποιηθεί πιο εύκολα σε μεγάλη κλίμακα. Η IFA είναι μέθοδος επιλογής στη διάγνωση του πυρετού Q, αφού είναι ευαίσθητη, εμφανίζει μεγάλη ειδικότητα και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση των διαφορετικών τάξεων των ανοσφαιρινών IgG, IgM και IgA.

Οι παραπάνω ορολογικές δοκιμασίες είναι αρκετές στην καθημερινή κλινική πράξη, αλλά προκειμένου να αξιολογήσουμε θεραπεία του χρόνιου πυρετού Q, είναι χρήσιμη η απομόνωση του μικροοργανισμού ή η ανίχνευση του DNA του.

2. ΑΜΕΣΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ

Απομόνωση

Για την άμεση εργαστηριακή διάγνωση της *C. burnetii* χρησιμοποιούνται δείγματα ιστού που λαμβάνονται κάτω από στείρες συνθήκες κατά την αυτοψία, ή δείγματα αίματος από ασθενείς με πυρετό Q (1, 141).

Η διαδικασία απομόνωσης της *C. burnetii* είναι επικίνδυνη, δύσκολη, χρονοβόρα και απαιτεί εξειδικευμένα εργαστήρια (1). Ο μικροοργανισμός μπορεί να απομονωθεί από αίμα ή υλικό βιοψίας με τις παρακάτω μεθόδους:

- A.** Ενοφθαλμισμό σε εμβρυοφόρα αυγά όρνιθας
- B.** Ενοφθαλμισμό σε πειραματόζωα
- Γ.** Κυτταροκαλλιέργεια.

Η μεταφορά των παθολογικών υλικών πρέπει να είναι ταχεία και η λήψη τους καλύτερα να γίνεται πριν από την χορήγηση αντιβιοτικών. Τα δείγματα πρέπει να λαμβάνονται κάτω από στείρες συνθήκες.

Τεχνική των shell-vials

Η τεχνική αυτή αποτέλεσε ένα σημαντικό βήμα στην απομόνωση της *C. burnetii* (130). Συνίσταται σε φυγοκέντρηση του ενοφθαλμίσματος πάνω σε μια στοιβάδα κυττάρων. Η κυτταρική σειρά βρίσκεται πάνω σε ένα υάλινο δίσκο, μέσα σε σωλήνα φυγοκέντρησης τύπου shell-vial. Η αυξημένη ευαισθησία της μεθόδου οφείλεται στην φυγοκέντρηση που ευνοεί την είσοδο του μικροοργανισμού στα κύτταρα. Οι θετικές καλλιέργειες μετά από θρυψινοποίηση ενοφθαλμίζονται σε κυτταρικές σειρές για την μαζική παραγωγή του μικροοργανισμού. Τα απομονωθέντα στελέχη μπορούν να χρησιμοποιηθούν για περαιτέρω γενετικές μελέτες.

Ανίχνευση *C. burnetii*

Τεχνική της PCR (αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης)

Η τεχνική αυτή χρησιμεύει στην ανίχνευση της *C. burnetii* σε κυτταροκαλλιέργειες ή δείγματα ιστών (καρδιακές βαλβίδες) από ασθενείς με πυρετό Q. Είναι εργαστηριακή μέθοδος σύνθεσης νουκλειικών οξέων κατά την οποία αντιγράφεται ένα συγκεκριμένο τμήμα του DNA. Η μέθοδος περιλαμβάνει δύο ολιγονουκλεοτιδικούς εναρκτές οι οποίοι προσδένονται στα άκρα του τμήματος του DNA

που θα αντιγραφεί και από επαναλαμβανόμενους κύκλους πολλαπλασιασμού του DNA (158, 159).

Τεχνική της nested PCR

Πρόσφατα η τεχνική της **nested PCR** μπορεί να εφαρμοστεί κατευθείαν στο παθολογικό υλικό (αίμα ασθενών) κάνοντας πιο γρήγορη την ανίχνευση της *C. burnetii* (154, 188). Παρουσιάζει μεγάλη ευαισθησία και ανιχνεύει τον μικροοργανισμό και μετά την χορήγηση αντιβιοτικών. Η μέθοδος περιλαμβάνει δύο επαναλαμβανόμενα PCR (βλέπε σελ. 64).

Ταυτοποίηση της *C. burnetii* με τη χρήση της τεχνικής PCR-RFLP

Η μέθοδος PCR επιτρέπει την γρήγορη ανίχνευση και αντιγραφή ειδικών περιοχών DNA που βρίσκονται σε μικρή ποσότητα στο δείγμα.

Η επίδραση στη συνέχεια με περιοριστικά ένζυμα στα προϊόντα πολλαπλασιασμού [Restriction fragment length polymorphism (**PCR-RFLP**)] παρέχει κατατομές κλασμάτων του DNA, που συγκρινόμενες με τις αντίστοιχες των στελεχών αναφοράς συμβάλλει ουσιαστικά στην ταυτοποίηση των απομονωθέντων στελεχών *C. burnetii* (89, 90, 154, 158, 159).

ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΤΟΥ ΠΥΡΕΤΟΥ Q

Η *C. burnetii* είναι ένα αυστηρά ενδοκυττάριο Gram αρνητικό βακτήριο που ζει και πολλαπλασιάζεται στα φαγολυσοσώματα των μολυσμένων κυττάρων (pH 4,8). Για να είναι ενεργό ένα αντιβιοτικό θα πρέπει να έχει την δυνατότητα να εισέρχεται μέσα στο κύτταρο, να συγκεντρώνεται στο φαγολυσόσωμα και να μπορεί να δράσει σε pH μικρότερο ή ίσο του 5.

ΟΞΕΙΑ ΛΟΙΜΩΞΗ

Φαρμακευτική αντιμετώπιση του οξέος πυρετού Q

Ο οξύς πυρετός Q είναι μια αυτοιάσιμη νόσος (1, 5, 97, 119, 135, 141). Ο βασικός στόχος της θεραπευτικής αγωγής σ' αυτή τη περίπτωση είναι να προκαλέσει μια βακτηριοστατική δράση, προκειμένου να περιορίσει τη διάρκεια της νόσου και να εμποδίσει την μετάπτωση στη χρονιότητα.

Η αντιμετώπιση του οξέος πυρετού Q εξαρτάται από την κλινική εικόνα του ασθενή.

Τετρακυκλίνη. Φάρμακο επιλογής είναι η τετρακυκλίνη. Η τετρακυκλίνη έχει ως αποτέλεσμα την ελάττωση της διάρκειας του πυρετού κατά 50%. Ωστόσο, η θεραπεία θα πρέπει να αρχίσει μέσα σε 3 ημέρες από την έναρξη της νόσου προκειμένου να είναι αποτελεσματική (97, 124, 135).

Κινολόνες. Η οφλοξασίνη (600 mg/ημέρα) και η πεφλοξασίνη (800 mg/ημέρα) αναφέρθηκαν ως αποτελεσματικές στην πνευμονία του πυρετού Q και βρέθηκε ότι επιφέρουν απυρεξία και κλινική βελτίωση σε 2 με 4 ημέρες μετά τη χορήγησή τους. Ωστόσο, η συνολική διάρκεια της θεραπείας με οφλοξασίνη ήταν 16 ημέρες και με την πεφλοξασίνη 21 ημέρες. Ο συνδιασμός της πεφλοξασίνης (800 mg/ημέρα) με την ριφαμπίνη (1200 mg/ημέρα) βοηθάει στη θεραπεία ασθενών με παρατεταμένο πυρετό Q (72, 97, 135).

Οι κινολόνες μπορούν να περάσουν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και γι' αυτό θα πρέπει να χορηγούνται στη μηνιγγοεγκεφαλίτιδα του πυρετού Q (97, 135).

ΧΡΟΝΙΑ ΛΟΙΜΩΞΗ

Φαρμακευτική αντιμετώπιση του χρόνιου πυρετού Q.

Ο χρόνιος πυρετός Q συνιστά μια βαρεία και συχνά θανατηφόρα νόσο, στην οποία η *C. burnetii* επιβιώνει μετά από την αρχική λοίμωξη με αποτέλεσμα την υποτροπή της παρά τη χρόνια χορήγηση αντιβιοτικών (1, 33, 54, 85, 97, 132, 135, 141, 163). Η ενδοκαρδίτιδα από πυρετό Q αποτελεί την πιο βαρεία επιπλοκή της λοίμωξης από *C. burnetii* και τα ποσοστά θνητότητας ξεπερνούν το 65% (135).

Τετρακυκλίνη. Αποτελεί το κύριο στήριγμα στη θεραπεία της ενδοκαρδίτιδας του πυρετού Q. Ωστόσο, έχει απομονωθεί *C. burnetii* από βαλβίδα ασθενών μετά από 4 χρόνια θεραπείας με δοξυκυκλίνη. Ο συνδιασμός δοξυκυκλίνης-ριφαμπικίνης έχει χρησιμοποιηθεί στην ενδοκαρδίτιδα από πυρετό Q, με ικανοποιητικά αποτελέσματα (97, 124, 135).

Χλωραμφενικόλη. Ένα άλλο φάρμακο που χρησιμοποιείται στην αντιμετώπιση της χρόνιας λοίμωξης του πυρετού Q είναι η χλωραμφενικόλη. Η μεγάλη χρονική διάρκεια χορήγησης της στις χρόνιες λοιμώξεις την καθιστά απαγορευτική εξαιτίας της δυνητικής της τοξικότητας (97).

Κινολόνες. Οι φλουοροκινολόνες (προφλοξασίνη, πεφλοξασίνη, οφλοξασίνη, σπαρφλοξασίνη) επιτυγχάνουν ικανοποιητικά πειραματικά αποτελέσματα μόνες τους ή σε συνδυασμό με ριφαμπικίνη.

Η χορήγηση τους βρέθηκε ότι ελέγχει αποτελεσματικά τον χρόνιο πυρετό Q. Το ποσοστό θνητότητας αυτών των ασθενών ήταν σημαντικά χαμηλότερο, από αυτό των ασθενών που πήραν άλλα αντιβιοτικά σχήματα. Ωστόσο, έχει αναφερθεί απομόνωση *C. burnetii* από βαλβίδες που είχαν αφαιρεθεί χειρουργικά παρά τους 9 και 12 μήνες θεραπείας (72, 97, 135).

Ριφαμπικίνη. Η ριφαμπικίνη σε συνδυασμό με δοξυκυκλίνη ή κοτριμοξαζόλη χρησιμοποιήθηκε στην αντιμετώπιση της ενδοκαρδίτιδας από πυρετό Q, με καλά αποτελέσματα. Ωστόσο, στις περισσότερες περιπτώσεις, η ριφαμπικίνη διακόπτεται μετά από λίγους μήνες χορήγησης εξαιτίας των αλληλεπιδράσεων της με τα αντιπηκτικά που συχνά χορηγούνται ταυτόχρονα (15, 97, 135).

Παρόλο που τα παραπάνω αντιβιοτικά φαίνονται αποτελεσματικά στον έλεγχο της νόσου, ωστόσο δεν εξαλείφουν εντελώς το λοιμογόνο παράγοντα. Δεν είναι γνωστοί οι βέλτιστοι συνδυασμοί των αντιβιοτικών ούτε και η απαιτούμενη διάρκεια χορήγησης τους. Έχουν προταθεί παρατεταμένες θεραπείες ξεκινώντας από 12 μήνες έως απεριόριστης διάρκειας (1, 97, 135).

ΠΡΟΛΗΨΗ

Η πρόληψη του πυρετού Q βασίζεται στην αποφυγή της επαφής με μολυσμένα ζώα ή τα προϊόντα τους (141). Μέτρα όπως:

- απολύμανση των οχημάτων που χρησιμοποιούνται για τη μεταφορά των ζώων
- απομάκρυνση των μολυσμένων ζώων από το κοπάδι για αρκετές εβδομάδες μετά το τοκετό
- καταστροφή των μολυσμένων πλακούντων
- έλεγχο των βοοειδών και των αιγοπροβάτων για εκτοπαράσιτα μειώνουν τη διασπορά της *C. burnetii*.

Συνιστάται αυστηρά η κατανάλωση μόνο παστεριωμένου γάλακτος, προκειμένου να εξαλειφθούν όλες οι περιπτώσεις πυρετού Q που μεταδίδονται μ'αυτόν τον τρόπο. Εάν η παστερίωση δεν είναι εφικτή το γάλα θα πρέπει να βράζεται πριν από την κατανάλωση του.

Εμβόλια.

Έχουν παρασκευαστεί εμβόλια για τον άνθρωπο βασιζόμενα στα Ag φάσης I και II της *C. burnetii*. Ο Ormsbee και οι συνεργάτες του ανακοίνωσαν ότι ένα εμβόλιο φάσης I είναι περίπου 300 φορές πιο αποτελεσματικό από το αντίστοιχο φάσης II (116, 141, 189). Ο εμβολιασμός ενδείκνυται για το προσωπικό των εργαστηρίων, για τους εργάτες στα σφαγεία και στα γαλακτοκομικά προϊόντα και γενικά για όλες τις ομάδες πληθυσμού που βρίσκονται σε κίνδυνο από την συχνή επαφή με ζώα ή τα προϊόντα τους. Ένα τέτοιο εμβόλιο δεν είναι ακόμη διαθέσιμο στην αγορά.

**ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑ ΤΗΣ *C. burnetii* ΣΤΑ
ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ.**

Ο ορισμός της βακτηριοστατικής ή βακτηριοκτόνου δράσης ενός αντιβιοτικού διαφοροποιείται όταν αναφερόμαστε σε ενδοκυττάρια παθογόνα (98). Για ένα ενδοκυττάριο βακτήριο, σαν **MIC** (ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση) ορίζουμε την κατώτατη συγκέντρωση του αντιβιοτικού η οποία απαιτείται για την αναστολή της ενδοκυττάριας ανάπτυξης του βακτηρίου. Σαν ελάχιστη βακτηριοκτόνο συγκέντρωση (**MBC**) ορίζεται η κατώτερη συγκέντρωση του αντιβιοτικού η οποία απαιτείται για την παρεμπόδιση της επανεμφάνισης και αύξησης του ενδοκυττάρου παθογόνου.

Έτσι η διαπίστωση της βακτηριοκτόνου δράσης των αντιβιοτικών *in vitro*, δεν αποδεικνύει ότι τα αντιβιοτικά αυτά είναι βακτηριοκτόνα και *in vivo*. Η μόνη ένδειξη ότι ένα αντιβιοτικό είναι βακτηριοκτόνο *in vivo* είναι η πλήρης θεραπεία των ασθενών και η απουσία νέων υποτροπών.

Για να είναι ένα αντιβιοτικό αποτελεσματικό έναντι της *C. burnetii* θα πρέπει να εξουδετερώνει το ενδοκυττάριο παράσιτο μέσα στη θέση της εντόπισής του στο κύτταρο. Τα ενδοκυττάρια βακτήρια μετά τη φαγοκυττάρωση τους εντοπίζονται είτε στα φαγοσώματα είτε στα φαγολυσοσώματα ή καταφέρνουν να ξεφύγουν και από τα δύο. Αυτή η εντόπιση είναι αποφασιστικής σημασίας για την φαρμακευτική θεραπεία για δύο λόγους:

- 1) τα αντιβιοτικά θα πρέπει να έχουν πρόσβαση στη περιοχή που βρίσκεται το παράσιτο προκειμένου να είναι αποτελεσματικά, και
- 2) η αποτελεσματικότητα του αντιβιοτικού εξαρτάται από τη χημική σύνθεση και το pH του διαμερίσματος εντόπισης του βακτηρίου.

Άλλες συνθήκες που καθορίζουν την αντιμικροβιακή αποτελεσματικότητα είναι η ευαισθησία του παθογόνου στέλεχους, αλλά και η συγκέντρωση του αντιβιοτικού παράγοντα μέσα στο κύτταρο.

ΕΛΕΓΧΟΣ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ

Για τον έλεγχο, *in vitro*, της ευαισθησίας της *C. burnetii* στα αντιβιοτικά δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν τα μοντέλα που χρησιμοποιούνται στα εξωκυττάρια βακτήρια. Για τον σκοπό αυτό έχουν χρησιμοποιηθεί τρία διαφορετικά μοντέλα: το ζωικό

μοντέλο, το μοντέλο των γονιμοποιημένων αυγών και το μοντέλο των κυτταρικών καλλιέργειών (4, 31, 42, 57, 71, 96, 97, 113, 128, 129, 133, 134, 167, 173, 174, 175, 184).

- 1) **Ζωικό μοντέλο (πειραματόζωα)**. Για τον έλεγχο ευαισθησίας της *C. burnetii* στη στρεπτομυκίνη χρησιμοποιήθηκαν τα ινδικά χοιρίδια. Η μελέτη αυτή έδειξε ότι η στρεπτομυκίνη είναι αποτελεσματική σε δόσεις ακατάλληλες για τον άνθρωπο εξαιτίας της τοξικότητας της.
- 2) **Χρήση εμβρυοφόρων αυγών**. Για τον έλεγχο της βακτηριοστατικής δράσης των αντιβιοτικών χρησιμοποιήθηκαν τα γονιμοποιημένα αυγά. Τα αντιβιοτικά ενοφθαλμίζονται ταυτόχρονα με τα βακτήρια της *C. burnetii* στο λεκκιθικό σάκκο. Η διάρκεια του μέσου χρόνου επιβίωσης του εμβρύου καθορίζει την αποτελεσματική δράση του αντιβιοτικού. Μελέτες που έγιναν, χρησιμοποιώντας το μοντέλο αυτό, έδειξαν ότι η τετρακυκλίνη και τα ανάλογα της, η κοτριμοξαζόλη και η ριφαμπικίνη παρουσιάζουν βακτηριοστατική δράση έναντι της *C. burnetii*. Η πενικιλίνη, η κεφαλοθίνη, η στρεπτομυκίνη, η χλωραμφενικόλη, η κλινταμυκίνη και η ερυθρομυκίνη βρέθηκαν μη αποτελεσματικά στην αντιμετώπιση της *C. burnetii*.
- 3) **Μοντέλο κυτταρικής καλλιέργειας**. Αναπτύχθηκαν δύο μοντέλα κυτταρικής καλλιέργειας για να καθοριστεί, *in vitro*, η βακτηριοστατική ή βακτηριοκτόνος δράση των αντιβιοτικών έναντι της *C. burnetii*.
 - **Μοντέλο Βακτηριοστατικής δράσης**. Για την αξιολόγηση της βακτηριοστατικής δράσης ενός αντιβιοτικού έναντι της *C. burnetii*, περιγράφηκε η τεχνική των **shell vials** και του **έμμεσου ανοσοφθορισμού** σε κύτταρα HEL. Μελέτες που έγιναν χρησιμοποιώντας το μοντέλο αυτό, έδειξαν ότι η αμικασίνη και η αμοξυκιλλίνη δεν είναι αποτελεσματικές για τη θεραπεία του πυρετού Q. Η κοτριμοξαζόλη, η ριφαμπικίνη, η δοξυκυκλίνη, η τετρακυκλίνη, η μινοκυκλίνη, η σπαρφλοξασίνη και οι κινολόνες PD 127,391 και PD 131,628 έχουν βακτηριοστατική δράση έναντι της *C. burnetii*.
 - **Μοντέλο Βακτηριοκτόνου δράσης**. Σ' αυτό το μοντέλο, τα κύτταρα καλλιέργειας (Vero ή HEL) και τα βακτήρια *C. burnetii* αναπτύχθηκαν ταυτόχρονα. Από μελέτες που έγιναν βρέθηκε ότι το μοντέλο αυτό δεν είναι κατάλληλο για την αξιολόγηση της βακτηριοκτόνου δράσης των αντιβιοτικών εξαιτίας του πολλαπλασιασμού των κυττάρων καλλιέργειας. Η αύξηση της κυτταροκαλλιέργειας οδηγεί σε παραπλανητικά αποτελέσματα γιατί προκαλεί αραίωση των μολυσμένων κυττάρων με *C. burnetii* (97). Αργότερα ο Raoult και συνεργάτες του (131) χρησιμοποίησαν τη κυτταρική σειρά P388 (μακροφάγα ποντικού), στην οποία σύγκριναν τον αρχικό αριθμό βακτηρίων *C. burnetii* πριν την προσθήκη του αντιβιοτικού με τον αριθμό των ζωντανών βακτηρίων μετά από 24 ώρες επώασης με το αντιβιοτικό. Μ' αυτή την τεχνική η πεφλοξασίνη, η

δοξυκυκλίνη, η σιπροφλοξασίνη και η ριφαμπικίνη δεν ήταν βακτηριοκτόνες έναντι της *C. burnetii*. Επειδή η *C. burnetii* ζει σε όξινο περιβάλλον, οι ίδιοι συγγραφείς υπέθεσαν ότι το χαμηλό pH αναστέλλει την βακτηριοκτόνο δράση των αντιβιοτικών (131). Με τη χρησιμοποίηση της αμανταδίνης, της χλωροκίνης ή του NH_4Cl κατάφεραν να αυξήσουν το pH των λυσοσωμάτων στο 5.3, 5.7 και 6.8 αντίστοιχα. Η ριφαμπικίνη εξακολούθησε να μην είναι βακτηριοκτόνος για τη *C. burnetii* ενώ η δοξυκυκλίνη έγινε βακτηριοκτόνος σε pH 5.7 και 6.8 ενώ η πεφλοξασίνη σε pH 6.8 .

ΕΤΕΡΟΓΕΝΕΙΑ ΣΤΗΝ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ ΤΗΣ *C. burnetii* ΣΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ

Απομονωθέντα στελέχη *C. burnetii* από ασθενείς με οξύ πυρετό Q παρουσιάζουν μεγαλύτερη ευαισθησία στα αντιβιοτικά, *in vitro*, απ'ότι τα απομονωθέντα στελέχη προερχόμενα από ασθενείς με χρόνια λοίμωξη πυρετού Q (97).

Διαφορετικοί πλασμιδιακοί τύποι έχουν ανιχνευτεί σε απομονωθέντα στελέχη *C. burnetii* που εμπλέκονται με την οξεία ή την χρόνια λοίμωξη. Μελέτες που έγιναν στην *E. Coli* χρησιμοποιώντας τα διαφορετικά πλασμίδια της *C. burnetii*, δεν έδειξαν καμιά μεταβολή στην ευαισθησία της στα αντιβιοτικά. Στα πλασμίδια της *C. burnetii* δεν υπάρχουν γονίδια που να κωδικοποιούν για την αντοχή στα αντιβιοτικά ή αν υπάρχουν τέτοια γονίδια, μεταφερόμενα στην *E. Coli* δεν εκφράζονται (97, 176) .

Οξεία Λοίμωξη

Οι θεραπευτικοί στόχοι για τον οξύ και χρόνιο πυρετό Q διαφέρουν. Στον οξύ πυρετό Q, στόχος είναι ο έλεγχος της ανάπτυξης του ενδοκυττάριου παθογόνου. Ένα αντιβιοτικό με βακτηριοστατική δράση επαρκεί για την ανάρρωση του ασθενούς (1, 98, 132, 135, 141) .

Χρόνια Λοίμωξη

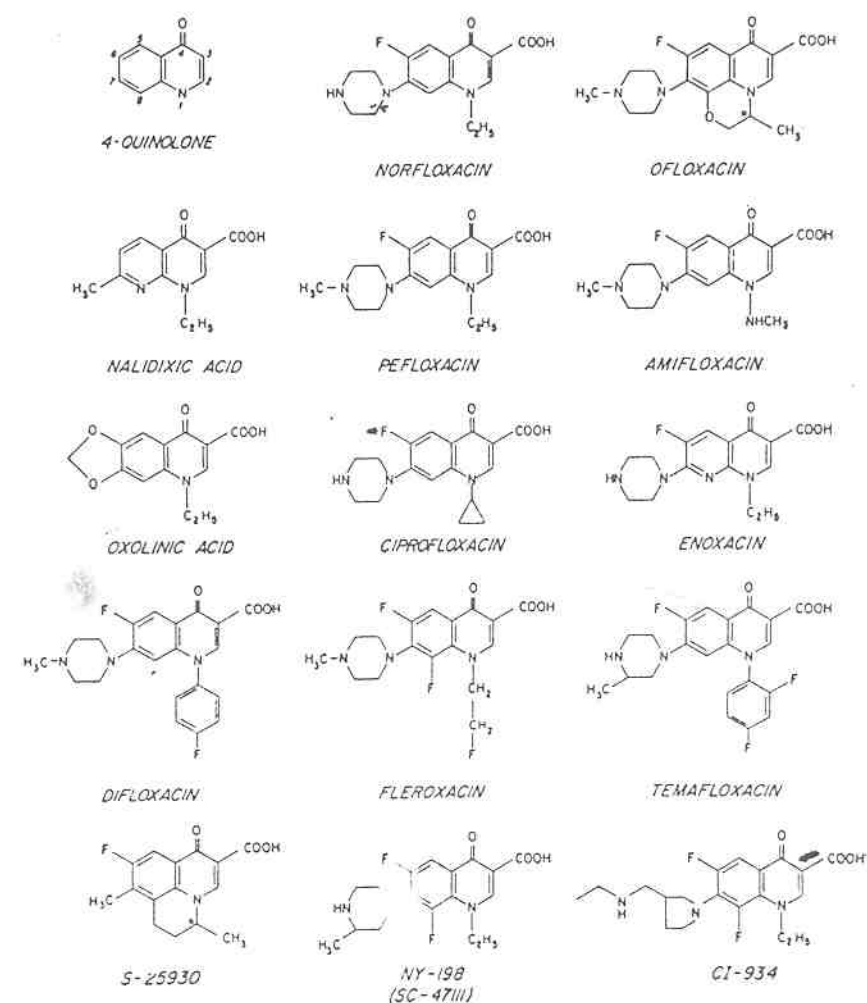
Στο χρόνια πυρετό Q, η βακτηριοστατική συγκέντρωση του αντιβιοτικού επιτρέπει μεν τον έλεγχο της νόσου αλλά δεν θεραπεύει τον ασθενή. Για την εξάλειψη του παθογόνου παράγοντα απαιτείται ένα βακτηριοκτόνο αντιβιοτικό (1, 98, 133, 135, 141) .

Μέχρι σήμερα, κανένα αντιβιοτικό δεν έχει αποδειχτεί βακτηριοκτόνο για την *C. burnetii*, γεγονός που μπορεί να εξηγήσει τις θεραπευτικές αποτυχίες στην αντιμετώπιση του χρόνιου πυρετού Q (129, 141, 163).

ΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΚΙΝΟΛΟΝΩΝ.

Οι κινολόνες είναι συνθετικοί αντιμικροβιακοί παράγοντες. Το πρώτο μέλος αυτής της οικογένειας είναι το ναλιδιξικό οξύ, το οποίο εισήχθηκε στην κλινική πράξη το 1964, στις ΗΠΑ (69, 193). Στα επόμενα 17 χρόνια, το ναλιδιξικό οξύ ακολούθησαν το οξολινικό οξύ, το πιπεμιδικό οξύ και η σινοξασίνη. Γύρω στο 1981, άρχισαν να εμφανίζονται δημοσιεύσεις για τα νεότερα παράγωγα των κινολονών, τα οποία ήταν πιο ισχυρά, *in vitro*, εναντίον ενός ευρέου φάσματος παθογόνων βακτηρίων. Κατά τα τέλη του 1984 υπήρχαν τουλάχιστον 11 καινούργιες κινολόνες. Από αυτές περισσότερες πληροφορίες αφορούσαν την νορφλοξασίνη, την σιπροφλοξασίνη, την ενοξασίνη, την οφλοξασίνη, την πεφλοξασίνη και την αμιφλοξασίνη (69, 193).

Σχήμα 4. Χημική σύσταση των φλουοροκινολονών



Το υπερελικωμένο DNA έχει πιο συμπαγή διαμόρφωση από την αντίστοιχη του μη υπερελικωμένου και με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται ευκολότερα το πακετάρισμα του DNA στο κύτταρο. Ο αριθμός σύνδεσης της υπερελικωμένης έλικας του δίκλωνου DNA μπορεί να αυξηθεί ή να μειωθεί από τις τοποισομεράσες. Τα ένζυμα αυτά έχουν την ιδιότητα να αλλάζουν την μορφή του DNA. Κατατάσσονται σε τύπου I ή II, ανάλογα αν μεταβάλλουν τον αριθμό σύνδεσης σε βήματα της μονάδας (1), ή δυάδας (2), αντίστοιχα (σχήμα 5, 6).

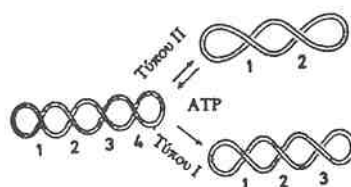
Οι πρώτες, που ονομάζονται και ένζυμα κλεισίματος ρηγμάτων, δημιουργούν πρόσκαιρα ρηγμάτα στον ένα μόνο κλώνο της δίκλωνης έλικας του DNA, ενώ οι δεύτερες δημιουργούν και στους δύο κλώνους.

Οι τοποισομεράσες τύπου II (ή DNA γυράσες) των βακτηρίων σταδιακά μετατρέπουν το χαλαρωμένο DNA σε ισχυρά αρνητικά υπερελικωμένο DNA. Η καταλυτική αυτή δράση απαιτεί την υδρόλυση ενός μορίου ATP. Οι γυράσες στα βακτήρια συμμετέχουν στη μετακίνηση της διχάλας αντιγραφής και παρέχουν στα κύτταρα ζωτικές λειτουργίες (αντιγραφή, μεταγραφή κτλ). Αυτό

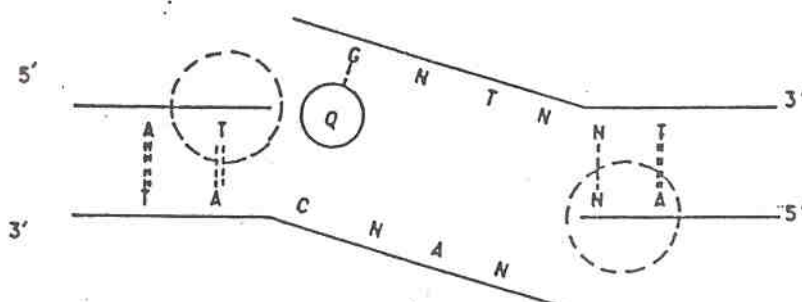
τεκμηριώνεται και από το γεγονός ότι μεταλλάγματα με ελλαττωματικές τοποισομεράσες συνήθως δυσκολεύονται να επιβιώσουν.

Οι **κινολόνες** αναστέλλουν τη βακτηριακή τοποισομεράση II (γυράση του DNA), ένα ένζυμο που αποτελείται από δύο υπομονάδες A και δύο υπομονάδες B. Οι υπομονάδες αυτές κωδικοποιούνται από τα γονίδια *gyrA* και *gyrB* αντίστοιχα (69, 193). Οι νέες φλουροκινολόνες είναι αντιμικροβιακοί παράγοντες ευρέου φάσματος, οι οποίοι αναστέλλουν την υπομονάδα A της γυράσης του DNA κατά την υπερελίκωση του DNA *in vitro*, ενώ *in vivo* διακόπτουν γρήγορα και αιφνίδια την αντιγραφή του DNA (193).

Σχήμα 5. Οι τοποισομεράσες τύπου I και II χαλαρώνουν αρνητικά υπερελικωμένο DNA.



Σχήμα 6. Η υπομονάδα A της γυράσης κόβει τις δύο αλυσίδες του DNA σε απόσταση 4 αζωτούχων βάσεων. Η κινολόνη ενώνεται πάνω στη G με δεσμούς H.



Κινολόνες και ενδοκυττάρια βακτήρια.

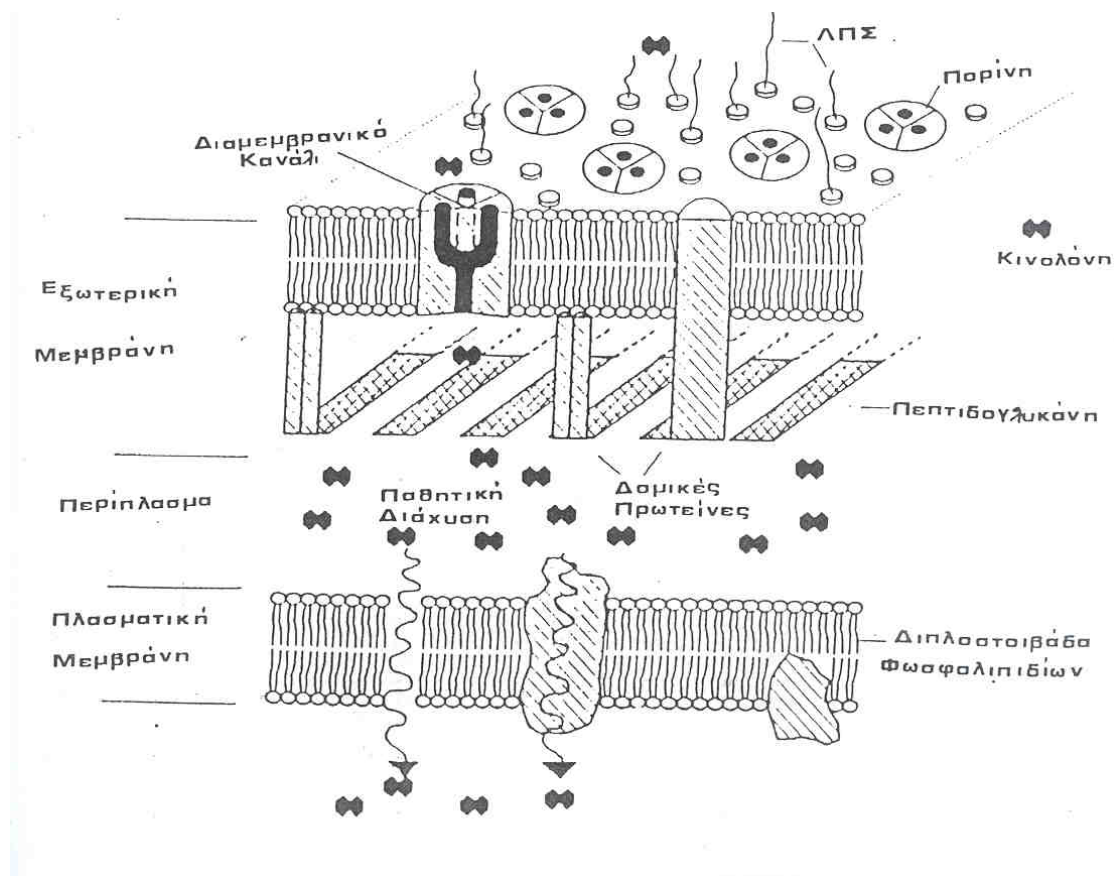
Για να δράσουν οι κινολόνες στα ενδοκυττάρια βακτήρια, πρέπει να διαπεράσουν την κυτταρική μεμβράνη και να εισχωρήσουν στα φαγοκύτταρα μέσα στα οποία ευρίσκονται τα βακτήρια (98).

Ένα αντιβιοτικό μπορεί να εισχωρήσει στο κύτταρο με απλή διάχυση ή με ενεργό τρόπο μεταφοράς. Η διάχυση καθορίζεται από την κλίση συγκέντρωσης του αντιβιοτικού, από την επιφάνεια της μεμβράνης, από το χρόνο επώασης, από τη θερμοκρασία και από τη λιποδιαλυτότητα του αντιβιοτικού.

Μελέτες που έγιναν σε φαγοκύτταρα και ινοβλάστες έδειξαν ότι οι φλουροκινολόνες έχουν καλή διάχυση στους ιστούς (45, 79, 97). Η ενδοκυττάρια συγκέντρωσή τους δεν εξαρτάται από την ζωτικότητα των κυττάρων.

Δεν είναι ακόμα γνωστό εάν υπάρχει συγκεκριμένη θέση εντόπισης των κινολονών μέσα στο κύτταρο. Μελέτες κλασματοποίησης των κυττάρων έδειξαν ότι εντοπίζονται μέσα στο κυτταρόπλασμα και στα λυσοσώματα (45, 97).

Σχήμα 7. Ενδοκυττάρια συγκέντρωση των κινολονών στα Gram αρνητικά βακτήρια.



ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η *Coxiella burnetii* είναι ο αιτιολογικός παράγοντας του πυρετού Q. Ξενιστές της στη φύση είναι τα αιγοπρόβατα, τα βοοειδή, οι γάτες, οι κρότωνα και τα τρωκτικά. (1, 93, 141).

Η επιδημιολογία και η κλινική εικόνα του πυρετού Q διαφέρει από χώρα σε χώρα (1, 75, 93, 140, 141). Η προσβολή του ανθρώπου από *C. burnetii* μπορεί να εμφανιστεί σαν οξεία ή χρόνια λοίμωξη. Η **οξεία λοίμωξη** είναι συνήθως αυτοιάσιμο εμπύρετο νόσημα μικρής διάρκειας και δεν απειλείται η ζωή του ασθενούς. Θεραπεία εκλογής είναι η τετρακυκλίνη. Η μόλυνση από *C. burnetii* μπορεί να έχει χρόνια απόληξη και σε σπάνιες περιπτώσεις να καταλήξει σε ενδοκαρδίτιδα (**χρόνια λοίμωξη**). Η τετρακυκλίνη αποτελεί το κύριο αντιβιοτικό στη θεραπεία της χρόνιας λοίμωξης του πυρετού Q. Στη θεραπευτική αγωγή της χρόνιας λοίμωξης χρησιμοποιείται επίσης η χλωραμφενικόλη, οι κινολόνες, η ριφαμπικίνη ή ο συνδιασμός τους. Παρόλο που τα παραπάνω αντιβιοτικά φαίνονται αποτελεσματικά στον έλεγχο της νόσου, (αναστέλλουν την ανάπτυξη του μικροοργανισμού), ωστόσο δεν εξαλείφουν εντελώς το λοιμογόνο παράγοντα. Μέχρι σήμερα, κανένα αντιβιοτικό δεν έχει αποδειχθεί να έχει βακτηριοκτόνο δράση για την *C. burnetii*, γεγονός που μπορεί να εξηγήσει τις θεραπευτικές αποτυχίες στην αντιμετώπιση του χρόνιου πυρετού Q (1, 135, 141, 163).

Στην **Ελλάδα** και τη **Κύπρο**, υπάρχουν οροεπιδημιολογικές και κλινικές μελέτες για τον πυρετό Q (141, 152, 153, 168). Ο αιτιολογικός παράγοντας της νόσου δεν είχε απομονωθεί και επομένως:

-υπήρχε άγνοια για τα κυκλοφορούντα στελέχη *C. burnetii* και για την ύπαρξη ετερογένειας ανάλογα με την πηγή προέλευσης (άνθρωπος, ζώα, κρότωνα)

-υπήρχε σημαντικό κενό στη μελέτη του πυρετού Q, αφού ο αιτιολογικός παράγοντας δεν είχε απομονωθεί και κατά συνέπεια δεν ήταν δυνατή η *in vitro* μελέτη της συμπεριφοράς του παθογόνου μικροοργανισμού απέναντι στα αντιβιοτικά. Εξάλλου οι σύγχρονες τεχνικές για την ανίχνευση, απομόνωση και μελέτη ευαισθησίας *C. burnetii* στα αντιβιοτικά δεν είχαν εφαρμοστεί σε Ελλάδα και Κύπρο.

Η ελλιπής διάγνωση κατά τα αρχικά στάδια του πυρετού Q, οι υψηλότερες MIC (χρόνια λοίμωξη) και η ανάγκη εξεύρεσης βακτηριοκτόνων σχημάτων (χρόνια λοίμωξη) είναι τα σημαντικότερα προβλήματα στη θεραπευτική αντιμετώπιση της χρόνιας λοίμωξης του πυρετού Q. Η διαλεύκανση τους θα οδηγήσει σε βελτίωση της θεραπευτικής αγωγής και στην ορθότερη χρήση των αντιβιοτικών.

Στόχοι της παρούσας μελέτης ήταν:

- 1) Η ανίχνευση, απομόνωση και ταυτοποίηση στελεχών *C. burnetii* από κλινικά δείγματα ασθενών με πυρετό Q και ξενιστές (αιγοπρόβατα και κρότωνα), προκειμένου να μελετηθεί η

ύπαρξη ετερογένειας των στελεχών ανάλογα με την κλινική εικόνα του πυρετού Q και την πηγή προέλευσης.

- 2) Η συμπεριφορά των απομονωθέντων στελεχών *C. burnetii* απέναντι στα αντιβιοτικά και η αναζήτηση μηχανισμών αντοχής που δυνητικά *in vitro* μπορεί να αναπτύξει η *C. burnetii*, στις κινολόνες, με απώτερο στόχο τη συμβολή στην καλύτερη θεραπευτική αγωγή του πυρετού Q.

Η παρούσα μελέτη αποτελείται από δύο μέρη:

ΜΕΡΟΣ ΠΡΩΤΟ: Ανίχνευση, απομόνωση και ταυτοποίηση στελεχών *C. burnetii* από δείγματα αίματος ασθενών με οξεία λοίμωξη πυρετού Q και κρότνες.

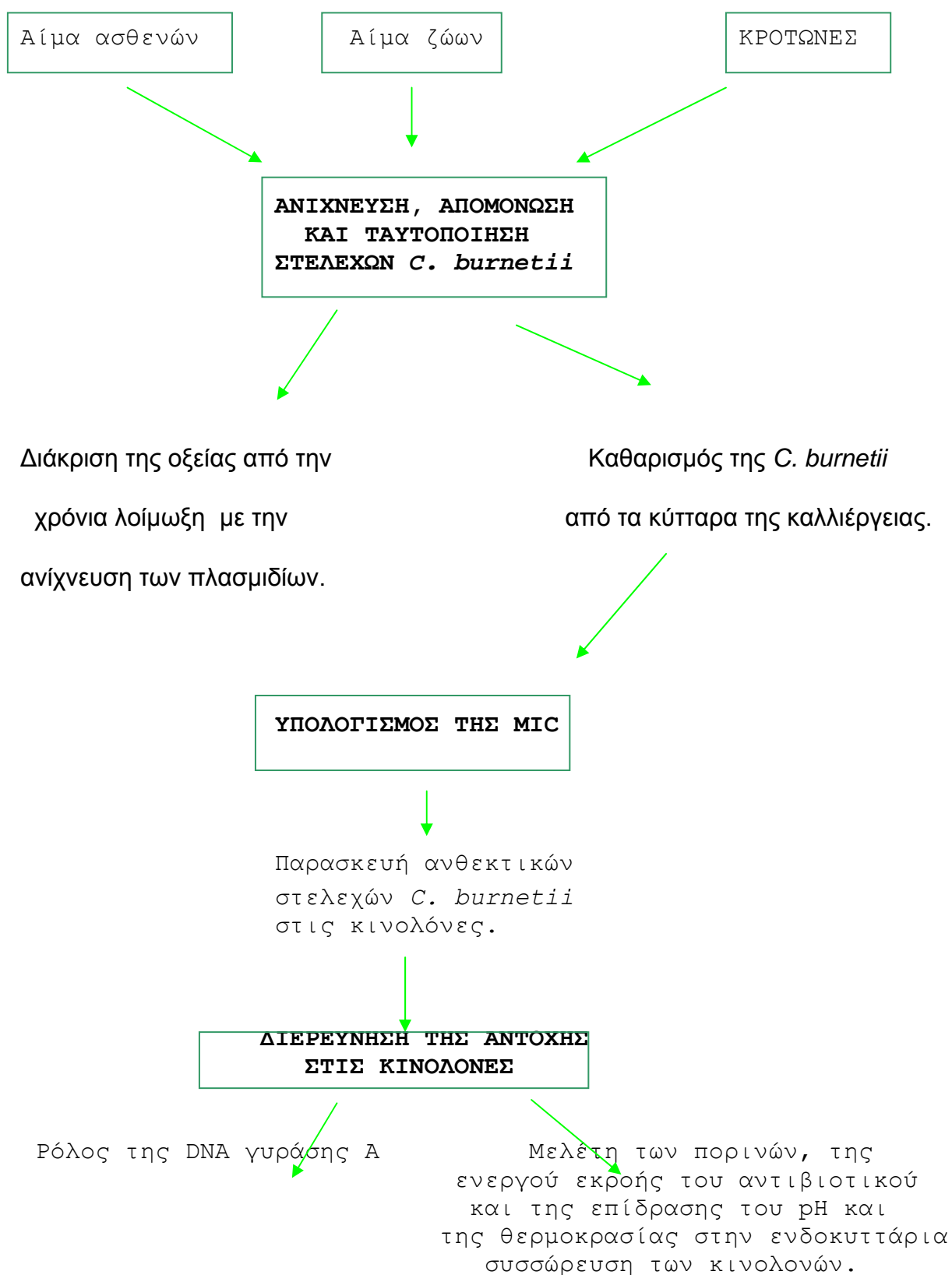
Το υλικό της μελέτης αποτέλεσαν 25 δείγματα αίματος ασθενών, από Κρήτη και Κύπρο, με υψηλούς τίτλους αντισωμάτων έναντι της *C. burnetii*, 9 δείγματα αίματος αιγοπροβάτων που απέβαλαν και 141 κρότνες από περιοχές υψηλού κινδύνου πυρετού Q.

Στα δείγματα αίματος έγινε ορολογικός έλεγχος με τη μέθοδο του έμμεσου ανοσοφθορισμού (βλέπε σελίδα 54), για την ανίχνευση αντισωμάτων έναντι της *C. burnetii*, ενώ στους κρότνες εφαρμόστηκε η δοκιμασία της αιμολέμφου (βλέπε σελίδα 56), για την αμνίχνευση *C. burnetii*. Στη συνέχεια εφαρμόστηκαν οι τεχνικές nested PCR (βλέπε σελίδα 64), shell vials, PCR-RFLP και Sequencing (βλέπε σελίδες 59, 65, 73), για την άμεση ανίχνευση του μικροοργανισμού, την απομόνωση και την ταυτοποίηση στελεχών *C. burnetii*.

ΜΕΡΟΣ ΔΕΥΤΕΡΟ: Μελέτη της ευαισθησίας και των μηχανισμών αντοχής που δυνητικά μπορεί να αναπτύξει η *C. burnetii* στις κινολόνες.

Υλικό της μελέτης αποτέλεσαν τα 9 απομονωθέντα στελέχη *C. burnetii* από ασθενείς με οξεία λοίμωξη πυρετού Q. Μελετήθηκε η ευαισθησία τους στα αντιβιοτικά pefloxacin, ofloxacin, ciprofloxacin, trovafloxacin, doxycycline και clarithromycin (βλέπε σελίδα 80). Στη συνέχεια έγινε έλεγχος βακτηριοκτόνου δράσης της trovafloxacin στη *C. burnetii* (βλέπε σελίδα 87). Προκειμένου να μελετηθεί η αντοχή στις κινολόνες, δύο από τα απομονωθέντα ευαίσθητα στελέχη μετατράπηκαν *in vitro* σε ανθεκτικά στη pefloxacin (βλέπε σελίδα 90). Διερευνήθηκε ο ρόλος της γυράσης A (βλέπε σελίδα 92), η αδιαβατότητα των πορινών (βλέπε σελίδα 96), ο μηχανισμός ενεργού εκροής του αντιβιοτικού (βλέπε σελίδα 108) και η επίδραση της θερμοκρασίας και του pH στην ενδοκυττάρια συγκέντρωση του αντιβιοτικού.

ΓΕΝΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΤΗΣ ΕΡΕΥΝΑΣ

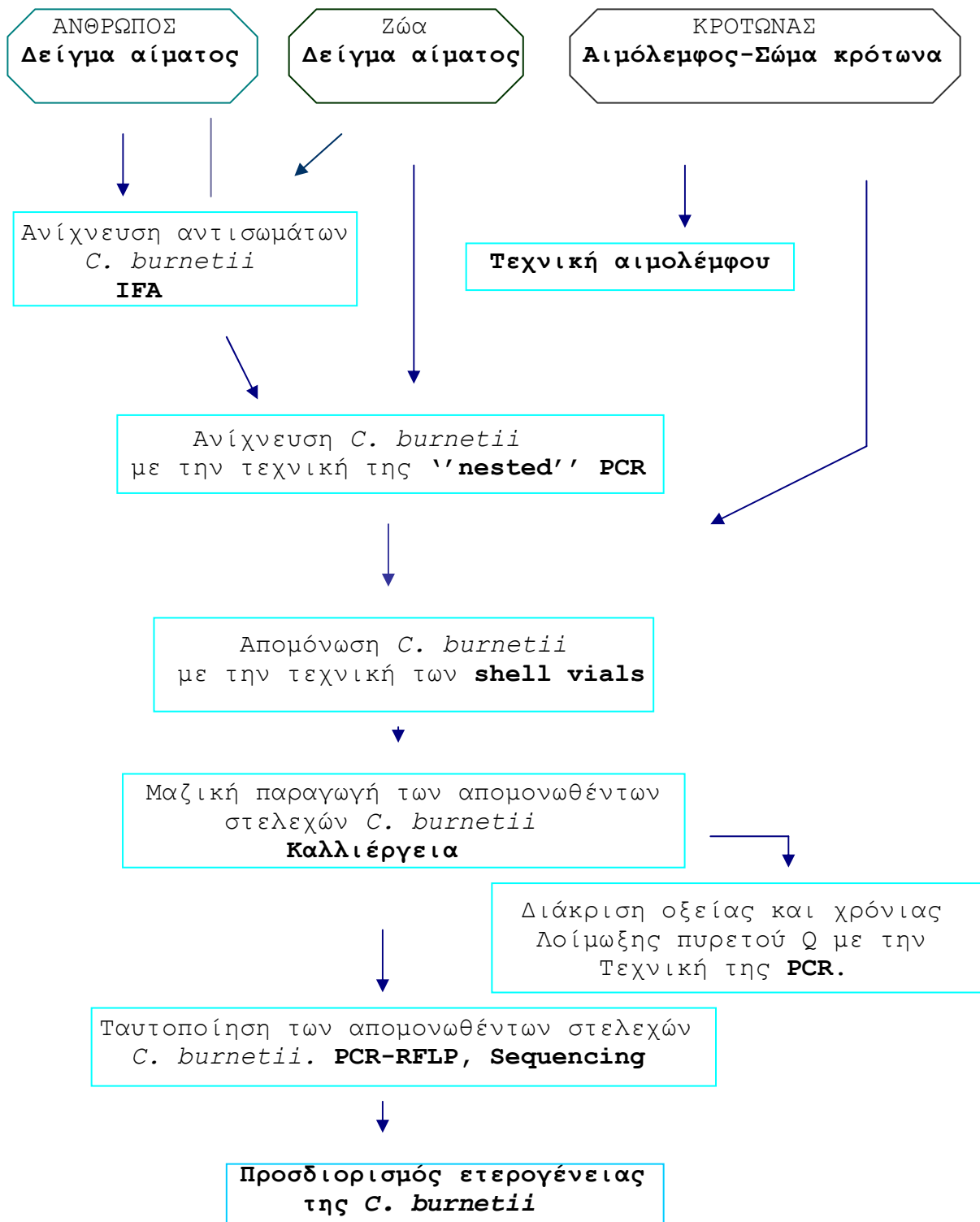


ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

ΜΕΡΟΣ ΠΡΩΤΟ

Ανίχνευση, Απομόνωση και Ταυτοποίηση στελεχών *C. burnetii*.

Τα παρακάτω σχήματα δείχνουν την στρατηγική που ακολουθήθηκε:



ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ, ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΣΤΕΛΕΧΩΝ *C. burnetii*.

ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ *C. burnetii*

ΟΡΟΛΟΓΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

Λήψη λευκών αιμοσφαιρίων (buffy coat)

- Λήψη 5ml αίματος
- Συλλογή σε σωλήνες χωρίς αντιπηκτικό για τον ανοσοφθορισμό και με αντιπηκτικό (ηπαρίνη) για την απομόνωση
- Παραμονή σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 1 ώρα για να καθιζάνουν τα ερυθρά
- Φύλαξη των λευκών αιμοσφαιρίων στους -20°C για απομόνωση.
- Φύλαξη του ορού στους 4°C για ανοσοφθορισμό.

Έμμεσος Ανοσοφθορισμός.

Αρχή της μεθόδου

Η τεχνική αυτή βασίζεται στην αντίδραση αντιγόνου-αντισώματος.

Τα μόρια του αντισώματος συνδέονται χημικά με τις χρωστικές ουσίες χωρίς να καταστρέφεται η ανοσολογική τους ειδικότητα. Όταν τα σεσημασμένα με τη βοήθεια φλουροοσκεΐνης μόρια των αντισωμάτων, έλθουν σε επαφή με ομόλογα αντιγόνα στα κύτταρα, τότε τα σεσημασμένα αυτά μόρια προσκολλούνται επί των αντιγονικών θέσεων. Κάτω από το μικροσκόπιο φθορισμού τα προσκολληθέντα μόρια εκπέμπουν φθορίζον φως το οποίο εξαρτάται από την φθορίζουσα ουσία η οποία χρησιμοποιείται για τη σήμανση του αντισώματος.

Η τεχνική αυτή εφαρμόστηκε για τον επανέλεγχο ορών ασθενών με κλινική εικόνα πυρετού Q και αιγοπροβάτων που απέβαλαν.

Υλικά

- Αντιγόνο *C. burnetii*
- IgG και IgM αντι- ανθρώπινα αντισώματα αίγας συζευγμένα με φλουροοσκεΐνη
- Rheumatoid Factor absorbent για προσδιορισμό των IgM
- Γλυκερόλη
- Αιθανόλη 70%
- Ακετόνη
- Σκόνη μη λιπαρού γάλακτος
- Διάλυμα Phosphate Buffer Saline (PBS 1X)

Διαδικασία

- Οι πλάκες ανοσοφθορισμού εμβαπτίζονται σε αιθανόλη 70% για 5 λεπτά και καθαρίζονται με μαλακή πετσέτα.
 - Το αντιγόνο τοποθετείται στις πλάκες ανοσοφθορισμού με τη βοήθεια λεπτής πέννας.
 - Εήρανση.
 - Το αντιγόνο σταθεροποιείται με εμβάπτιση των πλακών σε ακετόνη για 10 λεπτά.
 - Εήρανση.
 - Προετοιμάζονται διαδοχικές αραιώσεις των ορών με PBS εμπλουτισμένο με 3% σκόνη μη λιπαρού γάλακτος.
 - Για τον προσδιορισμό των IgM οι αραιώσεις των ορών επωάζονται για 10 λεπτά με Rheumatoid Factor absorbent.
 - 20μl κάθε αραιώσης τοποθετούνται στις υποδοχές των αντικειμενοφόρων πλακών.
 - Η πλάκα επωάζεται για 30 λεπτά στους 37⁰C με υγρασία.
 - Ακολουθούν δύο δεκάλεπτες πλύσεις με PBS και μια με νερό.
 - Εήρανση.
 - Τα φθορίζοντα αντισώματα αραιώνονται (1/300) με τη βοήθεια μίγματος Blue Evans και PBS 3% λιπαρού γάλακτος.
 - 20μl κάθε αραιώσης τοποθετούνται στις υποδοχές των αντικειμενοφόρων πλακών.
 - Η πλάκα επωάζεται για 30 λεπτά στους 37⁰C με υγρασία.
 - Ακολουθούν δύο δεκάλεπτες πλύσεις με PBS και μια με νερό.
 - Εήρανση
 - Προστίθενται μερικές σταγόνες γλυκερόλης στις πλάκες και επικαλύπτονται με καλυπτρίδα, αποφεύγοντας τη δημιουργία φυσαλίδων.
 - Παρατήρηση της πλάκας σε μικροσκόπιο ανοσοφθορισμού.
- Οι *C. burnetii* φθορίζουν πράσινες.

ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΚΡΟΤΩΝΩΝ ΑΠΟ ΑΙΓΟΠΡΟΒΑΤΑ

Οι κρότωνα ανήκουν στα αρθρόποδα, κλάση των Αραχνοειδών, ομάδα των Ακάρων, τάξη των κροτώνων. Ταξινομούνται σε 3 οικογένειες: τα Ixodidae, τα Argasidae και τα Nuttalliellidae. Τα σημαντικότερα κριτήρια διαφοροποίησης είναι η μορφολογία της πρωκτικής ρωγμής, η παρουσία ή απουσία οφθαλμών, η μορφολογία της ψευδοκεφαλής και ιδιαίτερα της προβοσκίδας, η ανάπτυξη των ισχίων και η διακόσμηση του θυρεού. Οι ρικέτσιες μεταδίδονται μόνο από τους κρότωνα της οικογένειας των Ixodidae.

Διαδικασία

- Οι χειρισμοί γίνονται σε θάλαμο νηματικής ροής.
- Ο κρότωνας απολυμαίνεται με την εμβάπτιση του σε διάλυμα απολύμανσης για 10 λεπτά, ακολουθούν δύο πεντάλεπτες πλύσεις με στείρο νερό και στο τέλος στεγνώνεται με στείρο απορροφητικό χαρτί μέσα σε τρυβλίο.
 - Κρατώντας τον κρότωνα με την λαβίδα, κόβεται το πρώτο αριστερό πόδι στην μεσαία άρθρωση ώστε να απελευθερωθεί μια σταγόνα αιμολέμφου.
 - Η σταγόνα τοποθετείται πάνω στο πηγάδι της αντικειμενοφόρου πλάκας, ενώ ο κρότωνας φυλάσσεται σε στείρο σωληνάριο στους -80°C .
 - Εφαρμόζεται η χρώση Gimenez στην αντικειμενοφόρο πλάκα.
Οι *C. burnetii* εμφανίζονται ροζ σε πράσινο κυτταρικό φόντο.

ΧΡΩΣΗ Gimenez.

Εφαρμόστηκε για την άμεση ανίχνευση *C. burnetii* σε μολυσμένες κυτταροκαλλιέργειες και σε αιμόλεμφο κρότωνα.

Αρχή της μεθόδου

Μετά από περίπου 10 ημέρες επώασης των shell vials ή 3 με 5 ημερών από την μόλυνση της κυτταροκαλλιέργειας, γίνεται δειγματοληψία του κυτταρικού τάπητα και του υπερκειμένου. Με την βοήθεια της χρώσης Gimenez εκτιμάται ο βαθμός μόλυνσης.

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

Διαλύματα

-Βασική Φουξίνη:

Διάλυμα Α: 10 gr Φουξίνης σε 100ml καθαρής Αιθανόλης

Διάλυμα β: 11,25 gr Φαινόλης σε 250ml H₂O

Ακολουθεί η ανάμειξη των δύο διαλυμάτων και προσθήκη 650ml dH₂O. (Το διάλυμα διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου για 1 χρόνο).

-Πράσινο του Μαλαχίτη 0,8%: 2gr Οξαλικού Μαλαχίτη σε 250ml H₂O.

(Το διάλυμα διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου για 4 μήνες).

-Ρυθμιστικό διάλυμα:

3,5ml NaH ₂ PO ₄ (0,2M)
15,5ml NaHPO ₄ (0,2M)
19 ml H ₂ O Απεσταγμένο.

Διαδικασία

- Αναμιγνύονται 2ml βασικής φουξίνης και 5ml ρυθμιστικού διαλύματος.
 - Ακολουθεί φιλτράρισμα του διαλύματος.
 - Τα μολυσμένα κύτταρα ή το καθαρό αντιγόνο τοποθετείται σε αντικειμενοφόρο πλάκα.
 - **Μετά το στέγνωμα της πλάκας σε θερμοκρασία δωματίου ακολουθεί χρώση της με το διάλυμα της βασικής φουξίνης για 3 λεπτά.**
 - Έπειτα ακολουθεί πλύση της πλάκας με H₂O βρύσης.
 - Η πλάκα χρωματίζεται με διάλυμα πράσινου του μαλαχίτη για 9 δευτερόλεπτα.
 - Ακολουθεί πλύση της πλάκας με H₂O βρύσης και ξανά χρώση της με το διάλυμα πράσινου του μαλαχίτη για 9 δευτερόλεπτα.
 - Η πλάκα πλύνεται με H₂O βρύσης και στεγνώνεται ανάμεσα σε δύο φύλλα απορροφητικού χαρτιού. Ακολουθεί έπειτα παρατήρηση της πλάκας με καταδυτικό φακό σε οπτικό μικροσκόπιο.
- Η *C. burnetii* εμφανίζεται φούξια σε πράσινο κυτταρικό φόντο.

ΤΕΧΝΙΚΗ ΤΟΥ ΑΜΕΣΟΥ ΑΝΟΣΟΦΘΟΡΙΣΜΟΥ

Εφαρμόστηκε για την άμεση ανίχνευση *C. burnetii* σε μολυσμένες κυτταροκαλλιέργειες και για την εύρεση της βακτηριοστατικής και βακτηριοκτόνου δράσης των αντιβιοτικών.

Υλικά

- IgG αντι- ανθρώπινα αντισώματα αίγας συζευγμένα με φλουοροσκεΐνη
- Γλυκερόλη
- Αιθανόλη 70%
- Ακετόνη
- Σκόνη μη λιπαρού γάλακτος
- Διάλυμα Phosphate Buffer Saline (PBS 1X)

Διαδικασία

- Οι πλάκες ανοσοφθορισμού εμβαπίζονται σε αιθανόλη 70% για 5 λεπτά και καθαρίζονται με μαλακή πετσέτα.
- Το μολυσματικό υλικό από τα shell vials ή από καλλιέργεια κυττάρων, τοποθετείται στις πλάκες ανοσοφθορισμού με τη βοήθεια λεπτής πέννας. Μη μολυσμένα κύτταρα χρησιμοποιούνται σαν μάρτυρες.
- Τα παρασκευάσματα αφήνονται να ξηρανθούν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.
- Γίνεται μονιμοποίηση με ακετόνη επί 10 λεπτά.
- Τα παρασκευάσματα ξηραίνονται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

- 20μl ορού ασθενών, με υψηλούς τίτλους αντισωμάτων έναντι της *C. burnetii*, τοποθετούνται στις υποδοχές των αντικειμενοφόρων πλακών.
 - Η πλάκα επωάζεται για 30 λεπτά στους 37⁰C με υγρασία.
 - Ακολουθούν δύο δεκάλεπτες πλύσεις με PBS και μια με νερό.
 - Τα παρασκευάσματα αφήνονται να ξηρανθούν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.
 - Τα φθορίζοντα αντι-ανθρώπινα αντισώματα αραιώνονται (1/300) με τη βοήθεια μίγματος Blue Evans και PBS 3% λιπαρού γάλακτος.
 - 20μl κάθε αραιώσης τοποθετούνται στις υποδοχές των αντικειμενοφόρων πλακών.
 - Η πλάκα επωάζεται για 30 λεπτά στους 37⁰C με υγρασία.
 - Ακολουθούν δύο δεκάλεπτες πλύσεις με PBS και μια με νερό.
 - Τα παρασκευάσματα αφήνονται να ξηρανθούν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.
 - Προστίθενται μερικές σταγόνες γλυκερόλης στις πλάκες και επικαλύπτονται με καλυπτρίδα, αποφεύγοντας τη δημιουργία φυσσαλίδων.
 - Παρατήρηση της πλάκας σε μικροσκόπιο ανοσοφθορισμού.
- Οι *C. burnetii* φθορίζουν πράσινες.

ΤΕΧΝΙΚΗ ΤΗΣ PCR.

Η μέθοδος χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση *C. burnetii* στις κυτταροκαλλιέργειες και στη ταυτοποίηση των απομονωθέντων στελεχών με τη χρήση της τεχνικής PCR-RFLP. Επίσης χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση πλασμιδίων οξείας ή χρόνιας λοίμωξης σε αίμα ασθενών με πυρετό Q ή σε κυτταροκαλλιέργειες.

Αρχή της μεθόδου

Η τεχνική της **PCR** χρησιμοποιείται για την αντιγραφή ενός συγκεκριμένου τμήματος DNA. Για να εφαρμόσουμε την μέθοδο PCR πρέπει να γνωρίζουμε τη σειρά των νουκλεοτιδίων που βρίσκονται στα άκρα του τμήματος του DNA που θέλουμε να πολλαπλασιάσουμε. Η γνωστή αλληλουχία χρησιμοποιείται για την χημική σύνθεση δύο ολιγονουκλεοτιδίων, συμπληρωματικών προς τα άκρα κάθε αλυσίδας. Τα ολιγονουκλεοτίδια αυτά λειτουργούν ως πρωταρχικά τμήματα για την σύνθεση συμπληρωματικών αλυσίδων DNA. Η σύνθεση καταλύεται από μια ειδική DNA πολυμεράση, όπως η Taq πολυμεράση η οποία είναι ανθεκτική στις υψηλές θερμοκρασίες. Η αρχή της μεθόδου απεικονίζεται στην εικόνα 1.

Το δίκλωνο DNA που έχει το τμήμα που θέλουμε να πολλαπλασιάσουμε τοποθετείται υπό μορφή διαλύματος στον δοκιμαστικό σωλήνα μαζί με τα ολιγονουκλεοτίδια, ελεύθερα δεοξυριβονουκλεοτίδια, DNA πολυμεράση και ιχνοστοιχεία που κάνουν την πολυμεράση πιο αποδοτική.

Η μέθοδος περιλαμβάνει 35 επαναλαμβανόμενους κύκλους πολ/μού του DNA.

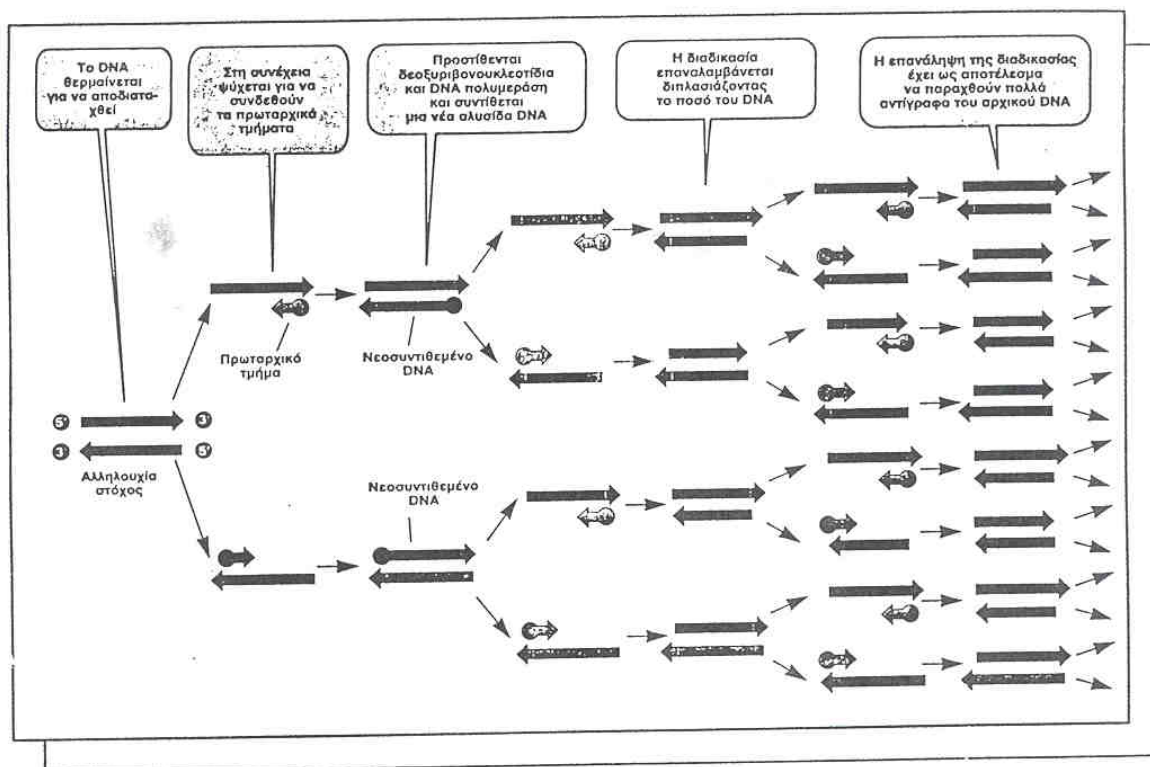
Κάθε κύκλος περιλαμβάνει τρία στάδια

1. Θερμική μετουσίωση του DNA, η οποία επιτρέπει την αποδιάταξη του δίκλωνου μορίου του DNA.
2. Προσαρμογή των εναρκτών με την αλληλουχία-στόχο του DNA.
3. Επιμήκυνση των εναρκτών με την επίδραση της Taq πολυμεράσης και σύνθεση των συμπληρωματικών αλυσίδων του DNA.

Σε όλους τους πολλαπλασιασμούς, εκτός των δειγμάτων, συστηματικά χρησιμοποιείται ένας αρνητικός μάρτυρας (χωρίς DNA *Coxiella*) που μπορεί να είναι αρνητικό αίμα, μη μολυσμένα κύτταρα ή αρνητικός κρότυνας και ένας θετικός μάρτυρας *C. burnetii*.

Η μέθοδος PCR είναι ευαίσθητη και επιτρέπει την γρήγορη ανίχνευση ειδικών περιοχών DNA που βρίσκονται σε μικρή ποσότητα στο δείγμα.

Εικόνα 1. Σχηματική απεικόνιση της τεχνικής PCR.



Εξαγωγή του DNA

1)Κύτταρα μολυσμένα με *C. burnetii*.

- Τα δείγματα μολυσμένων κυττάρων πλένονται 3 φορές με απεσταγμένο νερό και φυγοκέντριση στα 6000rpm για 5 λεπτά. Το υπερκείμενο απορρίπτεται κάθε φορά και το ίζημα επαναδιαλυτοποιείται σε απεσταγμένο νερό.
- Το ίζημα της τελευταίας φυγοκέντρωσης επαναδιαλυτοποιείται σε απεσταγμένο νερό.
- Ακολουθεί προσθήκη πρωτεϊνάσης K 20μg/ml και στη συνέχεια τα δείγματα επωάζονται στους 52⁰C για 2 ώρες.
- Μετά την επώαση, τα δείγματα, βράζονται για 10 λεπτά και τοποθετούνται στους 4⁰C μέχρι τη χρήση τους.

2) Σώμα Κρότωνα

- Οι κρότωναες συνθλίβονται και ομογενοποιούνται, κάτω από στείρες συνθήκες, σε θρεπτικό υλικό (MEM 4%).
- Η μισή ποσότητα τοποθετείται στους -80⁰C για απομόνωση, ενώ στην άλλη μισή γίνεται εξαγωγή του DNA για να χρησιμοποιηθεί στη τεχνική της PCR.
- Το σώμα του κρότωνα φυγοκεντρείται στις 8000 στροφές για 5 λεπτά.
- Αφαιρείται το υπερκείμενο.
- Το ίζημα πλένεται τρεις φορές με απεσταγμένο νερό στις 8000 στροφές για 5 λεπτά.
- Ακολουθεί προσθήκη 20μg/ml πρωτεϊνάσης K στο ίζημα.
- Τα δείγματα επωάζονται στους 52⁰C για 2 ώρες.
- Στη συνέχεια βράζονται για 10 λεπτά και τοποθετούνται στους 4⁰C μέχρι τη χρήση τους.

1) Αίμα-λευκά αιμοσφαίρια

Η εξαγωγή του DNA από αίμα ή λευκά αιμοσφαίρια γίνεται με τη χρήση του blood kit (Qiagen) σύμφωνα με το πρωτόκολλο της εταιρείας.

Αρχικός έλεγχος των δειγμάτων θα γίνει με την χρήση του ζεύγους εναρκτών CB1-CB2, οι οποίοι κωδικοποιούν μια αλληλουχία 257 ζευγών βάσεων της υπεροξειδικής δισμουτάσης της *C. burnetii*. Οι συγκεκριμένοι εναρκτές πολ/ζουν μόνο την *C. burnetii* και όχι άλλες ρικέτσιες ή άλλους μικροοργανισμούς (89, 90, 154, 158, 159). Τα δείγματα που θα βρεθούν θετικά με τους παραπάνω εναρκτές, θα εξετασθούν στη συνέχεια και με άλλα ζευγάρια ειδικών για την *C. burnetii* εναρκτών για ανίχνευση

ετερογένειας μεταξύ των απομονωθέντων στελεχών (βλέπε πίνακα στη σελίδα 77).

Υλικά-Συσκευές

- Συσκευή PCR θερμοκυκλοτή (Pelkin Elmer)
- Θάλαμος νηματικής ροής
- Στείρα μικροσωληνάρια
- Ρυθμιζόμενες μικροπιπέτες αποκλειστικής χρήσης για PCR
- Ρύγχη με φίλτρο μικροπιπετών.

Αντιδραστήρια

- Στείρο απεσταγμένο νερό
- Ρυθμιστικό διάλυμα (10x) για την Taq πολυμεράση χωρίς MgCl₂
- Νουκλεοτίδια (dNTPs)
- Ολιγονουκλεοτιδικοί εναρκτές
- Αρνητικός μάρτηρας (αίμα ή φυσιολογικά κύτταρα)
- Θετικός μάρτηρας (*C. burnetii*)
- Υπό εξέταση δείγματα

Διαδικασία

- Οι χειρισμοί γίνονται σε θάλαμο νηματικής ροής με υλικά και αντιδραστήρια αποκλειστικής χρήσης, ώστε να μειωθεί ο κίνδυνος μόλυνσης από εξωγενές DNA.
- Προετοιμάζεται το μείγμα αντίδρασης:
1μM από κάθε Primer, 100μM από κάθε dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 1,3 mM MgCl₂ και 0,05 μονάδες Taq DNA πολυμεράση.

Δείγμα	13μl
H ₂ O	83,2μl
Buffer	13μl
MgCl ₂	3,9μl
dNTPs	13μl
Pr1	1,3μl
Pr2	1,3μl
Taq	1,3μl

- Αναμιγνύονται 117μl μείγματος αντίδρασης με 13μl δείγματος DNA.

Προγραμματίζεται η συσκευή για 35 κύκλους:

94 ⁰ C/5'	35 φορές
94 ⁰ C/30''	
60 ⁰ C/30''	
72 ⁰ C/30''	
72 ⁰ C/10'	

Στο τέλος του PCR, τα προϊόντα διατηρούνται στους 4⁰C μέχρι να επιβεβαιωθεί η επιτυχία του πολ/σμού με την ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης.

ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΤΟΥ DNA

Αρχή της μεθόδου

Το DNA είναι ένα μόριο αρνητικά φορτισμένο, λόγω των φωσφορικών ομάδων που βρίσκονται στον φωσφοδιεστερικό σκελετό. Αυτό όπως και οι πρωτεΐνες όταν βρεθεί μέσα σε ένα ηλεκτρικό πεδίο κινείται προς τον θετικό πόλο με ταχύτητα που εξαρτάται από το μέγεθος του και το σχήμα του. Η τεχνική που χρησιμοποιείται είναι η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Η αγαρόζη είναι πολυσακχαρίτης που σε κατάλληλες συνθήκες δημιουργεί ένα πορώδες πήκτωμα. Η συγκέντρωση της αγαρόζης καθορίζει το μέγεθος των πόρων άρα και το μέγεθος των κομματιών DNA που μπορούν να διαχωριστούν.

Επιβεβαίωση του πολλαπλασιασμού του DNA σε πήκτωμα αγαρόζης 2%

Η επιτυχία και η ειδικότητα του πολ/μού του DNA επιβεβαιώνονται σε πήκτωμα αγαρόζης 2%. Υπολογίζεται το μέγεθος του προϊόντος του PCR με τη βοήθεια των δεικτών μοριακού βάρους. Στη συνέχεια γίνεται σύγκριση με το μέγεθος του προϊόντος του PCR του θετικού μάρτυρα *C. burnetii* (βλέπε πίνακα).

Υλικά

- Ζυγός
- Φούρνος μικροκυμάτων
- Πιπέτες
- Πηγή φωτός UV
- Φωτογραφική συσκευή

Αντιδραστήρια

- Αγαρόζη ηλεκτροφόρησης
- Βρωμιούχο αιθίδιο
- Διάλυμα χρωστικής (loading buffer) 6x:

κυανό της βρωμοφαινόλης	0,25%
κυανό του ξυλενίου	0,25%
γλυκερίνη	30%
νερό qsp	

- Ρυθμιστικό διάλυμα TAE 50X: 242 gr Tris-Base
57,1 ml glacial acetic acid
100 ml 0,5 M EDTA (pH8)
νερό qsp 1lt.
- Διάλυμα ηλεκτροφόρησης TAE 1X και βρωμιούχο αιθίδιο 0,5μg/ml
- Δείκτες μοριακού βάρους DNA (molecular weight marker)
ΦX174/Hinf I ή ΦX174/Hae III.

Διαδικασία

- Προετοιμάζεται το διάλυμα αγαρόζης 2% σε TAE 1X (η αγαρόζη διαλυτοποιείται με βρασμό)
- Προστίθεται βρωμιούχο αιθίδιο 0,5μg/ml και το διάλυμα αγαρόζης τοποθετείται στο εκμαγείο της συσκευής ηλεκτροφόρησης όπου αφήνεται να πήξει.
- Το πήκτωμα τοποθετείται στην συσκευή ηλεκτροφόρησης, στην οποία έχει προστεθεί το διάλυμα ηλεκτροφόρησης και αφαιρείται προσεκτικά η χτένα.
- Τοποθετούνται 10μl του προϊόντος της PCR σε 2 μl χρωστικής και στη συνέχεια μεταφέρονται στα πηγάδια της πηκτής.
- Μετά από μία ώρα τρεξίματος στα 100 volts, η πηκτή 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 την χαρακτηριστική μπάντα των εναρκτών που χρησιμοποιήθηκαν. Κάθε επιτυχημένος πολ/σμός εμφανίζει όμοια μπάντα μ' αυτήν του θετικού μάρτυρα *C. burnetii*.

ΤΕΧΝΙΚΗ ΤΗΣ nested PCR.

Η τεχνική της nested PCR εφαρμόστηκε για την άμεση ανίχνευση *C. burnetii* σε αίμα και buffy coat ασθενών με οξεία λοίμωξη πυρετού Q, σε αίμα αιγοπροβάτων που απέβαλαν και σε κρότωνες.

Με εφαρμογή της τεχνικής αυτής και χρησιμοποιώντας το ζευγάρι εναρκτών CB1 και CB2, οι οποίοι κωδικοποιούν μια αλληλουχία 257 ζευγών βάσεων του γονιδίου της υπεροξειδικής δισμουτάσης (Superoxide Dismutase) της *C. burnetii*, είναι δυνατή η ανίχνευση του μικροοργανισμού όταν η συγκέντρωσή του στο δείγμα είναι από 10 μικροοργανισμούς και πάνω (κυτταροκαλλιέργειες) (158, 159). Επειδή στα κλινικά δείγματα η *C. burnetii* μπορεί να υπάρξει σε μικρότερη συγκέντρωση, η ανίχνευση της γίνεται με την χρήση ειδικών εναρκτών και τη τεχνική της nested PCR, η οποία είναι ικανή να ανιχνεύσει από ένα μικροοργανισμό και πάνω (155, 190).

Η μέθοδος περιλαμβάνει δύο επαναλαμβανόμενα PCR και ολιγονουκλεοτιδικούς εναρκτές (primers), οι οποίοι προέρχονται από ομόλογες περιοχές των πλασμιδίων οξείας και χρόνιας λοίμωξης της *C. burnetii*. Για το πρώτο PCR το ζευγάρι εναρκτών είναι οι Hfrag1 - Hfrag2 οι οποίοι κωδικοποιούν μια αλληλουχία 508 ζευγών βάσεων. Το προϊόν από τη πρώτη PCR που τις περισσότερες φορές είναι αρνητικό (δεν δίνει μπάντα σε πηκτική αγαρόζης), πολλαπλασιάζεται με μία δεύτερη PCR χρησιμοποιώντας το ζευγάρι εναρκτών HF1 - HF2 οι οποίοι κωδικοποιούν μια αλληλουχία 183 ζευγών βάσεων (190). Οι εναρκτές και στις δύο PCR προσδένονται στα άκρα του τμήματος του DNA που θα αντιγραφεί και μετά από 35 επαναλαμβανόμενους κύκλους πολ/μού του DNA για κάθε PCR παίρνουμε το επιθυμητό αποτέλεσμα.

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ *C. burnetii*

ΤΕΧΝΙΚΗ ΤΩΝ shell-vials.

Αρχή της μεθόδου

Η τεχνική περιλαμβάνει τη φυγοκέντρηση της στοιβάδας των λευκών αιμοσφαιρίων, της αιμολέμφου ή του σώματος του κρότωνα σ' ένα σωλήνα φυγοκέντρησης, τύπου Shell-Vial, που περιέχει ένα μικρό υάλινο δίσκο όπου έχει επιστρωθεί ταπήτιο κυττάρων HEL (διπλοειδή κύτταρα μορφής ινοβλαστών) ή Vero κύτταρα (νεφρικά κύτταρα πιθήκου) (130).

Προετοιμασία κυτταρικής σειράς στα Shell-Vials

Διαδικασία

- Οι χειρισμοί γίνονται σε θάλαμο νηματικής ροής ώστε να μειωθεί ο κίνδυνος επιμόλυνσης.
- Θρυψινοποιείται η φλάσκα με τα HEL ή τα Vero κύτταρα και διανέμεται σε κάθε Shell-Vials 1ml κυτταρικού υλικού (σελ.).
- Τα Shell-Vials τοποθετούνται με ημιανοιχτό καπάκι σε κλίβανο 37°C και ατμόσφαιρα 5% CO₂ για διάστημα 3 ημερών μέχρι τον σχηματισμό κυτταρικού ταπητίου.

Πρωτόκολλο απομόνωσης

Υλικά και συσκευές

- Στείροι σωλήνες φυγοκέντρησης (Shell-Vials), επίπεδου πυθμένα, 3,7ml
- Στείρες πιπέτες

- Στείρες λαβίδες
- Φυγόκεντρος
- θάλαμος κάθετης νηματικής ροής
- Επωαστικός κλίβανος 37°C, 5% CO₂
- Υδατόλουτρο
- Μικροσκόπιο ανάστροφης φάσης

Θρεπτικά υλικά και αντιβιοτικά

- MEM 4%: 500 ml MEM-EARLE χωρίς γλουταμίνη
5 ml γλουταμίνη (2mM)
20 ml ορού εμβρύου μόσχου
(προηγείται αδρανοποίηση του ορού στους 56°C για 30 λεπτά).
- sulphamethoxazole 50 µg/ml
- gentamycin 200 µg/ml
- amphotericin B 1,5 µg/ml

Απομόνωση από Buffy coat.

Διαδικασία

- Απορρίπτεται το υπερκείμενο από 2 shell vial με Hel ή Vero κύτταρα.
- 0,5ml από κάθε δείγμα λευκών αιμοσφαιρίων αναμειγμένο με 0,5ml θρεπτικού υλικού ενοφθαλμίζονται σε κάθε Shell-Vial.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση των Shell-Vials για μια ώρα, στα 700g και 22°C.

Απομόνωση από Κρότωνα

1) Απομόνωση από Αιμόλεμφο.

Διαδικασία

- Κόβεται το μπροστά αριστερό πόδι του κρότωνα ώστε να απελευθερωθεί αιμόλεμφος.
- Τοποθετείται η σταγόνα της αιμόλεμφος σε 300µl MEM στο οποίο έχουν προσθεθεί 50µg/ml sulphamethoxazole, 200µg/ml gentamycin, 1,5µg/ml amphotericin B και αναμιγνύεται.
- Απορρίπτεται το υπερκείμενο από 2 shell vial με Hel ή Vero κύτταρα και μεταφέρονται 150 µl του μίγματος αιμόλεμφος σε κάθε shell vial.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση των Shell-Vials για μια ώρα, στα 700g και 22°C.

2) Απομόνωση από σώμα κρότωνα.

Διαδικασία

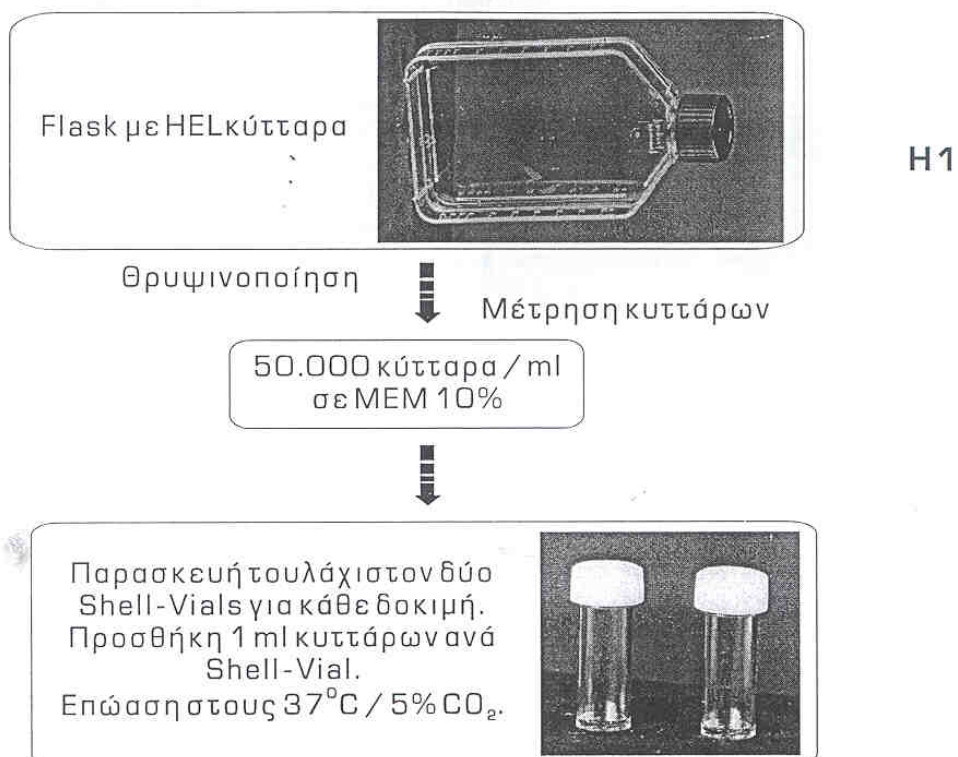
-Μετά την απολύμανση του κρότωνα σε ιοδιούχο αλκοόλη και την πλύση του σε στείρο νερό, τοποθετείται σε περίπου 500 μl MEM με αντιβιοτικά (όπως παραπάνω) και συνθλίβεται. Απ'αυτά 200 μl περίπου μεταφέρονται σε κάθε shell vial για απομόνωση. Ακολουθεί φυγοκέντρηση των Shell-Vials για μια ώρα, στα 700g και 22⁰C.

Και στις 3 παραπάνω περιπτώσεις μετά τη φυγοκέντρηση του δείγματος ακολουθεί προσθήκη 1ml νέου θρεπτικού υλικού σε κάθε Shell-Vial και επώαση του στους 37⁰C.

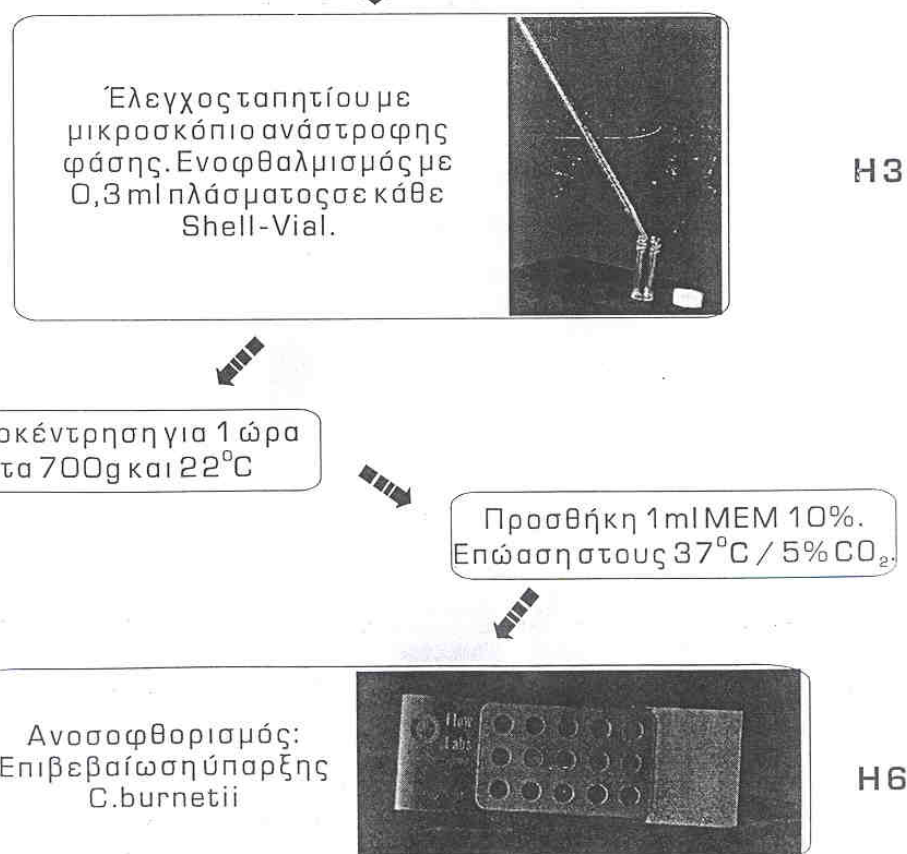
- Η επιτυχία της απομόνωσης ελέγχεται με ανοσοφθορισμό ή χρώση Gimenez κάθε 7 ημέρες.
- Μετά την παρατήρηση της *Coxiella* προχωρούμε στην θρυψινοποίηση των θετικών Shell-Vials.

Πρωτόκολλο Απομόνωσης και Καλλιέργειας της *C.burnetii* με την Τεχνική των Shell-Vials σε Κύτταρα HEL.

A) Προετοιμασία κυττάρων HEL στα Shell-Vials.

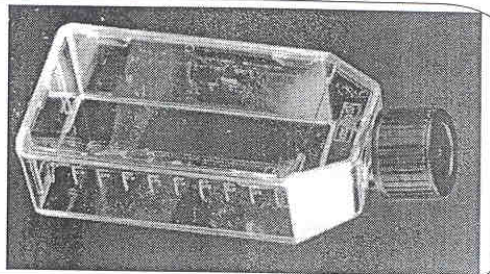


B) Απομόνωση



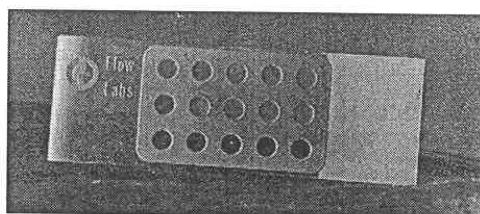
β) Ανακαλλιέργεια των θετικών Shell-Vials σε flasks με πλήρες ταπήτιο HEL κυττάρων για την παραγωγή της *C.burnetii*.

Θρυψινοποίηση των Shell-Vials και ενοφθαλμισμός των flasks. Επώαση για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου.



Προσθήκη MEM 10% και επώαση στους 37°C / 5% CO₂.

Gimenez, Ανοσοφθορισμός



H12

(+)

Παρατηρείται η κυτταροπαθογόνος δράση της *C.burnetii*.

H20

ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ

Υλικά

-Θρεπτικό υλικό: MEM 4% για τα κύτταρα L929 και Vero. MEM 10% για τα κύτταρα HEL.

MEM4%

4% Ορού Εμβρύου Μόσχου
2mM Glutamine

MEM 10%

10% Ορού Εμβρύου Μόσχου
2Mm Glutamine

-Θρυψίνη-EDTA:

0,05% Θρυψίνη

0,02% EDTA σε PBS χωρίς Ca, Mg και pH 7,2.

-Διάλυμα Rinaldini:

NaCl	6,8 gr
KCl	0,4 gr
NaHCO ₃	2,2 gr
Glucose	1 gr
Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O	0,156 gr
Κόκκινο της Φαινόλης	1 mg
Απεσταγμένο H ₂ O qsp	1 litro

Το διάλυμα αποστειρώνεται σε αυτόκαυστο και διατηρείται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

-Φλάσκες καλλιέργειας

-Στείρες πιπέτες

-Σωλήνες φυγοκέντρωσης

-Γυάλινες σφαίρες

-Αντικειμενοφόρες πλάκες

Όργανα

-Μικροσκόπιο ανάστροφης φάσης

-Κλίβανος 37°C, 5% CO₂

-Υδατόλουτρο 37°C

Διαδικασία

Οι χειρισμοί γίνονται μέσα σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής. Τα χρησιμοποιούμενα υλικά είναι στείρα και μιας χρήσης. Τουλάχιστον μισή ώρα πριν τη χρήση τους τοποθετούνται σε υδατόλουτρο 37°C.

A) Θρυψινοποίηση φυσιολογικών Κυττάρων

- Ελέγχεται η ανάπτυξη του κυτταρικού τάπητα σε μικροσκόπιο ανάστροφης φάσης.
- Απομακρύνεται το θρεπτικό υλικό από την flask.
- Ακολουθεί προσθήκη διαλύματος Rinaldini (25, 10 και 5ml για μεγάλη, μεσαία και μικρή flask αντίστοιχα).
- Η flask επώζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 5' ώστε να απομακρυνθεί ο ορός εμβρύου μόσχου, ο οποίος αναστέλλει την δράση της θρυψίνης. (Επανάληψη για άλλη μία φορά).
- Απομακρύνεται το διάλυμα Rinaldini και προστίθενται 5, 2 και 0,5ml θρυψίνης για μεγάλη, μεσαία και μικρή flask αντίστοιχα.
- Τοποθετείται η flask στους 37°C για 3' ώστε να αποκολληθεί ο κυτταρικός τάπητας.
- Το κυτταρικό εναιώρημα ανακτάται με 10ml θρεπτικού υλικού και μοιράζεται ισόποσα σε τρεις flasks.
- Ακολουθεί προσθήκη θρεπτικού υλικού ώστε ο τελικός όγκος να είναι 35, 15 και 7ml για μεγάλη, μεσαία και μικρή flask αντίστοιχα.
- Οι flasks επώζονται στους 37°C, 5% CO₂ με ημιανοιχτό καπάκι για 24 ώρες. Μπορούν να παραμείνουν στους 37°C και να θρυψινοποιηθούν εκ νέου μετά από 2 ή 3 ημέρες. (Όταν το κυτταρικό ταπήτιο είναι πλήρες).

B) Θρυψινοποίηση των θετικών shell vials.

Υλικά

- Hunks
- Θρυψίνη-EDTA
- Θρεπτικό υλικό (MEM 4%)

Διαδικασία

- Απορρίπτεται το υπερκείμενο του shell vial.
- Το ταπήτιο πλένεται με Hunks.
- Προστίθενται 0,2 ml θρυψίνης.
- Ακολουθεί επώαση λίγων λεπτών στους 37°C.
- Το shell vial αναδεύεται έντονα, ώστε να αποκολληθούν τα κύτταρα.
- Προστίθενται 0.8 ml θρεπτικού υλικού 4%.
- Το εναιώρημα μεταφέρεται σε φλάσκα των 25 cm², που περιέχει 5

ml θρεπτικού υλικού 4%.

- Η φλάντσα επωάζεται στους 37⁰C/5%CO₂ με ημιανοιχτό το καπάκι και μετά 24 ώρες στους 35⁰C με κλειστό το καπάκι.
- Ακολουθεί ανίχνευση της *C. burnetii* με την χρώση Gimenez και τη τεχνική της nested-PCR μετά από 7, 12 και 20 ημέρες.

Γ) Μόλυνση φυσιολογικών κυττάρων με *C. burnetii*.

- Ελέγχεται η ανάπτυξη του κυτταρικού τάπητα στην flask με τα φυσιολογικά κύτταρα σε μικροσκόπιο ανάστροφης φάσης.
- Ελέγχεται ο βαθμός μόλυνσης της μολυσμένης με *C. burnetii* καλλιέργειας με την βοήθεια της χρώσης Gimenez.
- Αν ο βαθμός μόλυνσης είναι αρκετός (80-90% των κυττάρων να είναι μολυσμένα) τότε:

α) Θρυψινοποιείται η μολυσμένη καλλιέργεια και το υλικό διανέμεται σε τρεις κενές από φυσιολογικά κύτταρα flasks. Προστίθεται το κατάλληλο θρεπτικό υλικό και οι flasks τοποθετούνται στους 37 ή 35⁰C.

Με το υπερκείμενο της μολυσμένης με *C. burnetii* καλλιέργειας μπορούν να μολυθούν από τρεις έως πέντε φυσιολογικές καλλιέργειες ανάλογα με την ποσότητα του υπερκειμένου (δηλαδή εάν η flask είναι μικρή, μεσαία ή μεγάλη). Μετά την επώαση των flasks σε θερμοκρασία δωματίου για μία ώρα ακολουθεί προσθήκη του κατάλληλου θρεπτικού υλικού και η μεταφορά τους σε κλίβανο θερμοκρασίας 37 ή 35⁰C.

ή

β) Εισάγονται αποστειρωμένες γυάλινες σφαίρες στη μολυσμένη με *C. burnetii* καλλιέργεια. Αναδεύονται έντονα οι flasks μέχρι την πλήρη αποκόλληση των κυττάρων. Με το κυτταρικό αυτό υλικό είναι δυνατόν να μολυνθούν από τρεις έως πέντε φυσιολογικές καλλιέργειες.

Οι flasks επωάζονται σε θερμοκρασία δωματίου για μία ώρα, προστίθεται στη συνέχεια το κατάλληλο θρεπτικό υλικό και τοποθετούνται σε θερμοκρασία 37 ή 35⁰C.

Δ) Αλλαγή θρεπτικού υλικού στις μολυσμένες καλλιέργειες.

Μετά από 5 ή 7 ημέρες ενοφθαλμίσματος των καλλιεργειών, με *C. burnetii*, ακολουθεί αλλαγή του θρεπτικού υλικού στις flasks. Απορίπτεται το θρεπτικό υλικό από την καλλιέργεια και προστίθεται καινούργιο. Οι flasks επωάζονται ξανά στους 37 ή 35⁰C.

Ψύξη μολυσμένων κυττάρων.

Η ψύξη μολυσμένων με *C. burnetii* κυττάρων γίνεται ως εξής:

- Ελέγχεται και εκτιμάται ο βαθμός μόλυνσης της καλλιέργειας με τη χρήση της χρώσης Gimenez.

- Εισάγονται αποστειρωμένες γυάλινες σφαίρες στην μολυσμένη flask.
- Ακολουθεί έντονη ανάδευση έτσι ώστε να γίνει πλήρης αποκόλληση των κυττάρων από την flask.
- Το κυτταρικό υλικό διανέμεται σε tubes Nunk και τοποθετείται στους -80°C .

Ψύξη φυσιολογικών κυττάρων

Η ψύξη φυσιολογικών κυττάρων γίνεται ως εξής:

- Απομακρύνεται το υπερκείμενο από την καλλιέργεια.
- Πλένεται ο κυτταρικός τάπητας με διάλυμα Rinaldini.
- Προστίθεται θρυψίνη και η φλάσκα επώζεται στους 37°C μέχρις ότου αποκολληθούν τα κύτταρα από την flask.
- Το κυτταρικό εναιώρημα ανακτάται με 5ml διαλύματος, το οποίο περιέχει 75% θρεπτικό υλικό, 15% siero fetal και 10% DMSO.
- Διανέμεται σε σωλήνες cryo tubes από 1,5ml στο καθένα.
- Οι σωλήνες ψύχονται και συντηρούνται στο υγρό άζωτο.

ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ

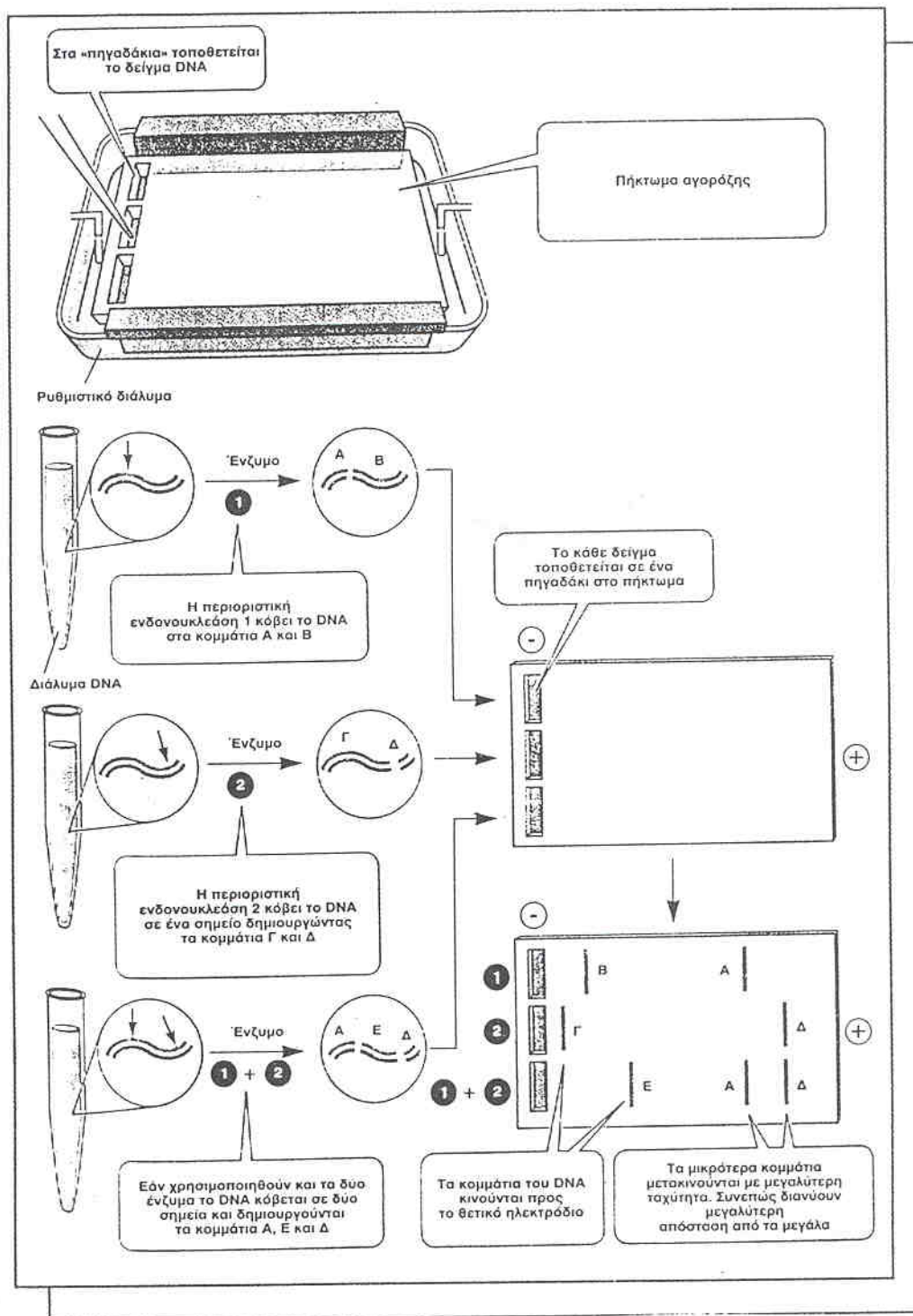
ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΣΤΑ ΠΡΟΙΟΝΤΑ ΤΟΥ ΓΕΝΩΜΙΚΟΥ ΠΟΛ/ΣΜΟΥ ΜΕ ΠΕΡΙΟΡΙΣΤΙΚΑ ΕΝΖΥΜΑ (PCR-RFLP) .

Αρχή της μεθόδου

Το DNA "κόβεται" σε μικρότερα κλάσματα με μια ή συνδυασμό περισσότερων περιοριστικών ενδονουκλεασών και το μίγμα των κομματιών αυτών τοποθετείται σε ένα πήκτωμα αγαρόζης, στα άκρα του οποίου εφαρμόζεται ηλεκτρικό πεδίο. Το DNA μετακινείται προς την άνοδο, με τα μικρότερα κλάσματα να κινούνται γρηγορότερα και τα μεγαλύτερα αργότερα. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, γίνεται χρώση των νουκλεϊκών οξέων και φωτογράφηση τους.

Η επίδραση στα προϊόντα πολ/μού με περιοριστικά ένζυμα παρέχει κατατομές κλασμάτων DNA που συγκρινόμενες με τις αντίστοιχες των στελεχών αναφοράς, συμβάλλει ουσιαστικά στην ταυτοποίηση του νέου στελέχους.

Εικόνα 2. Σχηματική απεικόνιση της τεχνικής RFLP.



Έγινε επίδραση στο προϊόν της PCR, μετά από χρήση των εναρκτών Cb1-Cb2, με τα περιοριστικά ένζυμα AluI και TaqI. Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης 8% ή σε πηκτική αγορόζης 3% LMP (Low Melting Point) και χρώση της πηκτικής σε βρωμιούχο αιθίδιο. Το ειδικό προφίλ κατατομής των κλασμάτων του DNA καθορίζει τη γενοτυπική ταυτοποίηση του στελέχους της *C. burnetii*.

Υλικά

- Περιοριστικά ένζυμα AluI και TaqI με τα αντίστοιχα ρυθμιστικά διαλύματα (BioLabs, New England, MA, USA).
- Υδατόλουτρο

Διαδικασία

Όλοι οι χειρισμοί γίνονται μέσα σε πάγο.

- Προετοιμασία του διαλύματος αντίδρασης:

περιοριστικό ένζυμο	1,0 μl
αντίστοιχο ρυθμιστικό διάλυμα	2,7 μl
δείγμα	23,3 μl
- Το διάλυμα αντίδρασης επώζεται για 2 ώρες στην κατάλληλη για κάθε ένζυμο θερμοκρασία (37⁰C για το AluI και 65⁰C για το TaqI).
- Τα δείγματα διατηρούνται στους 4⁰C, μέχρι την ηλεκτροφόρηση τους.

Ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμίδης (PAGE)*Υλικά*

- Συσκευή κάθετης ηλεκτροφόρησης
- Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης TAE 1X
- Διάλυμα ακρυλαμίδης 30%:

Ακρυλαμίδα	30gr
N,N'methylenbisacrylamide	4gr
Νερό qsp	100ml
- Το διάλυμα φιλτράρεται και αποθηκεύεται σε σκοτεινόχρωμο φιαλίδιο στους 4⁰C για 2 μήνες.
- TEMED
- Ammonium Persulfate 10%
- Loading Buffer 6x:

Μπλέ της βρωμοφαινόλης	0,25%
Κυανό του ξυλενίου	0,25%
Ficoll	15%
Νερό qsp	
- Δείκτες μοριακού βάρους DNA (molecular weight marker)

Διαδικασία

- Τα τζάμια πλένονται με ζεστό νερό και σαπούνι και ξεπλένονται με απιονισμένο νερό, και στη συνέχεια με αλκοόλη.
- Συναρμολογείται το σύστημα των τζαμιών
- Προετοιμάζεται η πηκτή 8%:

ακρυλαμίδα 30%	13,3 ml
νερό	26,35ml

TAE 10χ	10 ml
Ammonium Persulfate 10%	350 μl
TEMED	17,5 μl

- Εισάγεται η πηκτική και η χιτένα στη συσκευή, αποφεύγοντας το σχηματισμό φυσαλίδων
- Αφήνουμε την πηκτική σε θερμοκρασία δωματίου για να γίνει ο πολυμερισμός (περίπου 1 ώρα)
- Αφαιρείται προσεκτικά η χιτένα
- Ξεπλένεται η επάνω και η κάτω επιφάνεια της πηκτικής με νερό ώστε να μετακινηθεί η μη πολυμερισμένη ακρυλαμίδα
- Τοποθετείται η πηκτική στη συσκευή
- Τα δείγματα αραιώνονται (1/5) με τη χρωστική
- Ρυθμίζεται η τάση στην αρχή στα 80 volts και μετά από μισή ώρα στα 150 volts.
- Όταν το κυανό της βρωμοφαινόλης φτάσει στο τέλος της πηκτικής, τερματίζεται η ηλεκτροφόρηση.
- Η πηκτική μεταφέρεται σε διάλυμα TAE 1χ και βρωμιούχο αιθίδιο (0,5μg/ml) για 30 λεπτά.
- Στη συνέχεια τοποθετείται σε πηγή υπεριώδους ακτινοβολίας (UV).

Φωτογραφίζεται με μηχανή polaroid για τη παρατήρηση των αποτελεσμάτων.

ΕΛΕΓΧΟΣ ΥΠΑΡΞΗΣ ΠΛΑΣΜΙΔΙΩΝ *C. burnetii* ΜΕ ΤΗΝ ΧΡΗΣΗ ΤΗΣ PCR.

Όπως έχει αναφερθεί στην εισαγωγή (σελίδα) η *C. burnetii* μπορεί να περιέχει το πλασμίδιο QpH1 εάν βρίσκεται σε οξεία λοίμωξη πυρετού Q ή το πλασμίδιο QpRS εάν βρίσκεται σε χρόνια λοίμωξη. Μπορούν να υπάρξουν στελέχη *C. burnetii*, απομονωθέντα από χρόνια λοίμωξη, που να μην περιέχουν πλασμίδιο αλλά να έχουν την αλληλουχία του πλασμιδίου QpRS ενσωματωμένη στο γενωμικό DNA τους.

Οι εναρκτές QpH11 - QpH12, κωδικοποιούν μια αλληλουχία 1.042 ζευγών βάσεων του πλασμιδιακού γονιδίου CbhE' το οποίο ανακαλύφθηκε πρόσφατα σε στελέχη *C. burnetii* οξείας λοίμωξης πυρετού Q (190).

Οι εναρκτές QpRS01 - QpRS02, κωδικοποιούν μια αλληλουχία 363 ζευγών βάσεων ενός πλασμιδιακού γονιδίου το οποίο ανακαλύφθηκε σε στελέχη *C. burnetii* χρόνιας λοίμωξης πυρετού Q (190).

Η διαδικασία της μεθόδου της PCR αναγράφεται στη σελίδα και η αλληλουχία των εναρκτών που χρησιμοποιήθηκαν στον πίνακα που ακολουθεί.

Πίνακας 5. Αλληλουχία των εναρκτιών που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη ανίχνευσης *C. burnetii*.

Εναρκτιές	Αλληλουχία (ζευγάρια βάσεων)
C.B.1 ^a	5'-ACT CAA CGC ACT GGA ACC GC-3'
C.B.2 ^a	5'-TAG CTG AAG CCA ATT CGC C-3' (257bp)
G4131 ^b	5'-CTG ATG TGT CAA GTA ATG TCG G-3'
G4132 ^b	5'-GTT CAT GGT TAT GAT TCT GCG-3' (183 bp)
16S1 ^c	5'-CTC CTG GCG GCG AGA GTG GC-3'
16S2N ^c	5'-GTT AGC TTC GCT ACT AAG AAG GGA ACT TCC C-3' (779bp)
QpRSO1 ^d	5'-CTC GTA CCC AAA GAC TAT GAA TAT ATC C-3'
QpRSO2 ^d	5'-CAC ATT GGG TAT CGT ACT GTC CCT-3' (363bp)
QpH11 ^d	5'-TGA CAA ATA GAA TTT CTT CAT TTT GAT G-3'
QpH12 ^d	5'-GCT TAT TTT CTT CCT CGA ATC TAT GAA T-3' (1.042bp)
Hfrag1 ^e	5'-ATT GCT ATC ACT GAG GGT GAC G-3'
Hfrag2 ^e	5'-CTG ACG AAG AAG CAG CAT TAG C-3' (508 bp)
HF1 ^e	5'-TCC TAA ACA AGT GAT GGT CTC C-3'
HF2 ^e	5'-TTC GCA GAA GTC AGC TAT GC-3' (183 bp)

^a: Εναρκτιές από το γονίδιο της υπεροξειδικής δισμουτάσης.

^b: Γενωμικοί εναρκτιές της *C. burnetii*.

^c: Εναρκτιές από την αλληλουχία του 16srRNA.

^d: Πλασμιδιακοί εναρκτιές χρόνιας και οξειάς φάσης.

^e: Πλασμιδιακοί εναρκτιές για το nested PCR.

ΜΕΡΟΣ ΔΕΥΤΕΡΟ

ΜΕΛΕΤΗ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ ΤΗΣ *C. burnetii* ΣΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ.

Γενικά

Η *C. burnetii* είναι ένα υποχρεωτικά ενδοκυττάριο βακτήριο. Για τη μελέτη ευαισθησίας της στα αντιβιοτικά δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν οι τεχνικές των εξωκυττάρων βακτηρίων.

Για το λόγο αυτό:

1. Στη περίπτωση μελέτης της βακτηριοκτόνου δράσης του αντιβιοτικού, υπολογίζεται ο τίτλος της *C. burnetii* με τη μέθοδο των shell vials και του άμεσου ανοσοφθορισμού μετά από 24 ώρες επώασης με το αντιβιοτικό.

Το εξεταζόμενο αντιβιοτικό θα έχει **βακτηριοκτόνο δράση** εάν ο τίτλος των βακτηρίων της *C. burnetii* μετά την επώαση τους για 24 ώρες με το αντιβιοτικό έχει ελαττωθεί κατά 3 ή 4 φορές, από τον αρχικό τίτλο.

2. Στη περίπτωση μελέτης της βακτηριοστατικής δράσης του αντιβιοτικού, υπολογίζεται η αραίωση της *C. burnetii* που μολύνει 30-50% των φυσιολογικών κυττάρων μετά από 6 ημέρες επώασης, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο των shell vials και του άμεσου ανοσοφθορισμού.

M.I.C.: Η μικρότερη συγκέντρωση του αντιβιοτικού στην οποία δεν εμφανίζεται ανάπτυξη του βακτηρίου ή εμφανίζονται ελάχιστα ενδοκυττάρια βακτήρια.

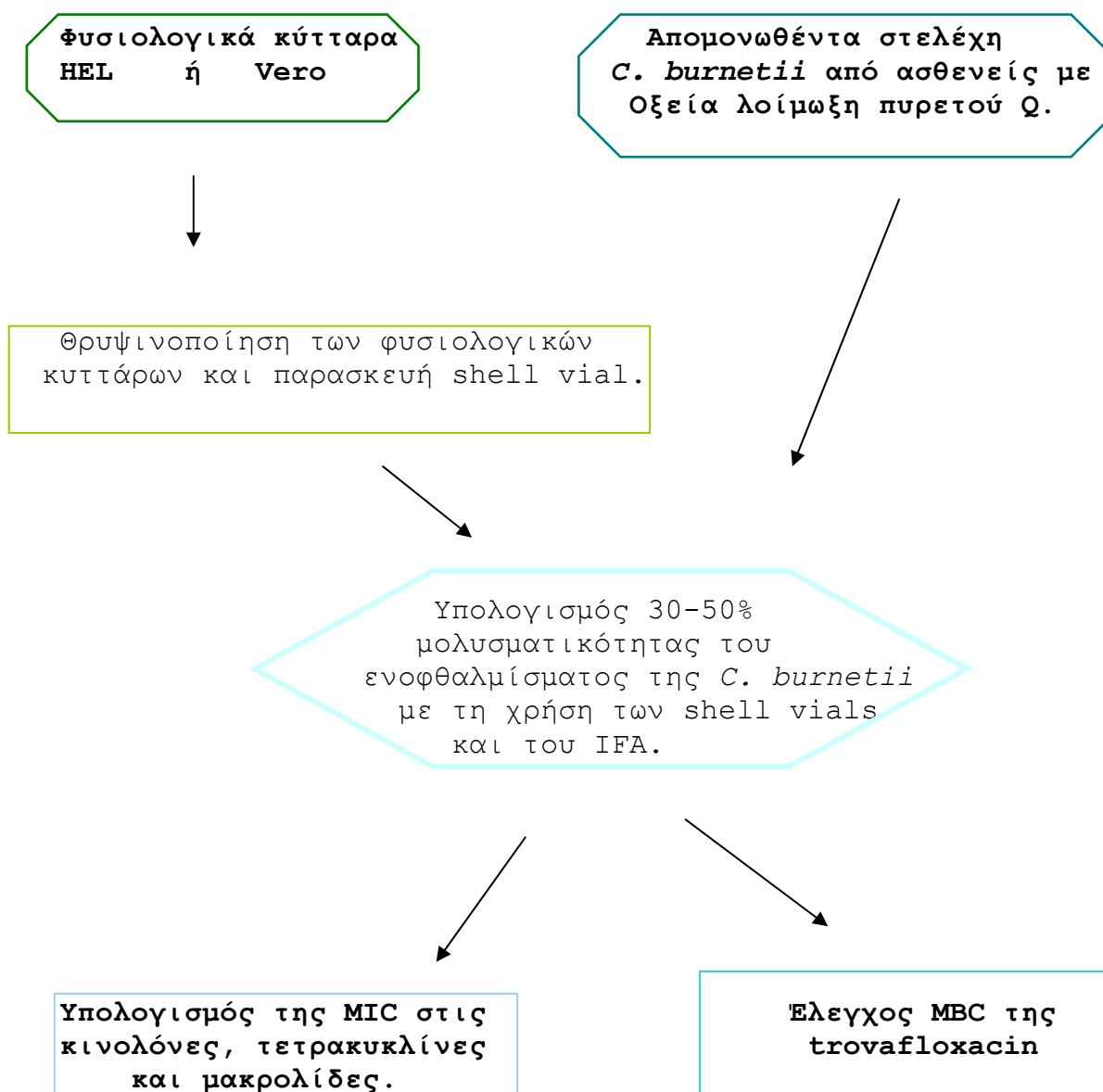
Το στέλεχος της *C. burnetii* χαρακτηρίζεται:

- **ενδιάμεσης ευαισθησίας (I)** εάν παρουσία αντιβιοτικού μπορεί να μολύνει 10% των κυττάρων της καλλιέργειας.
 - **ανθεκτικό (R)** όταν παρουσία αντιβιοτικού μπορεί να μολύνει 30-50% των κυττάρων της καλλιέργειας και
 - **ευαίσθητο (S)** εάν δεν εμφανίζεται ενδοκυττάρια ανάπτυξη της *C. burnetii*. Παρατηρούνται μόνο τα εξωκυττάρια βακτήρια που ενοφθαλμίστηκαν.
- Σαν θετικός μάρτυρας χρησιμοποιείται η αραίωση της *C. burnetii* που μολύνει 30-50% των φυσιολογικών κυττάρων της καλλιέργειας μετά από 6 ημέρες επώασης. Με την ίδια αραίωση μολύνονται και τα shell vials που θα χρησιμοποιηθούν στη μελέτη της δράσης του αντιβιοτικού.

- Σαν αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιούνται φυσιολογικά κύτταρα καλλιέργειας.

Στη παρούσα μελέτη ελέγχθηκε η *in vitro* ευαισθησία των 9 απομονωθέντων στελεχών *C. burnetii* από ασθενή με οξεία λοίμωξη πυρετού Q και των δύο στελεχών αναφοράς Nine Mile (οξείας λοίμωξης) και Q212 (χρόνιας λοίμωξης) στα αντιβιοτικά: *refloxacin*, *ofloxacin*, *ciprofloxacin*, *trovafloxacin*, *clarithromycin* και *vibramycin* χρησιμοποιώντας την τεχνική των *shell vials* και του άμεσου ανοσοφθορισμού. Ταυτόχρονα μελετήθηκε η βακτηριοκτόνος δράση της *trovafloxacin*, μια καινούργια κινολόνη, στα στελέχη αναφοράς Nine Mile και Q212.

Το παρακάτω σχήμα δείχνει την στρατηγική που ακολουθήθηκε:



ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΜΙC.

Υλικά

- Αντιβιοτικά: πεφλοξασίνη, σιπροφλοξασίνη, οφλοξασίνη, τροβαφλοξασίνη, τετρακυκλίνη, κλαριθρομικίνη.
Η συγκέντρωση των αντιβιοτικών που θα χρησιμοποιηθούν εκφράζεται σε µg/ml.
- MEM 4%.
- Shell vials με έτοιμο τάπητα Vero κυττάρων.
- Ενοφθάλμισμα βακτηρίων *C. burnetii*.

Προετοιμασία της κυτταρικής σειράς στα Shell vials

- Θρυψινοποιείται μία φλάσκα με Vero κύτταρα.
- Το κυτταρικό εναιώρημα συλλέγεται σε MEM 4%.
- Στη συνέχεια διανέμεται από 1ml σε κάθε Shell vial.
- Τα Shell vials επώζονται στους 37°C, 5% CO₂ με ημιανοιχτό καπάκι για 3 ή 4 ημέρες.

Προετοιμασία του ενοφθαλμίσματος.

- Γίνεται δειγματοληψία κυττάρων και υπερκειμένου από την μολυσμένη καλλιέργεια.
- Ελέγχεται ο βαθμός μόλυνσης χρησιμοποιώντας τη χρώση Gimenez.
- Στις 100% μολυσμένες καλλιέργειες, εισάγονται αποστειρωμένες γυάλινες σφαίρες.
- Αναδεύονται έντονα ώστε να γίνει πλήρης αποκόλληση των κυττάρων από τη flask.
- Το κυτταρικό εναιώρημα μεταφέρεται σε υγρό άζωτο-37°C τρεις φορές για την καταστροφή των κυττάρων ξενιστών και την ελευθέρωση της *C. burnetii*.
- Στη συνέχεια το υλικό φυγοκεντρείται στις 2000 στροφές για 10 λεπτά.
- Τοποθετείται το υπερκείμενο σε καθαρό σωλήνα και ξανά φυγοκεντρείται στις 10000 στροφές για 15 λεπτά.
- Το ίζημα ομογενοποιείται σε θρεπτικό υλικό MEM 4%.
- Τα βακτήρια *C. burnetii* αραιώνονται από 10⁻¹ έως 10⁻⁹ σε MEM 4%.
- Στη συνέχεια μολύνονται 2 τουλάχιστον Shell Vials με 1ml από κάθε αραιώση.
- Τα shell vials επώζονται στους 37°C και σε κλίβανο 5% Co₂ για 6 ημέρες.

Άμεσος Ανοσοφθορισμός

Με τη μέθοδο ανοσοφθορισμού υπολογίζεται η ποσότητα της *C. burnetii*, που θα μας δώσει 30-50% μολυσμένων κυττάρων μετά 6 ημέρες επώασης.

- Λαμβάνονται οι καλυπτρίδες όπου έχουν αναπτυχθεί τα μολυσμένα κύτταρα, όπως επίσης μη μολυσμένα κύτταρα σαν μάρτυρες.
 - Γίνεται μονιμοποίηση σε ακετόνη επί 10 λεπτά.
 - Επικαλύπτεται το παρασκεύασμα με ορό ασθενών με υψηλούς τίτλους αντισωμάτων έναντι της *C. burnetii*.
 - Οι καλυπτρίδες επωάζονται για 30 λεπτά στους 37°C με υγρασία.
 - Στη συνέχεια πλένονται με PBS.
 - Το παρασκεύασμα επικαλύπτεται με αντί ανθρώπειο ορό σεσημασμένο με φλουοροσκεΐνη.
 - Επωάζονται για 30 λεπτά στους 37°C με υγρασία.
 - Στη συνέχεια εξετάζονται σε μικροσκόπιο φθορισμού.
- Η τεχνική αναγράφεται πιο αναλυτικά στη σελίδα 58.

Υπολογισμός της MIC με τη χρήση της τεχνικής των shell vials και του άμεσου ανοσοφθορισμού.

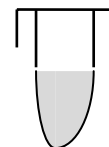
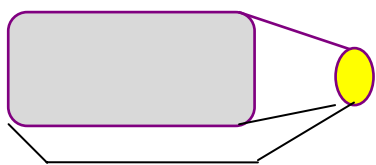
- Επιβεβαιώνεται η συνέχεια του κυτταρικού τάπητα στα shell vials σε μικροσκόπιο ανάστροφης φάσης.
- Απομακρύνεται το θρεπτικό υλικό από κάθε shell vial.
- Στη συνέχεια μολύνονται τουλάχιστον 2 Shell Vials με 0,9 ml από την κατάλληλη αραιώση ενοφθαλμίσματος (30-50% μολυσματικότητας).
- Τα αντιβιοτικά αραιώνονται σε MEM 4% από 0,025-16μg/ml.
- Προστίθενται 0,1 ml αντιβιοτικού από κάθε αραιώση στο αντίστοιχο Shell Vial.
- Μετά 6 ημέρες επώασης στους 37°C και σε κλίβανο 5% CO₂, ο αριθμός των μολυσμένων με *C. burnetii* κυττάρων καθορίζεται με τη μέθοδο του άμεσου ανοσοφθορισμού (βλέπε σελ. 58).

Σε κάθε δοκιμή υπάρχουν:

- 2 μολυσμένα με *C. burnetii* shell vials για κάθε συγκέντρωση αντιβιοτικού.
- 2 μολυσμένα με *C. burnetii* shell vials χωρίς αντιβιοτικό
- 2 shell vials φυσιολογικών κυττάρων
- 2 shell vials φυσιολογικών κυττάρων και την προσθήκη της μεγαλύτερης συγκέντρωσης του αντιβιοτικού.

ΒΑΚΤΗΡΙΟΣΤΑΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ (M.I.C.)

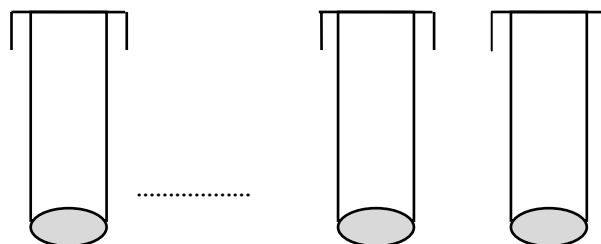
A) Προετοιμασία των shell-vials



Θρυψινοποίηση.
Το κυτταρικό εναιώρημα
συλλέγεται σε 12ml MEM

HEL ή VERO
Κύτταρα

1ml κυττάρων
σε κάθε shell-vial

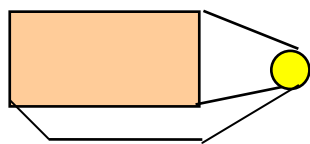


Σύνολον 12 shell-vials

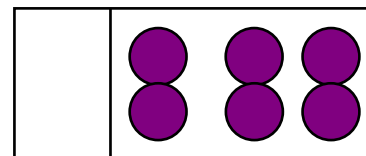
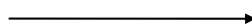
Τα shell-vials επάζονται στους 37°C, 5% CO₂
με ημιανοιχτό καπάκι για 3 ή 4 ημέρες

B) Προετοιμασία του ενοφθαλμίσματος

Εκτιμάται ο βαθμός μόλυνσης των βακτηρίων *C. burnetii*.



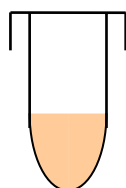
Γίνεται δειγματοληψία
κυττάρων και υπερκείμενου



Vero κύτταρα μολυσμένα
με *C. burnetii*

Gimenez: 90-100%
μολυσμένα κύτταρα

↓ Θρυψινοποίηση



Ομογενοποίηση
του κυτταρικού εναιωρήματος
σε 10ml MEM 4%.

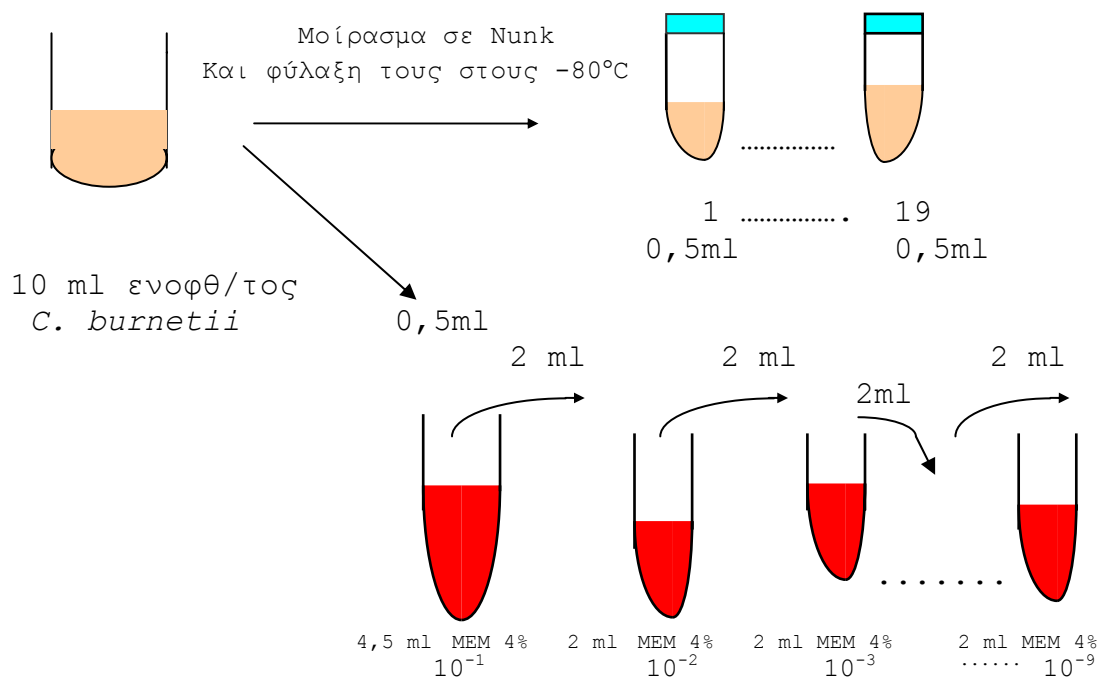
Το κυτταρικό εναιώρημα τοποθετείται σε υγρό άζωτο για 5' και μετά στους 37°C για την καταστροφή των κυττάρων και την ελευθέρωση της *C. burnetii*



- Το κυτταρικό εναιώρημα φυγοκεντρείται στα 2.000 rpm /10'.
- Το υπερκείμενο τοθετείται σε καθαρό σωλήνα.
- Ακολουθεί φυγ/ση στα 10.000 rpm/15'.
- Το ίζημα ομογενοποιείται σε 5ml MEM 4%.

Γ) Τίτλοποίηση του ενοφθαλμίσματος

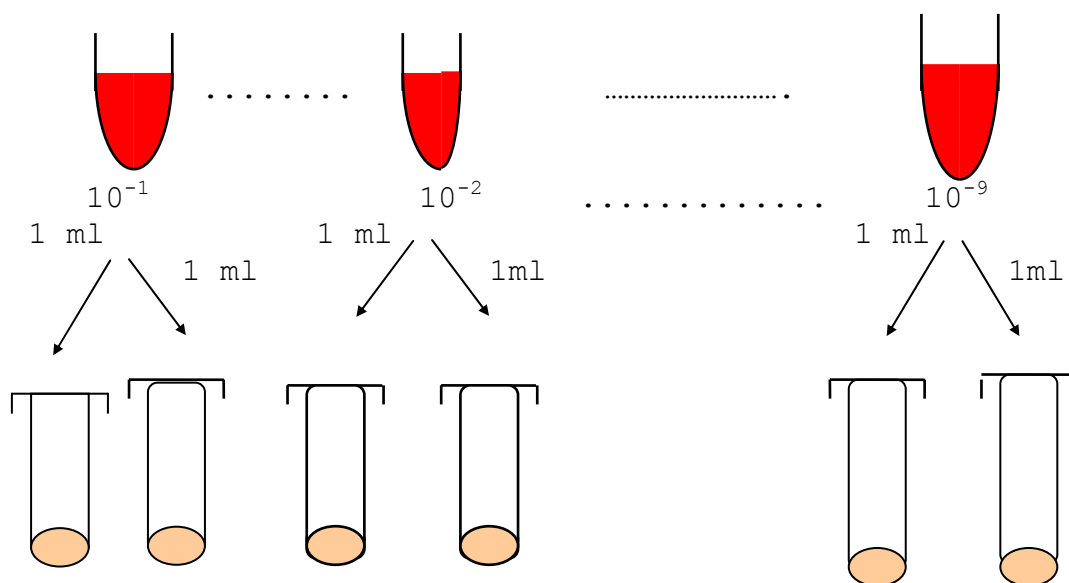
α) Αραίωση του ενοφθαλμίσματος



β) Μόλυνση των shell-vials

-Επιβεβαιώνεται η συνέχεια του κυτταρικού τάπητα των shell-vials σε μικροσκόπιο ανάστροφης φάσης.

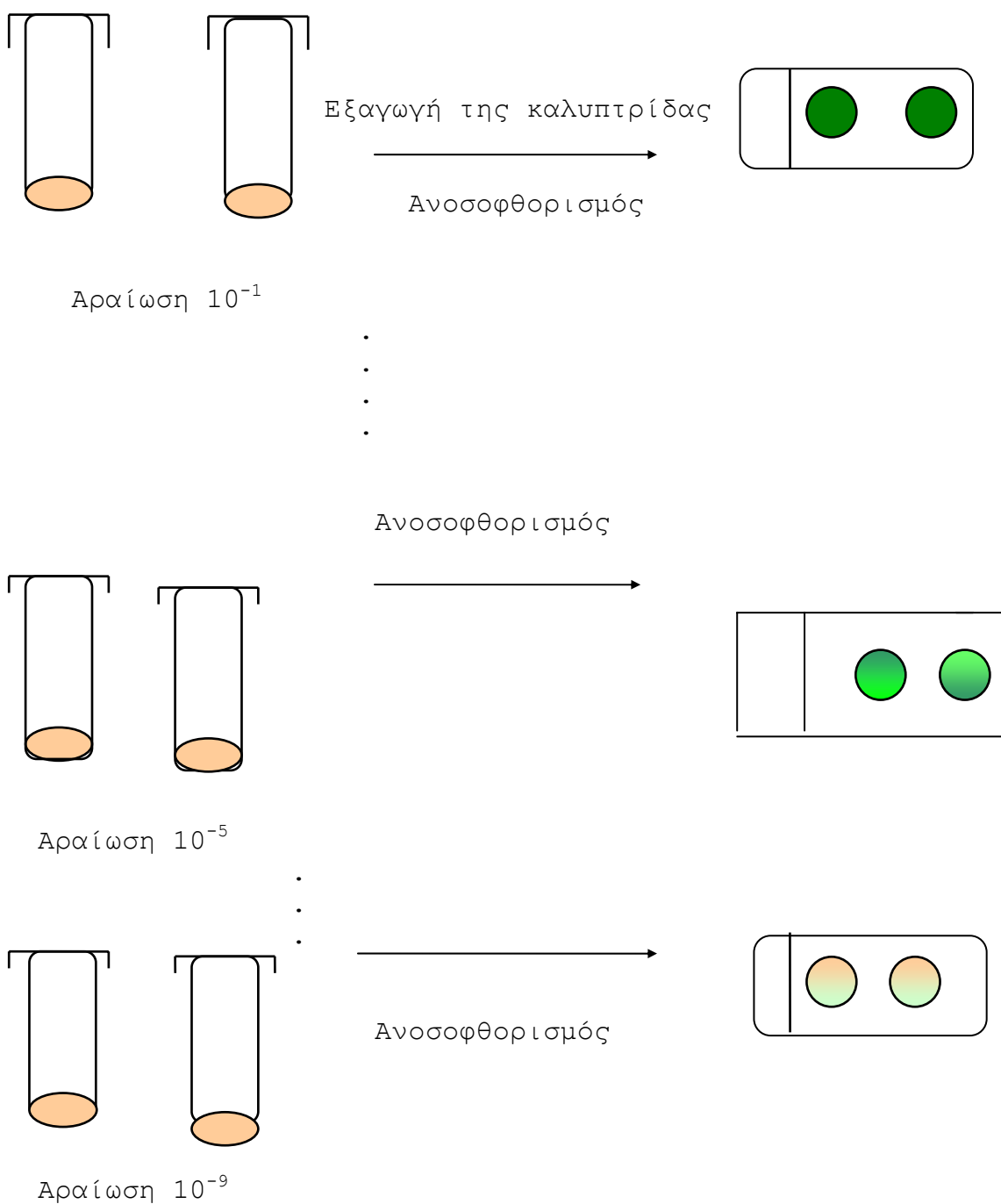
-Απομακρύνεται το θρεπτικό υλικό και κάθε shell-vial μολύνεται με 1ml ενοφθ/τος. (2 shell-vials/ αραίωση)



-Ακολουθεί επώαση των shell-vials στους 37°C / 5% CO₂ με ημιανοιχτό καπάκι για 6 ημέρες.

γ) Ανοσοφθορισμός (IFA)

Μετά τις 6 ημέρες επώασης, γίνεται ανοσοφθορισμός στις καλυπτρίδες των shell vials. Επιλέγεται η αραιώση της *C. burnetii* με 30-50% μολυσματικότητα.



Π.χ. Η αραιώση 10^{-5} παρουσιάζει 30-50% μολυσμένων κυττάρων. Επομένως η αραιώση αυτή θα χρησιμοποιηθεί στη μελέτη της Μ.Ι.Σ. του αντιβιοτικού.

Δ) Υπολογισμός της Μ.Ι.Σ.

- Επιβεβαιώνεται η συνέχεια του κυτταρικού τάπητα σε μικροσκόπιο ανάστροφης φάσης.
- Απομακρύνεται το θρεπτικό υλικό από τα shell-vials
- Ακολουθεί προσθήκη 0,9 ml ενοφθαλμίσματος (30-50% μολυσμένων κυττάρων) σε κάθε shell-vial.
- Στα shell-vials μάρτυρες προστίθεται 1ml MEM 4%
- Στη συνέχεια προστίθεται 0,1 ml αντιβιοτικού σε κάθε shell-vial.
- Τα shell-vials επωάζονται στους 37°C, 5% CO₂ με ημιανοιχτό καπάκι για 6 ημέρες
- Ακολουθεί ανοσοφθορισμός στις καλυπτρίδες και υπολογισμός της **Μ.Ι.Σ.**

Μ.Ι.Σ.: Η μικρότερη συγκέντρωση του αντιβιοτικού στην οποία δεν εμφανίζεται ανάπτυξη του βακτηρίου ή εμφανίζονται ελάχιστα ενδοκυττάρια βακτήρια.

ΒΑΚΤΗΡΙΟΚΤΟΝΟΣ ΔΡΑΣΗ

Δείγματα

Η trovafloxacin είναι μία καινούργια κινολόνη, της οποίας η δράση στην *Coxiella* δεν έχει εξετασθεί. Έγινε *in vitro* έλεγχος της βακτηριοκτόνου δράσης της, προκειμένου να προταθεί ή όχι στη φαρμακευτική αγωγή του χρόνιου πυρετού Q, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο των shell vials και του άμεσου ανοσοφθορισμού.

Οι τεχνικές αυτές εφαρμόστηκαν σε Vero κύτταρα μολυσμένα με τα στελέχη αναφοράς Nine Mile και Q212, τα οποία συντηρήθηκαν σε καλλιέργεια για τουλάχιστον 5 μήνες, με απλή αλλαγή του θρεπτικού υλικού και χωρίς προσθήκη φυσιολογικών Vero κυττάρων.

Προετοιμασία μολυσμένων με *C. burnetii* καλλιεργείων.

Υλικά

- Hunks
- θρυψίνη
- MEM 4%
- Φλάσκες
- Αντιβιοτικό (Trovafloxacin)

Διαδικασία

- Ελέγχεται χρησιμοποιώντας τη χρώση Gimenez ο βαθμός μόλυνσης της καλλιέργειας.
- Αφαιρείται το υπερκείμενο από τις μολυσμένες με το στέλεχος αναφοράς Nine Mile ή Q212 Vero καλλιέργειες.
- Ξεπλύνεται ο κυτταρικός τάπητας με διάλυμα Hunks.
- Προστίθονται 2ml θρυψίνης, ώστε να αποκολληθεί ο κυτταρικός τάπητας από τη flask.
- Το κυτταρικό εναιώρημα ανακτάται με 30ml MEM 4% και μοιράζεται ισόποσα σε 6 μικρές φλάσκες.
- Ακολουθεί επώαση στους 37⁰C, 5% CO₂ για 30 λεπτά.

Προετοιμασία και προσθήκη του αντιβιοτικού στις καλλιέργειες.

- Αφαιρείται το υπερκείμενο από τις καλλιέργειες μετά τα 30' επώασης.

- Προστίθενται 5 ml MEM 4% και διαφορετική συγκέντρωση αντιβιοτικού σε κάθε μία από τις 4 καλλιέργειες.
- Στην 5η καλλιέργεια προστίθενται 5 ml MEM 4%.
- Στη συνέχεια οι 5 φλάσκες τοποθετούνται στους 37°C, 5% CO₂ για 24 ώρες.
- Στην έκτη flask υπολογίζεται, μετά τα 30' επώασης, ο τίτλος μολυσματικότητας με την τεχνική των shell-vials και του άμεσου ανοσοφθορισμού. Στις άλλες φλάσκες η τιτλοποίηση του μολυσματικού υλικού γίνεται μετά από τις 24 ώρες επώασης.

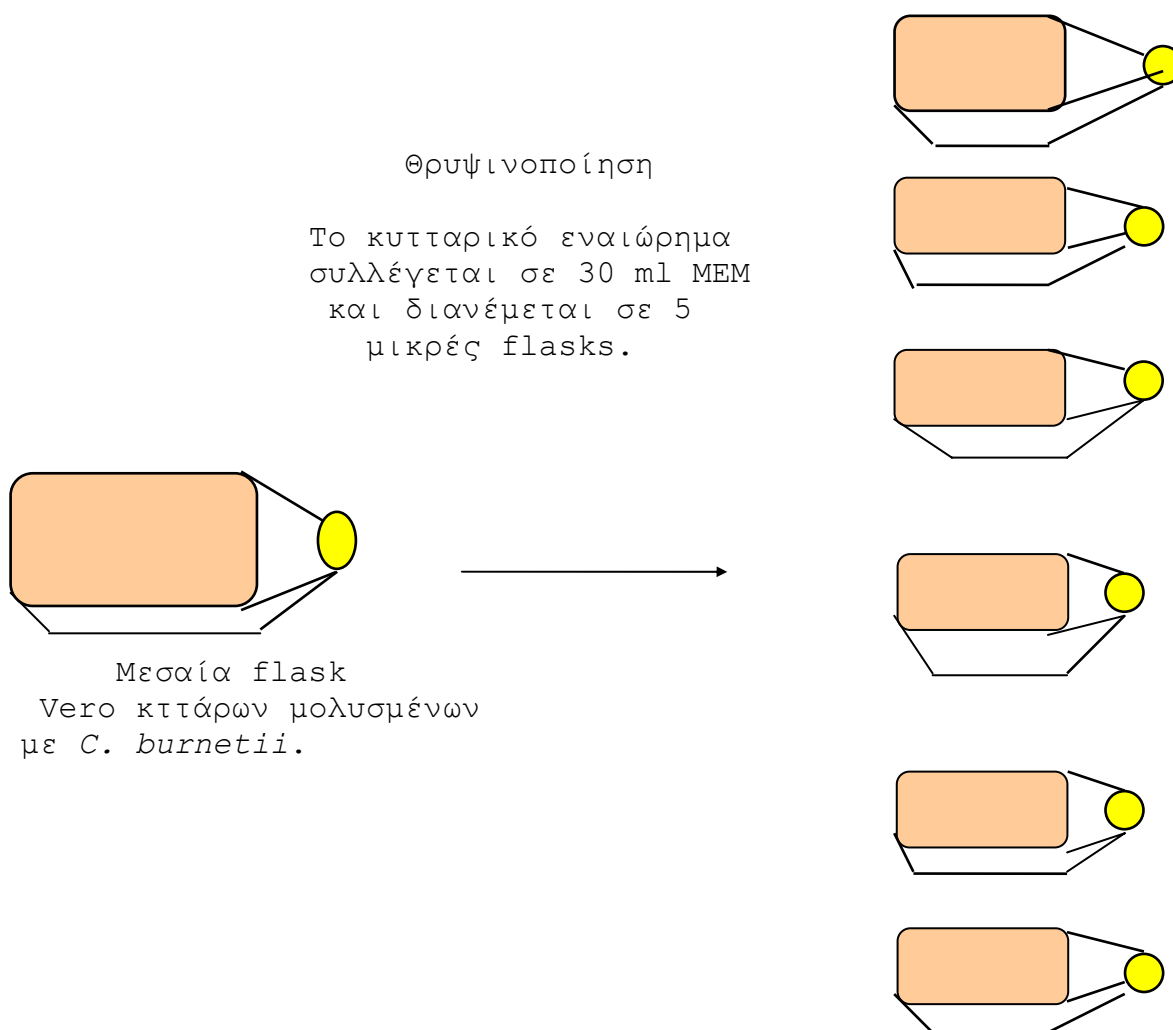
Τιτλοποίηση του μολυσματικού υλικού

Διαδικασία

- Απομακρύνεται το θρεπτικό υλικό από τη φλάσκα.
- Ξεπλύνεται ο κυτταρικός τάπητας με 5 ml Hunks.
- Αφαιρείται το Hunks και προστίθενται 0,5ml θρυψίνης.
- Το κυτταρικό εναιώρημα ανακτάται με 5 ml MEM 4%.
- Ακολουθεί λύση των κυττάρων του ξενιστή με την τοποθέτηση του υλικού τρεις φορές σε υγρό άζωτο και μετά στους 37°C.
- Στη συνέχεια το κυτταρικό υλικό φυγοκεντρείται στις 4000 στροφές για 10 λεπτά.
- Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε καινούργιο σωλήνα.
- Ακολουθεί αραίωση του βακτηριακού υλικού από 10⁻¹ έως 10⁻⁷ σε MEM 4%.
- Αφαιρείται το υπερκείμενο από τα shell vials στα οποία έχουν καλλιεργηθεί Vero κύτταρα.
- Μολύνονται με 1ml από κάθε αραίωση του βακτηριακού υλικού (τουλάχιστον 2 shell vials από κάθε αραίωση).
- Τα shell vials επάζονται στους 37°C/5%CO₂ για 6 ημέρες.
- Στη συνέχεια γίνεται άμεσος ανοσοφθορισμός για την εύρεση του τίτλου των βακτηρίων της *C. burnetii*.

ΒΑΚΤΗΡΙΟΚΤΟΝΟΣ ΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ

A) Προετοιμασία μολυσμένων με *C. burnetii* καλλιιεργειών.



Ακολουθεί επώαση των flasks στους 37°C, 5% CO₂ για 30 λεπτά με ημιανοιχτό καπάκι.

B) Προετοιμασία των αντιβιοτικών

Γ) Προσθήκη του αντιβιοτικού

-Απομακρύνεται το υπερκείμενο από τις 6 μικρές flasks μετά τα 30 λεπτά της επώασης.

-Στις 4 flasks προστίθενται 0,5 ml από το αντιβιοτικό και 5 ml MEM 4%.

-Στην πέμπτη flask προστίθεται MEM 4%.

-Ακολουθεί επώαση των 5 flasks στους 37°C , 5%CO₂ με

ημιανοιχτό καπάκι για 24 ώρες
 -Στην έκτη flask υπολογίζεται ο τίτλος μολυσματικότητας μετά την επώαση των 30 λεπτών με την τεχνική των shell-vials και του άμεσου ανοσοφθορισμού. Μετά από 24 ώρες υπολογίζεται ο τίτλος και των άλλων flasks με τις ίδιες τεχνικές.
 Η δράση του αντιβιοτικού είναι **βακτηριοκτόνος** όταν ο τίτλος μολυσματικότητας στις flasks με αντιβιοτικό είναι 3 ή 4 φορές μικρότερος απ'αυτόν του control (της flask στην οποία έγινε τιτλοποίηση αμέσως μετά την επώαση των 30 λεπτών).

ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ in vitro ΑΝΘΕΚΤΙΚΩΝ ΣΤΗ ΠΕΦΛΟΞΑΣΙΝΗ ΣΤΕΛΕΧΩΝ *C. burnetii*.

Δύο απομονωθέντα στελέχη *C. burnetii* από ασθενείς με οξεία λοίμωξη πυρετού Q, μετατράπηκαν σε in vitro ανθεκτικά στη refloxacin, μετά από ανάπτυξη τους σε συνεχώς αυξανόμενες συγκεντρώσεις της πεφλοξασίνης στο θρεπτικό υλικό καλλιέργειας.

Διαδικασία

- Απορρίπτεται το υπερκείμενο από τις Vero καλλιέργειες.
- Τα κύτταρα ενοφθαλμίζονται με τα απομονωθέντα στελέχη *C. burnetii*.
- Οι φλάσκες επωάζονται για 60 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος με κλειστό το καπάκι.
- Στις μολυσμένες καλλιέργειες προστίθεται θρεπτικό υλικό (MEM 4%).
- Οι φλάσκες τοποθετούνται στους 37°C μέχρι το 90% των κυττάρων να μολυνθεί.
- Απορρίπτεται το θρεπτικό υλικό από τις μολυσμένες καλλιέργειες και ακολουθεί θρυψινοποίηση.
- Το κυτταρικό εναιώρημα φυγοκεντρείται στα 1000xg για 15 λεπτά.
- Το ίζημα ανακτάται με φρέσκο θρεπτικό υλικό 4%.
- Τα βακτήρια *C. burnetii* καθαρίζονται από το κύτταρο ξενιστή χρησιμοποιώντας υγρό άζωτο-37°C τρεις φορές.
- Το μολυσματικό υλικό φυγοκεντρείται στα 1000xg για 15 λεπτά.
- Το υπερκείμενο με τα ελεύθερα βακτήρια *C. burnetii* χρησιμοποιείται για να μολυνθούν φυσιολογικά Vero κύτταρα.
- Μετά από μία ώρα επώασης των μολυσμένων καλλιεργειών στους 37°C απορρίπτεται το ενοφθάλμισμα, ξεπλύνεται ο κυτταρικός τάπητας με MEM 4% και φρέσκο θρεπτικό υλικό 4% που περιέχει 0,2 μg/ml refloxacin προστίθεται στη καλλιέργεια.
- Μετά από τρεις ημέρες γίνεται αλλαγή του θρεπτικού υλικού στις μολυσμένες καλλιέργειες.
- Απομακρύνεται από τη φλάσκα το θρεπτικό μέσο και προστίθεται φρέσκο θρεπτικό υλικό που περιέχει 0,2 μg/ml refloxacin.

-Μετά από μία εβδομάδα επώασης θρυψινοποιείται η μολυσμένη καλλιέργεια και το εναίωρημα χρησιμοποιείται για τη μόλυνση φυσιολογικών Vero κυττάρων. Η καλλιέργεια γίνεται σε θρεπτικό υλικό 4% το οποίο περιέχει 0,6 µg/ml refloxacin.

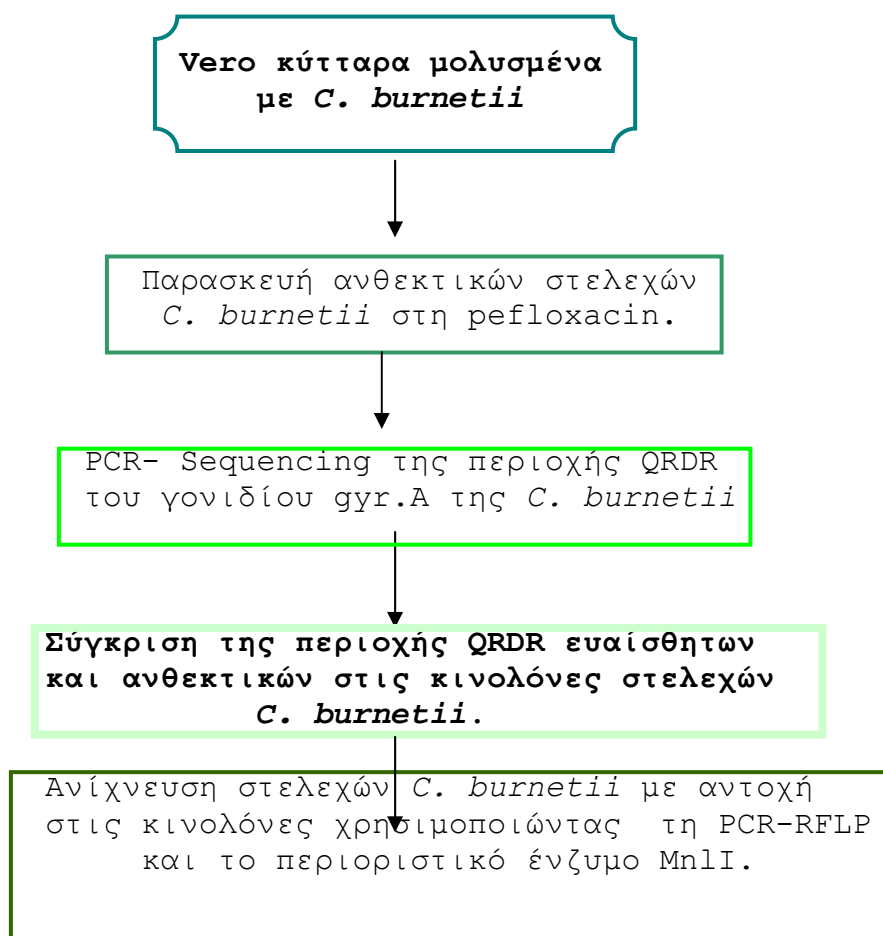
Το ίδιο πρωτόκολλο χρησιμοποιείται έως η συγκέντρωση της refloxacin στο θρεπτικό υλικό της καλλιέργειας να είναι 4 µg/ml. Σε κάθε αύξηση της συγκέντρωσης του αντιβιοτικού γίνεται έλεγχος ενδοκυττάρων βακτηρίων *C. burnetii* με τη χρήση του άμεσου ανοσοφθορισμού.

Κατά την διάρκεια δημιουργίας ανθεκτικών στελεχών υπήρχαν δύο φλάσκες, με Vero κύτταρα μολυσμένα με τα αντίστοιχα ευαίσθητα στελέχη *C. burnetii*, για μάρτηρες.

ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΜΗΧΑΝΙΣΜΩΝ ΑΝΤΟΧΗΣ ΣΤΙΣ ΚΙΝΟΛΟΝΕΣ.

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ DNA ΓΥΡΑΣΗ Α ΤΗΣ *C. burnetii*.

Το σχήμα που ακολουθεί δείχνει την στρατηγική που ακολουθήθηκε:



Έλεγχος της περιοχής QRDR της *C. burnetii*.

Τα ευαίσθητα στελέχη *C. burnetii*, όπως και τα αντίστοιχα *in vitro* ανθεκτικά στη rifloxacin στελέχη, μελετήθηκαν στην περιοχή QRDR του γονιδίου *gyrA*, χρησιμοποιώντας τις τεχνηκές PCR-Sequencing και PCR-RFLP.

Καθαρισμός της *Coxiella* από το κύτταρο ξενιστή με Renografin Gradient Centrifugation

Ο καθαρισμός του μικροοργανισμού πραγματοποιείται για την παραγωγή βακτηριακών κυττάρων που θα χρησιμοποιηθούν στον έμμεσο ανοσοφθορισμό, στο SDS-PAGE, στη PCR και στη μελέτη της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης του αντιβιοτικού (26).

Υλικά

- Φυγόκεντρος Sorvall RC2-B
- Rotor SS34
- Συσκευή υπερήχων: Sonicator Bioblock Vibra Cell
- Υπερφυγόκεντρος Beckman L3-S0
- Rotor SW41 (ή SW27)
- Συσκευή gradient Gilson Mini Puls 3.

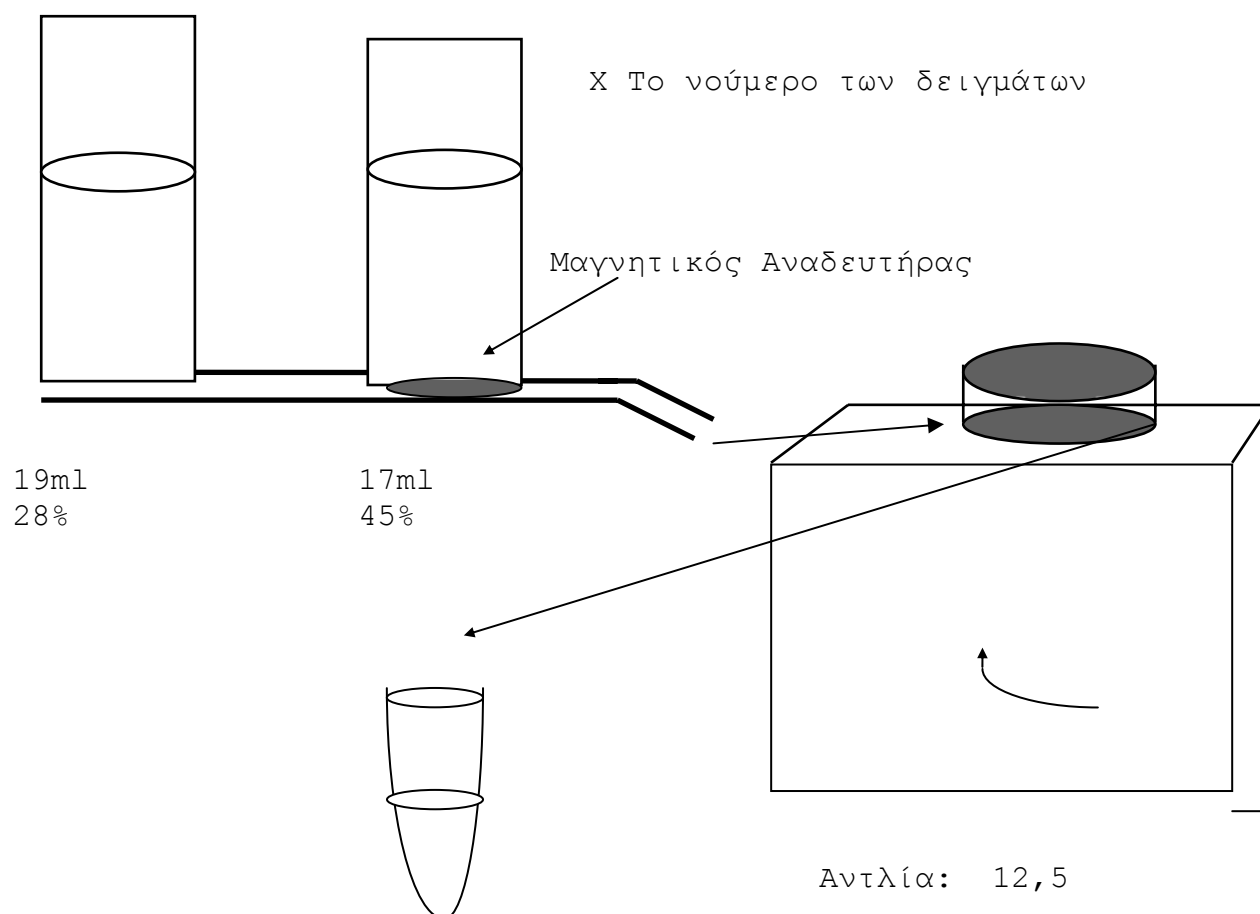
Διαλύματα

-K36:	KH ₂ PO ₄	2,25gr
	K ₂ HPO ₄	5,80gr
	KCl	7,40gr
	NaCl	0,90gr
	dH ₂ O	qsp 1 lt

- 25% Sucrose: 25gr Sucrose σε 100ml K36.
- 28% Renografin: 58,3ml Radioselectan (76%) και 100ml PBS
- 45% Renografin: 145,3ml Radioselectan (76%) και 100ml PBS

Προετοιμασία του gradient Renographin

Ποσότητα υλικών για μόνο ένα καθαρισμό.



Διαδικασία

Ο καθαρισμός της *C. burnetii* από τα κύτταρα ξενιστή πραγματοποιείται μόνο εφόσον υπάρχουν 10 μεγάλες flasks μολυσμένες κατά 90% με *Coxiella*. Ο έλεγχος μολυσματικότητας των flasks υπολογίζεται με την χρώση Gimenez.

-Εισάγονται αποστειρωμένες γυάλινες σφαίρες μέσα στη flask, η οποία ανακινείται έντονα ώστε να αποκολληθούν πλήρως τα κύτταρα.

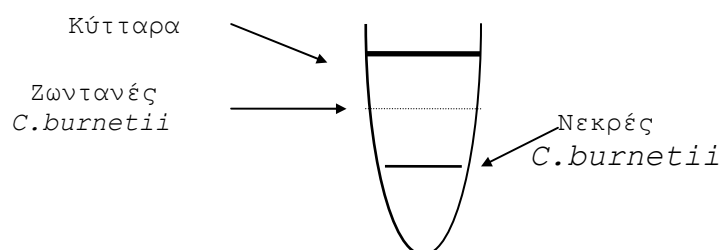
-Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 12.000rpm για 10' στους 4°C.

-Απορίπτεται το υπερκείμενο και το ίζημα επαναδιαλυτοποιείται με 2ml διαλύματος K36.

-Τα κύτταρα σπάζουν με σύριγγα ινσουλίνης με συνεχείς εισαγωγές-εξαγωγές.

-Προστίθενται 8ml K36 και ακολουθεί διάρρηξη των κυττάρων με εφαρμογή υπερήχων, τρεις φορές για 3'.

- Ακολουθεί φυγοκέντρηση, δύο φορές, στα 1.200rpm για 12' με φρένο, ώστε να διαχωριστούν οι μικροοργανισμοί (υπερκεείμενο) από τα κύτταρα (ίζημα).
- Το υπερκεείμενο από τη τελευταία φυγοκέντρηση συλλέγεται σε σωλήνες φυγοκέντρησης των 50ml.
- Προσεκτικά προστίθεται ίση ποσότητα Sucrose 25% με αυτή του υπερκειμένου.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 7.000 rpm/30'/4°C χωρίς φρένο.
- Το ίζημα επαναδιαλυτοποιείται με 1,7ml διαλύματος K36.
- Το υλικό προστίθεται προσεκτικά στον σωλήνα με το gradient.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 25.000 rpm/60'.
- Τα κλάσματα με τους μικροοργανισμούς συλλέγονται σε σωλήνες φυγοκέντρησης.
- Προστίθενται 30ml διαλύματος K36.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 12.000 rpm/15'/4°C με φρένο. (2X)
- Το ίζημα επαναδιαλυτοποιείται με 600μl διαλύματος K36.
- Ακολουθεί χρώση Gimenez.



Εξαγωγή DNA από τα βακτηριακά κύτταρα της *C. burnetii*

- Τα στελέχη της *C. burnetii* (ευαίσθητα και ανθεκτικά) καθαρίζονται από το κύτταρο ξενιστή.
- Στα βακτηριακά κύτταρα προστίθενται 20μg/ml πρωτεϊνάσης K.
- Τα δείγματα επωάζονται στους 52⁰ C για 2 ώρες.
- Ακολουθεί βρασμός των δειγμάτων για 10 λεπτά.
- Στη συνέχεια τοποθετούνται στους 4⁰ C μέχρι τη χρήση τους.

Τεχνική της PCR

Η τεχνική της PCR εφαρμόστηκε, στο δεύτερο μέρος της μελέτης μας, για την ανίχνευση της περιοχής QRDR του γονιδίου *gyrA* της *C. burnetii* σε ευαίσθητα και *in vitro* ανθεκτικά στις κινολόνες στελέχη.

Με τη χρήση της PCR και το ζευγάρι των ολιγονουκλεοτιδικών εναρκτιών:

118: 5'-TTG CGC ATA TCG CAG ACG GT -3' και

446: 5'-TGG CGG CAA AGG ATT TGG-3'

πολλαπλασιάζεται η περιοχή QRDR του γονιδίου *gyrA* της *C. burnetii*. Οι συνθήκες και η διαδικασία της PCR υπάρχουν στη σελίδα .

Η ανίχνευση του προϊόντος της PCR (261bp) γίνεται σε πηκτική αгарόζης 2% σύμφωνα με το πρωτόκολλο της σελίδας .

SEQUENCING

Υλικά-Συσκευές

-Εναρκτίες:

118+M13 universal (21)

5'-TTG CGC ATA TCG CAG ACG GTT GTA AAA CGA CGG CCA GT-3' και
446+ M13 reverse (29)

5'-TGG CGG CAA AGG ATT TGG CAG GAA ACA GCT ATG ACC-3'

M13 universal (21) labeled with the 700 nm fluorescent και

M13 reverse (29) labeled with the 800 nm fluorescent

-QIAquick Spin PCR purification kit

-Thermosequenase Kit (Amersham)

-LI-COR 4200 IR² DNA sequencer (LI-COR USA)

Διαδικασία

- Εφαρμογή της τεχνικής PCR χρησιμοποιώντας τους εναρκτίες 118+M13 universal (21) και 446+ M13 reverse (29) σύμφωνα με το πρωτόκολλο της σελίδας .
- Καθαρίζονται τα προϊόντα της PCR, με το QIAquick Spin PCR purification kit, σύμφωνα με το πρωτόκολλο της εταιρείας.
- Ακολουθεί Sequencing, κατευθείαν στα προϊόντα της PCR, χρησιμοποιώντας 5 µl από τα προϊόντα της παραπάνω PCR, το Thermosequenase kit (Amersham) και εναρκτίες τον M13 universal (21) labeled with the 700 nm fluorescent και τον M13 reverse (29) labeled with the 800 nm fluorescent.

PCR-RFLP

- Εφαρμόζοντας την τεχνική PCR και ειδικούς για την *C. burnetii* εναρκτίες, έγινε πολλαπλασιασμός της περιοχής QRDR του γονιδίου *gyrA* της *C. burnetii*.
- Στη συνέχεια έγινε ανίχνευση μιας σημειακής μετάλλαξης στη περιοχή αυτή, χρησιμοποιώντας τη τεχνική του sequencing κατευθείαν στα προϊόντα της PCR.
- Με επίδραση περιοριστικών ενζύμων στα προϊόντα της PCR, έγινε δυνατή η ανίχνευση της σημειακής μετάλλαξης και η διαφοροποίηση των ευαίσθητων από τα ανθεκτικά στελέχη *C. burnetii*. Τα ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα *MnII*, *HaeIII*, *HinfI* και *XcmI*. Η διαδικασία επίδρασης περιοριστικών ενζύμων στα προϊόντα της PCR αναγράφεται στη σελίδα .
- Ακολουθεί ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 3% LMP (low melting point).

ΜΕΛΕΤΗ ΑΔΙΑΒΑΤΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΠΟΡΙΝΩΝ.

ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΤΗΣ ΕΞΩΤΕΡΙΚΗΣ ΜΕΜΒΡΑΝΗΣ ΕΥΑΙΣΘΗΤΩΝ ΚΑΙ ΑΝΘΕΚΤΙΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ *C. burnetii*.

Ανάλυση πρωτεϊνών σε πηκτική πολυακρυλαμίδης, σε συνθήκες SDS αποδιάταξης (SDS-PAGE).

Αρχή της μεθόδου

Οι πρωτεΐνες είναι μακρομόρια που έχουν καθαρό φορτίο, θετικό ή αρνητικό το οποίο εξαρτάται από το τελικό άθροισμα των φορτίων των αμινοξέων από τα οποία αποτελούνται. Έτσι αν σε ένα διάλυμα μιας πρωτεΐνης εφαρμοστεί ηλεκτρικό πεδίο, η πρωτεΐνη θα μετακινηθεί προς τον θετικό ή αρνητικό πόλο με ταχύτητα που εξαρτάται από το καθαρό φορτίο της, το μέγεθος της και το σχήμα της. Η τεχνική αυτή ονομάζεται ηλεκτροφόρηση και χρησιμοποιείται για να διαχωρίσει μίγματα πρωτεϊνών που κινούνται διαμέσου ενός πορώδους στερεού υλικού όπως είναι το άμυλο.

Στα μέσα του 1960 αναπτύχθηκε μια τροποποιημένη έκδοση αυτής της μεθόδου, γνωστής ως SDS-ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης, η οποία επέτρεψε υψηλό βαθμό ανάλυσης των πρωτεϊνών. Το πήκτωμα πολυακρυλαμίδης παράγεται από πολυμερισμό μονομερών ακρυλαμίδης και είναι πορώδες. Το μέγεθος των πόρων ποικίλει για να επιτυγχάνεται διαχωρισμός μικρότερων ή μεγαλύτερων πρωτεϊνών. Στην μέθοδο αυτή, οι πρωτεΐνες που πρόκειται να διαχωριστούν βρίσκονται σε ένα διάλυμα που περιέχει μια αρνητικά φορτισμένη ουσία το θειικό δωδεκυλικό νάτριο (SDS). Η ουσία αυτή αποχωρίζει τις πολυπεπτιδικές αλυσίδες και της φορτίζει όλες αρνητικά. Έτσι κατά την ηλεκτροφόρηση αυτή οι πολυπεπτιδικές αλυσίδες διαχωρίζονται μόνο σύμφωνα με το μοριακό τους βάρος.

Απομόνωση μεμβρανικών πρωτεϊνών από βακτήρια *C. burnetii*.

Υλικά

- Υάλινες σφαίρες
- Υγρό άζωτο
- PBS
- Υπέρηχοι
- Corex
- SDS

- PMSF
- Leupeptin

Διαδικασία

- Απορρίπτεται το μισό υπερκείμενο από 5 μεγάλες φλάσκες που περιέχουν Vero κύτταρα 100% μολυσμένα με *C. burnetii*.
- Εισάγονται αποστειρωμένες υάλινες σφαίρες σε κάθε φλάσκα.
- Αναδεύονται έντονα ώστε να γίνει πλήρης αποκόλληση των κυττάρων.
- Το κυτταρικό υλικό μεταφέρεται σε σωλήνα με κυκλικό πυθμένα.
- Εξάγονται τα βακτήρια της *C. burnetii* από το κύτταρο ξενιστή με τοποθέτηση του μολυσματικού υλικού σε υγρό άζωτο-37⁰C τρεις φορές.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση του κυτταρικού υλικού στα 3000rpm/4 λεπτά ώστε να διαχωριστούν οι *C. burnetii* (υπερκείμενο) από τα κύτταρα ξενιστή (ίζημα).
- Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε σωλήνες φυγοκέντρησης corex.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 15000rpm/15 λεπτά.
- Το υπερκείμενο απομακρύνεται με αντλία κενού και το ίζημα επαναδιαλυτοποιείται με 1ml PBS χωρίς FBS.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 15000rpm/15 λεπτά.
- Το ίζημα πλένεται με 1ml PBS δύο φορές.
- Στη τελευταία φυγοκέντρηση το ίζημα επαναδιαλυτοποιείται σε 300μl PBS.
- Στη συνέχεια ακολουθεί διάρρηξη των βακτηρίων με εφαρμογή υπερήχων.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 10000rpm/2 λεπτά (πέφτουν πυρήνες, μεμβράνες και άσθραστα κύτταρα).
- Το ίζημα επαναδιαλυτοποιείται σε περίπου 300μl PBS.
- Προστίθενται 2mM PMSF, 10μg/ml leupeptin και 1% SDS σε κάθε δείγμα.
- Τα δείγματα επάζονται σε πάγο για 1 ώρα.

Μέτρηση μεμβρανικών πρωτεϊνών με τη μέθοδο Lowry

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 σε απεσταγμένο νερό.

Διαλύματα

- Folin
- Διάλυμα A (500ml): 2g NaOH
10g Na₂CO₃
0,1g Na-K tartate
- Διάλυμα B(100ml): 0,5g CuSO₄.5H₂O

Διαδικασία

- Όλοι οι προσδιορισμοί γίνονται δύο φορές.
 - Το δείγμα φυγοκεντρείται στις 10000 στροφές για 5 λεπτά.
 - Ακολουθεί διαλυτοποίηση του ιζήματος με 100μl διαλύματος A.
 - Προστίθεται 1ml από το μείγμα των 10 ml διαλύματος A και 0,2 ml διαλύματος B.
 - Ακολουθεί καλή ανακίνηση και επώαση για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, σε σκοτάδι.
 - Προστίθενται 100 μl Folin 1X.
 - Ακολουθεί καλή ανακίνηση και επώαση για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, σε σκοτάδι.
 - Η απορρόφηση μετريέται στα 625 nm
- Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών γίνεται με σύγκριση της απορρόφησης τους, σε σχέση με την απορρόφηση της πρότυπης καμπύλης.

Προετοιμασία της πηκτής πολυακρυλαμίδης.

Υλικά και συσκευές

- Ακρυλαμίδιο
- Bis-Ακρυλαμίδιο
- SDS
- Tris-HCl
- Υπερθειικό αμμώνιο
- TEMED
- β-μερκαπτοαιθανόλη
- DTT
- Γλυκερόλη
- Κυανούν της βρωμοφαινόλης
- Γλυκίνη
- Συσκευή ηλεκτροφόρησης

Διαλύματα

- Συγκεντρωμένο διάλυμα ακρυλαμίδης 30%

Ακρυλαμίδιο 29,2%

Bis-Ακρυλαμίδιο 0,8%

Το διάλυμα φιλτράρεται και φυλάσσεται στους 4⁰C μακριά από το φως.

-Ρυθμιστικό διάλυμα διαχωρισμού

Tris-HCl 1,5M

SDS 0,4%

Το pH ρυθμίζεται σε 8,8 με διάλυμα HCl, στη συνέχεια φιλτράρεται και φυλάσσεται στους 4⁰C.

-Ρυθμιστικό διάλυμα επιστοίβαξης

Tris-HCl 0,5M

SDS 0,4%

Το pH ρυθμίζεται σε 6,8 με διάλυμα HCl, στη συνέχεια φιλτράρεται και φυλάσσεται στους 4⁰C.

-Συγκεντρωμένο διάλυμα υπερθειικού αμμωνίου

Υπερθειικό αμμώνιο 10%

-Ρυθμιστικό διάλυμα μετουσίωσης 2X

Tris-HCl 0,125M

SDS 4%

β-μερκαπτοαιθανόλη 4%

Γλυκερόλη 10%

Κυανούν της βρωμοφαινόλης 0,02%

Εναλλακτικά, η β-μερκαπτοαιθανόλη είναι δυνατόν να αντικατασταθεί με DDT τελικής συγκέντρωσης 100 mM, το οποίο όμως προστίθεται λίγο πριν τη χρήση του διαλύματος. Το pH ρυθμίζεται σε 6,8 πριν από την προσθήκη του κυανού της βρωμοφαινόλης και το διάλυμα φυλάσσεται στους 4⁰C.

-Πήκτωμα διαχωρισμού (10ml ακρυλαμίδη, 10 ml)

Συγκεντρωμένο διάλυμα ακρυλαμίδης 30% 3,3ml

1,5 M Tris pH 8,8 2,5ml

Δισαπεσταγμένο νερό 4 ml

10% SDS 0,1ml

10% Υπερθειικό αμμώνιο 0,1ml

TEMED 0,004ml

-Πήκτωμα επιστοίβαξης (5% ακρυλαμίδη, 2 ml)

Συγκεντρωμένο διάλυμα ακρυλαμίδης 30%	0,33ml
1M Tris pH 6,8	0,25ml
Δισαπεσταγμένο νερό	1,4ml
10% SDS	0,02ml
10% Υπερθειικό αμμώνιο	0,02ml
TEMED	0,002ml

-Διάλυμα ηλεκτροφόρησης 5X

Tris-HCl
Γλυκίνη

SDS

Το pH του διαλύματος πρέπει να είναι χωρίς διόρθωση περίπου 8,3. Φυλάσσεται στους 4⁰ C.

Διαδικασία

- Τα τζάμια πλένονται με ζεστό νερό και σαπούνι και ξεπλένονται με απιονισμένο νερό και στη συνέχεια με αλκοόλη.
- Συναρμολογείται το σύστημα των τζαμιών.
- Μοιράζεται το πήκτωμα διαχωρισμού (πάντα σε κάθετη θέση) προσέχοντας να μην σχηματιστούν φυσαλίδες. Αφήνεται ικανό διάστημα για την εισαγωγή του πηκτώματος επιστοίβαξης (το ύψος της χτένας και ένα εκατοστό).
- Προστίθεται ισοβουτανόλη (για να εμποδισθεί το οξυγόνο να διαλυθεί και να διευκολυνθεί ο πολυμερισμός).
- Μετά τον πολυμερισμό αφαιρείται η ισοβουτανόλη.
- Η επάνω επιφάνεια της πηκτής εκπλένεται με νερό ώστε να μετακινηθεί η τυχόν μη πολυμερισμένη ακρυλαμίδα.
- Με την άκρη απορροφητικού χαρτιού απομακρύνεται το νερό.
- Μοιράζεται το πήκτωμα επιστοίβαξης (πάντα σε κάθετη θέση) και αμέσως τοποθετείται το χτένι προσέχοντας να μην σχηματιστούν φυσαλίδες.
- Αναμονή για τον πολυμερισμό.
- Μετά την ολοκλήρωση του πολυμερισμού προσεκτικά αφαιρείται η χτένα.
- Συναρμολογείται η συσκευή ηλεκτροφόρησης και τοποθετείται το πήκτωμα.
- Προστίθεται το διάλυμα ηλεκτροφόρησης 1X.

Προετοιμασία των δειγμάτων για την ηλεκτροφόρηση.

Προστίθεται σε κάθε δείγμα ίσος όγκος διαλύματος μετουσίωσης 2X και θερμαίνονται στους 95⁰C για 5 λεπτά. Κάτω

από αυτές τις συνθήκες οι πρωτεΐνες αποδιατάσσονται διατηρώντας μόνο την πρωτοταγή τους δομή.

Μετά την τοποθέτηση των δειγμάτων στην πηκτική εφαρμόζεται σταθερή τάση 150 V έως ότου τα δείγματα να εισχωρήσουν στο πήκτωμα διαχωρισμού, οπότε και εφαρμόζεται τάση 280 V. Η διαδικασία ολοκληρώνεται σε 3 ώρες περίπου.

Χρώση Coomassie Blue

Υλικά

- Coomassie Blue R250
- Μαιθανόλη
- Οξικό οξύ

Διαλύματα

-Διάλυμα Χρωστικής

0,2% Coomassie Blue R250 σε αποχρωστικό διάλυμα. Διατήρηση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, μακριά από το φως.

-Αποχρωστικό διάλυμα

Μαιθανόλη	50%
Οξικό οξύ	10%
Δισαπεσταγμένο νερό	40%

Διατήρηση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, μακριά από το φως.

Διαδικασία

- Αποσυναρμολογείται η συσκευή.
- Η πηκτική μεταφέρεται σε διάλυμα χρωστικής.
- Αναδεύεται για 2 ώρες.
- Απορρίπτεται το διάλυμα χρωστικής και προστίθεται το αποχρωστικό διάλυμα.
- Ακολουθεί ανάδευση για περίπου 90 λεπτά.
- Μετά την εμφάνιση των μπαντών η πηκτική μπορεί να διατηρηθεί σε δισαπεσταγμένο νερό ή να φωτογραφηθεί.

ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΗΣ ΕΝΔΟΚΥΤΤΑΡΙΑΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΤΗΣ pefloxacin (uptake) .

Η ικανότητα μερικών μικροοργανισμών να επιβιώνουν και να πολλαπλασιάζονται μέσα στα φαγοκύτταρα αποτελεί ένα πραγματικά αποτελεσματικό τρόπο διαφυγής τους από την αντιμικροβιακή δραστηριότητα των περισσοτέρων αντιβιοτικών. Η ικανότητα της ενδοκυττάριας διείσδυσης και κατανομής των αντιβιοτικών είναι αυτή που καθορίζει τη δραστηριότητά τους έναντι των ενδοκυττάρων παθογόνων. Άλλοι παράγοντες που παίζουν σημαντικό ρόλο είναι η ενδοκυττάρια ανενεργοποίηση του φαρμάκου και η ευπάθεια των ενδοκυττάρων μικροοργανισμών στο εκάστοτε αντιβιοτικό (65).

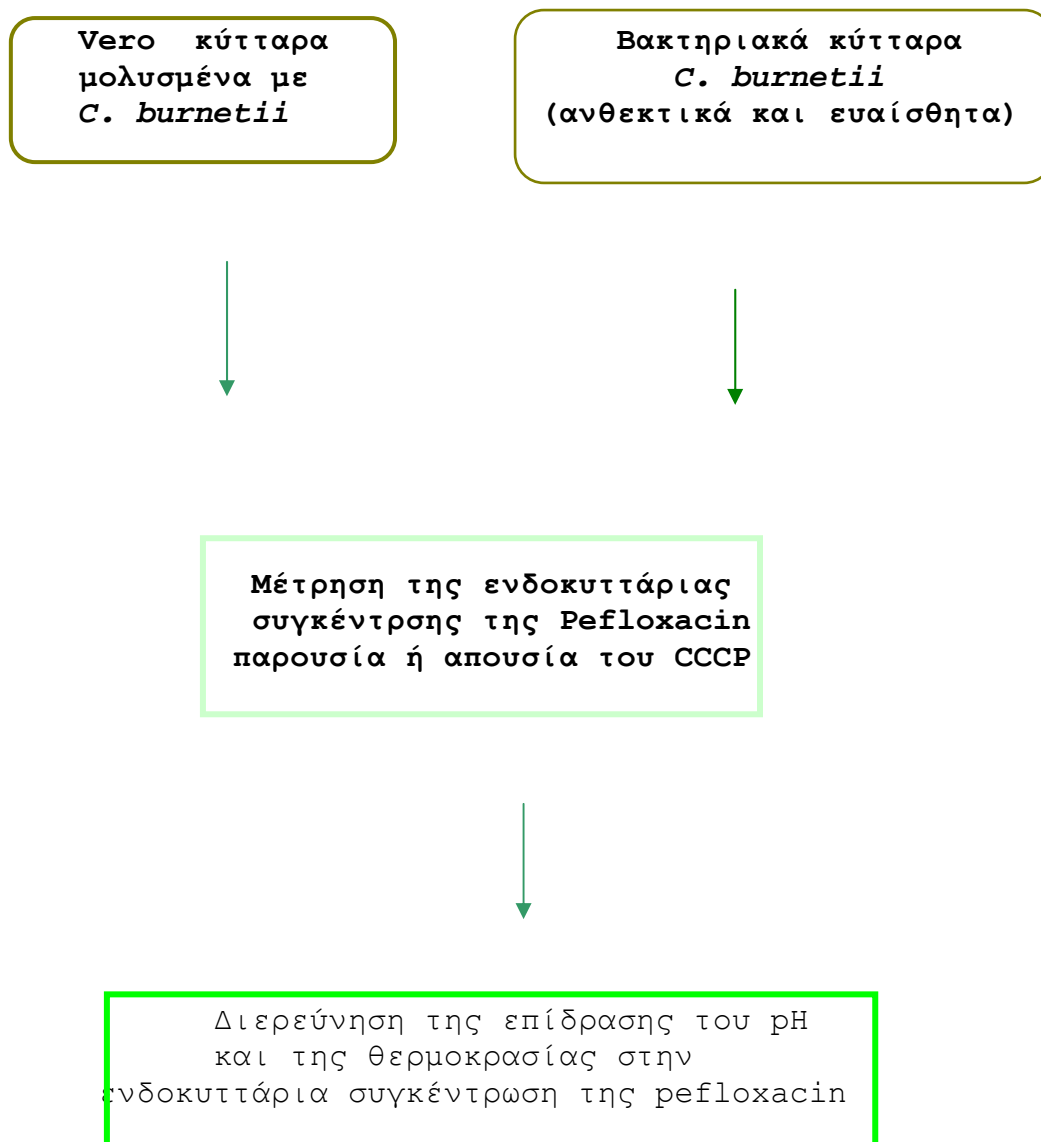
Το μοντέλο των κυτταρικών σειρών διευκολύνει τις μελέτες κυτταρικής πρόσληψης και ενδοκυττάριας δραστηριότητας των αντιβιοτικών.

Έχουν χρησιμοποιηθεί αρκετές μέθοδοι για την πρόσληψη των αντιβιοτικών από τα ευκαρυωτικά κύτταρα (67, 105). Στις μελέτες αυτές παρουσιάζονται δυσκολίες σχετικές με τον καθορισμό της πραγματικής ποσότητας του φαρμάκου που έχει προσληφθεί από το βακτηριακό κύτταρο ή τα κύτταρα ξενιστή. Τα κύτταρα επωάζονται με ένα ραδιοσημασμένο φάρμακο, και στη συνέχεια υπολογίζεται η ενδοκυττάρια συγκέντρωση του φαρμάκου μέσω της ραδιενέργειας που προσλαμβάνεται. Κάποια αντιβιοτικά όπως οι φλουοροκινολόνες έχουν την ιδιότητα να φθορίζουν, πράγμα που θα μπορούσε να βοηθήσει στον υπολογισμό της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης των φαρμάκων αυτών (105).

Τα αντιβιοτικά διεισδύουν στα κύτταρα με το μηχανισμό της διάχυσης, με τελικό αποτέλεσμα την εγκατάσταση ισορροπίας ανάμεσα στην εξωκυττάρια και στην ενδοκυττάρια συγκέντρωση του φαρμάκου (δηλαδή τη συγκέντρωση του φαρμάκου στο κυτταρόπλασμα). Η διάχυση ενός φαρμάκου δια μέσου της κυτταρικής μεμβράνης εξαρτάται από την κλίση συγκέντρωσης του φαρμάκου εκατέρωθεν της μεμβράνης, από τη συνολική επιφάνεια της μεμβράνης, από το διαθέσιμο χρόνο, από τη θερμοκρασία και από τη λιποδιαλυτότητα του φαρμάκου. Ο παθητικός μηχανισμός της διάχυσης μπορεί να εξηγήσει την κατανομή των β - λακταμών, των τετρακυκλινών, της ριφαμπικίνης, της χλωραμφενικόλης και των σουλφοναμιδών.

Τα φάρμακα μπορούν να μετακινηθούν μέσα στα κύτταρα και με ενεργητικούς μηχανισμούς, όπως για παράδειγμα με το μηχανισμό της πινοκυττάρωσης ή με το μηχανισμό των συστημάτων μεταφοράς με φορέα. Ο μηχανισμός αυτός απαιτεί την κατανάλωση ενέργειας και μπορεί να μπλοκαριστεί με ειδικούς αναστολείς, όπως για παράδειγμα το CCCP (29, 56, 122).

Το σχήμα που ακολουθεί δείχνει την στρατηγική που ακολουθήθηκε:



**ΜΕΤΡΗΣΗ ΕΝΔΟΚΥΤΤΑΡΙΑΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ (UPTAKE)
ΤΗΣ PEFLOXACIN ΣΕ ΜΟΛΥΣΜΕΝΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΚΑΙ
ΒΑΚΤΗΡΙΑ *C. burnetii*.**

Η μελέτη της ενδοκυττάριας συσσώρευσης του αντιβιοτικού έγινε:

- 1) σε pH 7,2 και 4,5 και
- 2) σε θερμοκρασία 25⁰C και 35⁰C.

Uptake μολυσμένων κυττάρων

Υλικά και όργανα

- Θρυψίνη
- Hanks
- PBS
- Trypan-blue
- Αντιβιοτικό pefloxacin
- Glycine
- Πάγος
- Σώληνες για φυγοκέντρηση
- Πλάκα Neubauer για τη μέτρηση των κυττάρων
- Φυγόκεντρος
- Υδατόλουτρο με ανάδευση
- Φθοριόμετρο: PERKIN-ELMER
LS-3B
Fluorescence
spectrometer

Διαδικασία

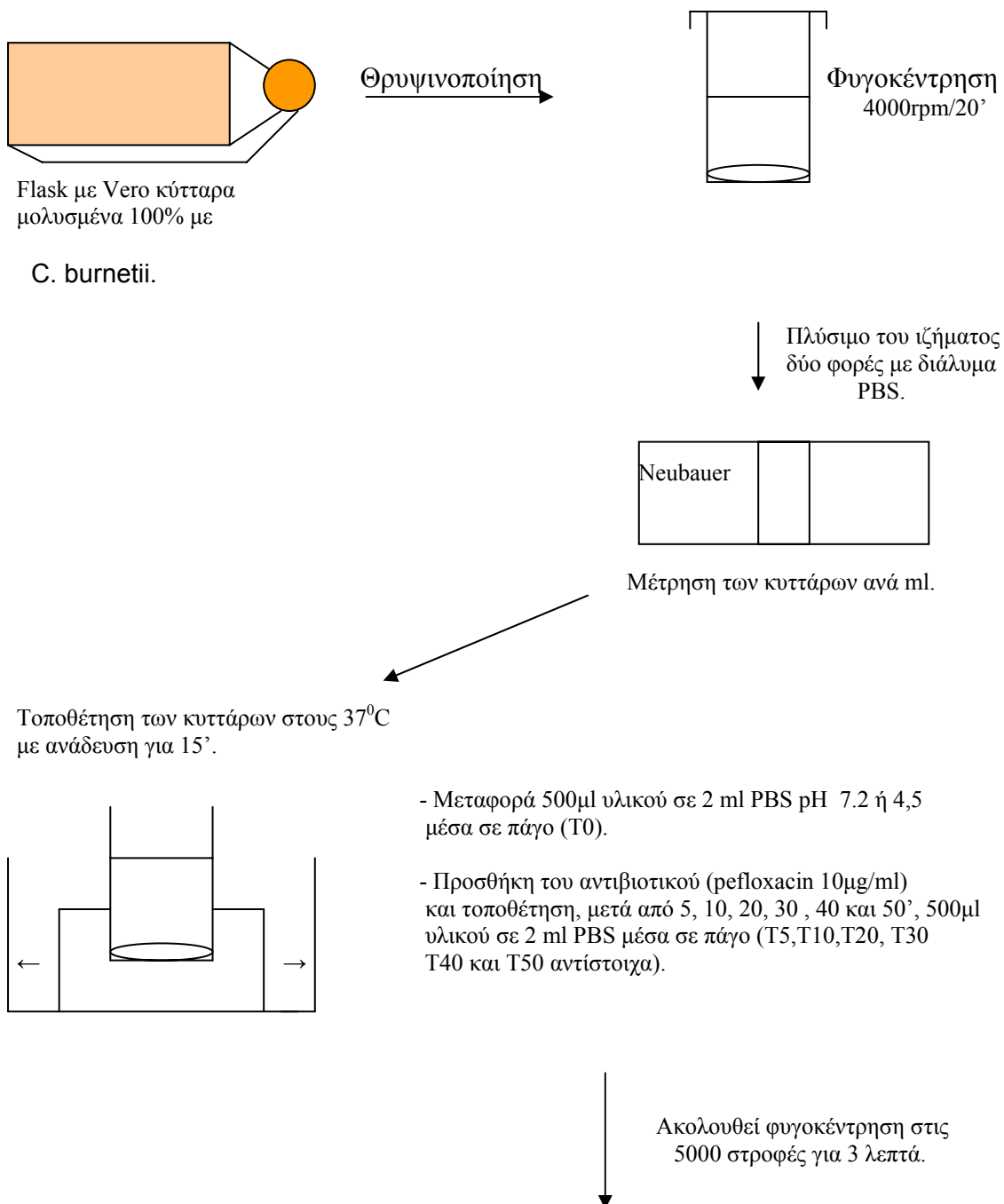
- Απομακρύνεται το θρεπτικό υλικό από 5 μεγάλες φλάσκες με Vero κύτταρα, μολυσμένα 100% με *C. burnetii*.
- Ξεπλένεται ο κυτταρικός τάπητας με διάλυμα Hanks.
- Προστίθενται 2ml θρυψίνης σε κάθε φλάσκα.
- Το κυτταρικό εναιώρημα ανακτάται από κάθε φλάσκα με 10 ml PBS.
- Διανέμεται σε σωλήνες φυγοκέντρησης από 30 ml στο καθένα.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 4000 στροφές για 20 λεπτά.
- Το ίζημα ξεπλένεται δύο φορές με διάλυμα PBS.
- Ακολουθεί μέτρηση των κυττάρων.

- Το κυτταρικό εναιώρημα αραιώνεται σε PBS (pH 7.2 ή 4.5) ώστε να υπάρχουν 10^4 μολυσμένα κύτταρα ανά ml.
- Στη συνέχεια ο σωλήνας με τα κύτταρα μεταφέρεται σε υδατόλουτρο 37°C με ανάδευση για 15 λεπτά.
- Ακολουθεί μεταφορά 500μl κυτταρικού υλικού σε 2ml PBS pH 7,2 ή 4,5 μέσα σε πάγο (T_0)
- Προστίθεται αντιβιοτικό rifloxacin στο σωλήνα με τα κύτταρα ώστε η τελική του συγκέντρωση να είναι 10μg/ml.
- Μετά από 5, 10, 20, 30, 40 και 50 λεπτά μεταφέρονται 500μl κυτταρικού υλικού σε αντίστοιχους σωλήνες (T_5 , T_{10} , T_{20} , T_{30} , T_{40} και T_{50}) που περιέχουν 2ml PBS pH 7,2 ή 4,5 μέσα σε πάγο.
- Ακολουθεί φυγοκέντρωση στις 5000 στροφές για 3-5 λεπτά.
- Πλένεται το ίζημα με 2ml PBS.
- Μετά το δεύτερο πλύσιμο προστίθενται στο ίζημα 2 ml glycine.
- Ακολουθεί επώαση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, με ανάδευση, για 15 ώρες σε σκοτάδι.
- Το κυτταρικό υλικό φυγοκεντρήται στις 5000 στροφές για 5 λεπτά.
- Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε καινούργιο σωλήνα και ακολουθεί μέτρηση του φθορισμού:

Excitation 278

Emission 442

Uptake rifloxacin από Vero κύτταρα μολυσμένα με *C. burnetii*



Προσθήκη στο ίζημα 2 ml PBS pH 7.2 ή 4,5 και ξανά φυγοκέντρηση για δύο φορές.
 Μετά τη δεύτερη φυγοκέντρηση προσθήκη στο ίζημα 2ml glycine και επώαση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για όλο το βράδυ σε σκοτάδι.
 Φυγοκέντρηση στις 5000στροφές για 5 λεπτά.
 Μέτρηση του φθορισμού στο υπερκείμενο: Excitation 278
 Emission 442

Uptake pefloxacin από βακτηριακά κύτταρα *C. burnetii*

A) Παρασκευή καθαρών από το κύτταρο ξενιστή

βακτηρίων *C. burnetii*

Υλικά και όργανα

- Θρυψίνη
- Hanks
- PBS
- Αντιβιοτικό pefloxacin
- Glycine
- Πάγος
- Σώληνες για φυγοκέντρηση
- Φυγόκεντρος
- Υδατόλουτρο με ανάδευση
- Φθοριόμετρο
- Φίλτρα 0,2µm pore size.

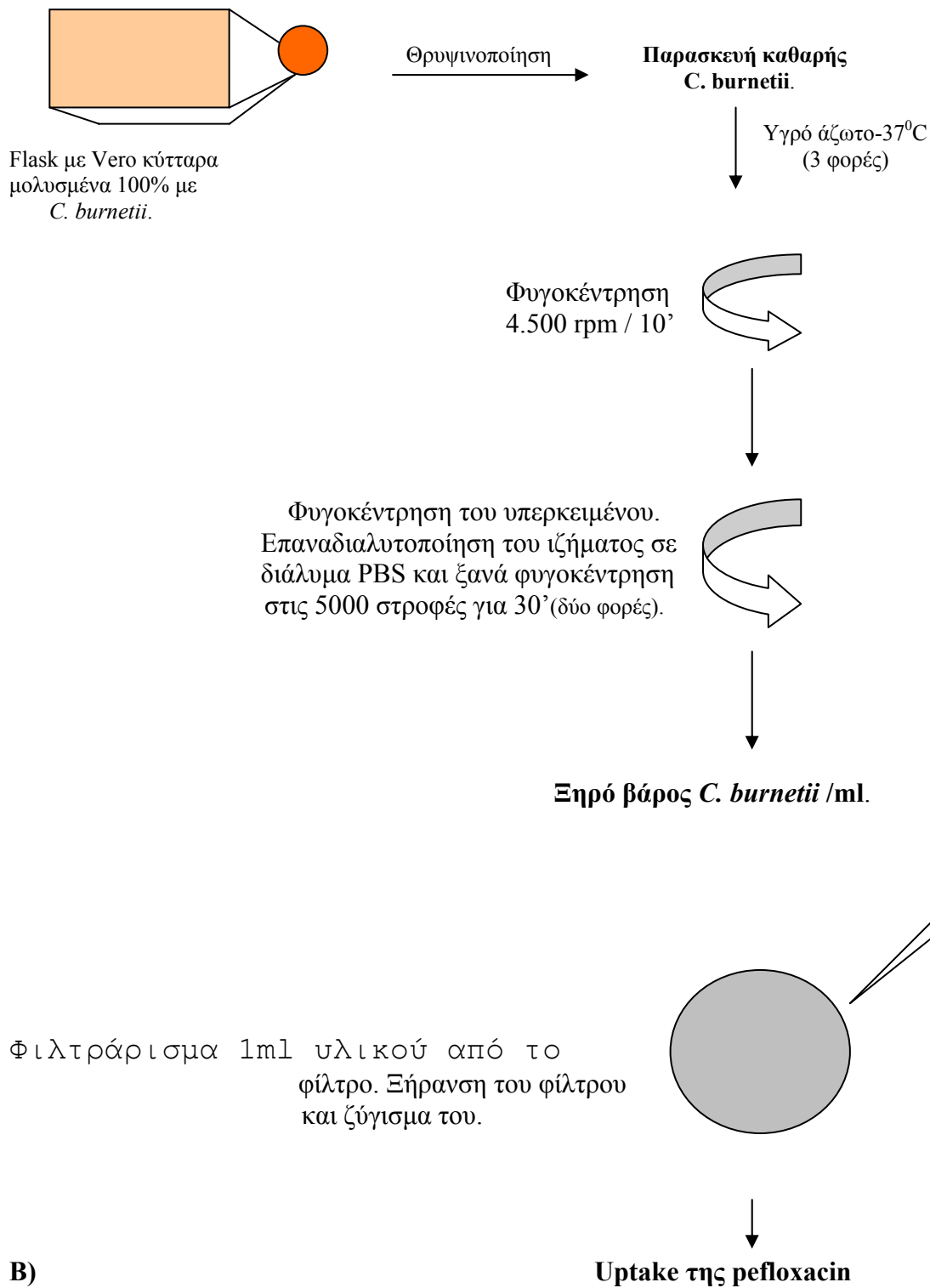
- Θρυψινοποιούνται 5 μεγάλες φλάσκες με Vero κύτταρα 100% μολυσμένα με *C. burnetii*.
- Το κυτταρικό εναιώρημα ανακτάται με 5ml PBS.
- Ο σωλήνας με τα κύτταρα μεταφέρεται 3 φορές σε υγρό άζωτο και μετά στους 37⁰C.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 4500 στροφές για 10 λεπτά.
- Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε καινούργιο σωλήνα και φυγοκεντρήται στις 14000 στροφές για 15 λεπτά.
- Το ίζημα πλύνεται με PBS δύο φορές.
- Μετά τη φυγοκέντρηση το ίζημα επαναδιαλυτοποιείται σε PBS.
- Ακολουθεί αραίωση του υλικού σε PBS ώστε να υπάρχουν 10⁶ μικροοργανισμοί ανά ml.

B) Uptake της pefloxacin

Το πρωτόκολλο είναι το ίδιο μ'αυτό των μολυσμένων κυττάρων (βλέπε σελίδα 104).

Uptake pefloxacin από βακτηριακά κύτταρα *C. burnetii*

A) Παρασκευή καθαρής *C. burnetii* από το κύτταρο ξενιστή:

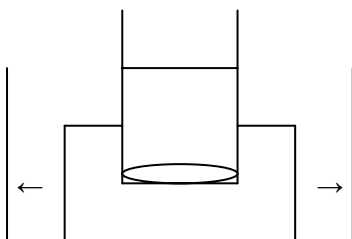


[Το πρωτόκολλο είναι το ίδιο μ'αυτό των μολυσμένων κυττάρων. Αλλάζουν μόνο οι χρόνοι φυγοκέντρησης, που είναι μεγαλύτεροι για τα βακτήρια *C. burnetii*.]

**Uptake refloxacin από μολυσμένα κύτταρα και
βακτήρια *C. burnetii* παρουσία CCCP.**

Το:

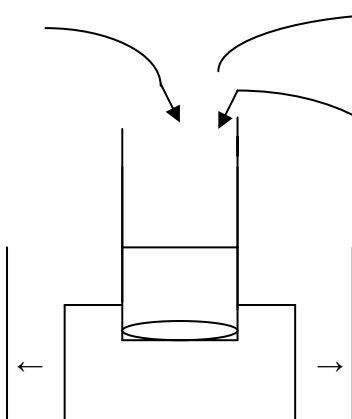
Τοποθέτηση των κυττάρων στους 37°C
με ανάδευση για 15'.



Μεταφορά 500μl υλικού σε 2 ml PBS pH 7.2
μέσα σε πάγο.



Προσθήκη 10μg/ml
αντιβιοτικού.



T10: Μεταφορά 500μl υλικού σε 2 ml PBS pH 7.2
μέσα σε πάγο, μετά από 10' προσθήκης του αντιβιοτικού
και του CCCP ή του DNP.

Προσθήκη CCCP (150μM).



- Μετά από 10, 20 και 30 λεπτά (**T20**, **T30** και **T40** αντίστοιχα) 500 μl υλικού τοποθετούνται σε 2ml PBS μέσα σε πάγο.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 5000rpm και μετά δύο πλυσίματα σε PBS.
- Επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος σε 2ml glycine pH3 και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για όλο το βράδυ με ανακίνηση
- Φυγοκέντρηση στα 5000rpm και μέτρηση του φθορισμού στο υπερκείμενο.

Για την refloxacin: emission 278
excitation 442

(Το ίδιο πρωτόκολλο μπορεί να εφαρμοστεί και μετά την επώαση του υλικού με CCCP για 15' στους 37°C).



ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

ΜΕΡΟΣ ΠΡΩΤΟ

ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ, ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΣΤΕΛΕΧΩΝ *C. burnetii*.

Ορολογικός έλεγχος ασθενών.

Το υλικό της μελέτης μας αποτέλεσαν 25 ασθενείς με κλινική εικόνα λοίμωξης από *C. burnetii* και υψηλούς τίτλους αντισωμάτων IgG, IgM και IgA έναντι της *C. burnetii* (πίνακας 6).

Πίνακας 6. Τίτλοι αντισωμάτων έναντι της *C. burnetii* σε ασθενείς με οξεία λοίμωξη πυρετού Q, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο του έμμεσου ανοσοφθορισμού.

Οροί	Τίτλοι IgM αντισωμάτων	Τίτλοι IgG αντισωμάτων	Τίτλοι IgA αντισωμάτων
1.	102.400	122.880	200
2.	102.400	122.880	12.800
3.	51.200	61.440	400
4.	12.800	30.720	800
5.	1.600	30.720	400
6.	12.800	15.360	3.200
7.	6.400	30.720	25.600
8.	12.800	61.440	3.200
9.	3.200	7.680	800
10.	12.800	30.720	6.400
11.	51.200	61.440	12.800
12.	6.400	15.360	800
13.	800	15.360	800
14.	400	7.680	400
15.	400	3.840	200
16.	400	30.720	3.200
17.	400	1.980	200
18.	200	61.440	12.800
19.	102.400	122.880	200
20.	3.200	7.680	800
21.	6.400	30.720	25.600
22.	400	3.840	200
23.	3.200	3.840	400
24.	12.800	15.360	3.200
25.	1.600	30.720	400

Προηγούμενες οροεπιδημιολογικές μελέτες, στη Κύπρο, οδήγησαν στην εντόπιση περιοχών υψηλού κινδύνου πυρετού Q. Από τις περιοχές αυτές έγινε συλλογή δειγμάτων αίματος από αιγοπρόβατα, που απέβαλαν, καθώς και συλλογή κροτώνων από αιγοπρόβατα. Ορολογικός έλεγχος, με την μέθοδο του έμμεσου ανοσοφθορισμού, έγινε σε 9 δείγματα αίματος από αιγοπρόβατα (απ' αυτά 4 δείγματα ήταν από αίγα και 5 από πρόβατο). Θετικοί θεωρήθηκαν οι οροί που εμφάνισαν τίτλους αντισωμάτων IgG \geq 1/60. Από αίγα βρέθηκαν 2 δείγματα θετικά για *C. burnetii* με τίτλο αντισωμάτων IgG 1/120 και 1/1920 αντίστοιχα. Από τα 5 δείγματα αίματος προβάτου, 3 ήταν θετικά, για *C. burnetii*, με τίτλο αντισωμάτων από 1/120-1/3.840.

Συλλογή και ταξινόμηση των κροτώνων

Συλλέχθηκαν συνολικά, στη Κύπρο, 141 κρότωνα από αιγοπρόβατα. Σύμφωνα με τα ταξινομικά κλειδιά βρέθηκε ότι 100 κρότωνα ανήκαν στο γένος *Rhipicephalus* (*Rhipicephalus sanguineus*) και 41 στο γένος *Hyalomma* (Πίνακας 7).

Πίνακας 7. Είδος, αριθμός και ξενιστής των συλλεχθέντων κροτώνων.

Είδος	Αριθμός δειγμάτων	Ξενιστής	
		Αίγα	Πρόβατο
<i>Hyalomma sp.</i>	41	10	31
<i>R. sanguineus</i>	100	20	80
Συνολικά	141	30	111

Ανίχνευση *C. burnetii* σε ζωντανούς κρότωνα με τη δοκιμασία της αιμολέμφου.

Δοκιμασία αιμολέμφου

Χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία της αιμολέμφου, ελέγχθηκαν συνολικά 8 ζωντανοί κρότωνα για την ανίχνευση *C. burnetii*. Μετά από χρώση Gimenez 3 δείγματα ήταν θετικά για *C. burnetii*. Οι θετικοί κρότωνα ήταν *Hylomys* sp και συλλέχθηκαν από αίγα.

Φωτογραφία 1. Χρώση Gimenez σε αιμόλεμφο κρότωνα.

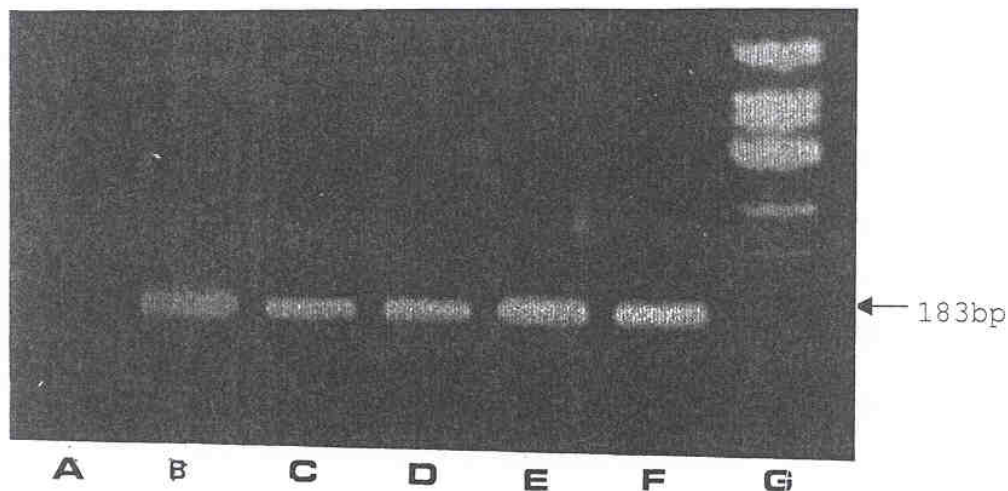
Οι *C. burnetii* βάφονται φούξια ενώ τα κύτταρα ξενιστή με το χρώμα του μαλαχίτη.

Ανίχνευση *C. burnetii* με τη χρήση της nested -PCR.

Η τεχνική nested PCR χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση πλασμιδιακού DNA *C. burnetii* σε buffy coat (στιβάδα των λευκών) από 6 ασθενείς, σε αίμα 3 ασθενών και σε buffy coat 9 δειγμάτων από αιγοπρόβατα (4 από αίγα και 5 από πρόβατο). Επίσης, με τη τεχνική nested PCR, ελέγχθηκαν και οι 141 κρότωνες για την ανίχνευση *C. burnetii* (πίνακας 8). Η τεχνική αυτή εφαρμόστηκε για πρώτη φορά σε σώμα κρότωνα, με επιτυχία.

Συνολικά σε 4 δείγματα από ασθενείς (φωτ. 2), σε 5 από αιγοπρόβατα (φωτ. 3) και σε 11 από κρότωνα (φωτ. 4) ανιχνεύτηκε πλασμιδιακό DNA *C. burnetii*.

Φωτογραφία 2. Ανίχνευση *C. burnetii* σε αίμα και σε buffy coat (στιβάδα λευκών) από ασθενείς με οξεία λοίμωξη πυρετού Q με τη μέθοδο της nested PCR και τη χρήση των εναρκτιών Hfrag1/ Hfrag 2 και HF1/HF2 (πλασμιδιακοί).



Ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αγαρόζης 1,5%.

A: Αρνητικός μάρτυρας (αρνητικό δείγμα buffy coat)

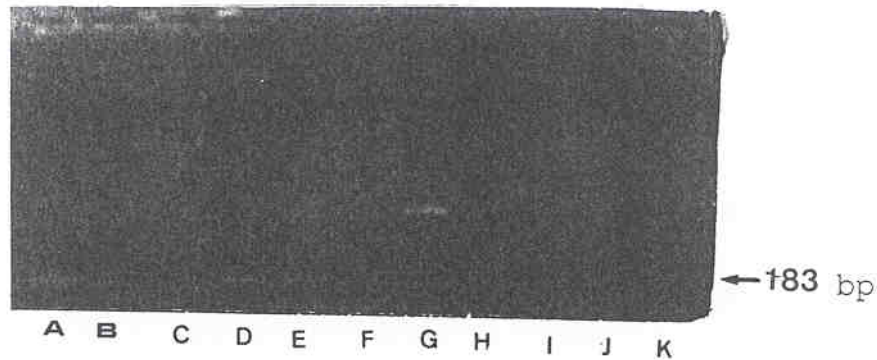
B: Στέλεχος αναφοράς Nine Mile

C: Ανίχνευση *C. burnetii* σε ολικό αίμα ασθενή

D-F: Ανίχνευση *C. burnetii* σε buffy coat από τρεις ασθενείς

G: Molecular size marker (ΦX174/HinfI)

Φωτογραφία 3. Ανίχνευση *C. burnetii* στη στιβάδα των λευκών (buffy coat) από αιγοπρόβατα με τη μέθοδο της nested PCR και τη χρήση των εναρκτιών Hfrag1/ Hfrag 2 και HF1/HF2 (πλασμιδιακοί).



Ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αγαρόζης 1,5%.

A: Στέλεχος αναφοράς Nine Mile.

B-C: Αρνητικοί μάρτυρες (αρνητικό δείγμα buffy coat και αρνητικό δείγμα αίματος αντίστοιχα).

D-E: Ανίχνευση *C. burnetii* σε buffy coat από αίγα.

F: Αρνητικό εξεταζόμενο δείγμα αίγας.

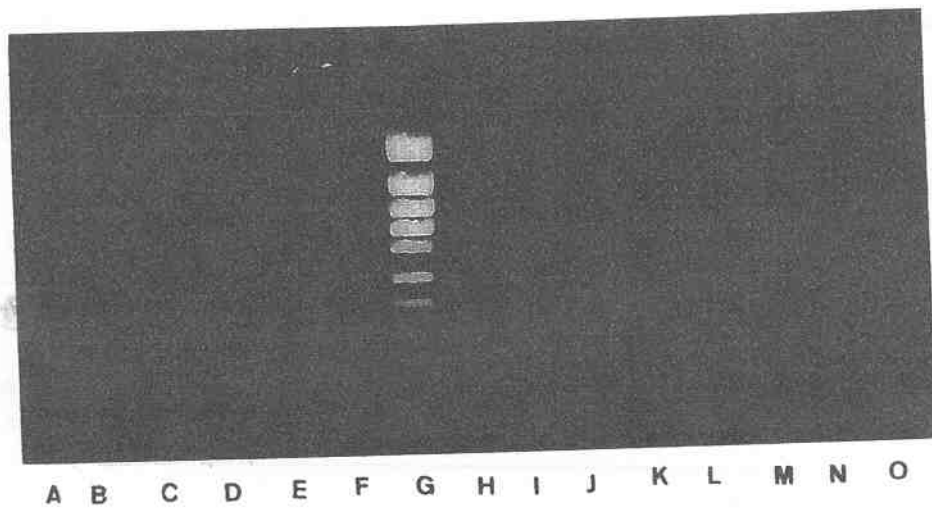
G: Molecular size marker (ΦX174/HinfI)

H-I: Ανίχνευση *C. burnetii* σε buffy coat από πρόβατο.

J: Αρνητικό εξεταζόμενο δείγμα από πρόβατο.

K: Ανίχνευση *C. burnetii* σε buffy coat από πρόβατο.

Φωτογραφία 4. Ανίχνευση *C. burnetii* σε ολικό σώμα κρότιωνα με τη μέθοδο της nested PCR και τη χρήση των εναρκτηών Hfrag1/ Hfrag 2 και HF1/HF2 (πλασμιδιακοί).



Ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αγαρόζης 1,5%.

A, O: Αρνητικοί μάρτυρες (αρνητικός κρότιωνας και δείγμα νερού αντίστοιχα).

B: Στέλεχος αναφοράς Nine Mile.

C-F: Ανίχνευση *C. burnetii* σε σώμα κρότιωνα.

G: Molecular size marker (ΦX174/HaeIII)

H-N: Ανίχνευση *C. burnetii* σε σώμα κρότιωνα.

Πίνακας 8. Ανίχνευση *C. burnetii* με τη χρήση της nested PCR.

	Ανθρωπος		Αίγα		Πρόβατο		Κρότιωνας
	Buffy coat	Αίμα	Buffy coat	Αίμα	Buffy coat	Αίμα	
nested PCR*							
	3/6	1/3	2/4	-	3/5	-	11/142

*: Θετικά δείγματα προς τα ολικά εξεταζόμενα.

Απομόνωση *C. burnetii* χρησιμοποιώντας τη τεχνική των shell vials.

Έγινε προσπάθεια απομόνωσης *C. burnetii*, από αίμα ασθενών με οξεία λοίμωξη πυρετού Q, από αίμα αιγοπροβάτων, από αιμόλεμφο και σώμα κρότωνα, εφαρμόζοντας τη τεχνική των shell vials, σε Vero κύτταρα. Η τεχνική της ταχείας καλλιέργειας εφαρμόστηκε για πρώτη φορά για την απομόνωση *C. burnetii* από ολικό σώμα και αιμόλεμφο κρότωνα, με επιτυχία.

Συνολικά απομονώθηκαν 9 στελέχη *C. burnetii* από ασθενείς (8 από Κρήτη και 1 από Κύπρο), δύο από αιγοπρόβατα, 2 από σώμα και 1 από αιμόλεμφο κρότωνα, μετά από 7-14 ημέρες επώασης στους 37°C και 5% CO₂.

Η ανίχνευση της *C. burnetii* στις μολυσμένες καλλιέργειες των shell vials έγινε μετά από χρώση Gimenez, άμεσο ανοσοφθορισμό και τη τεχνική PCR.

Πίνακας 9. Κλινική εικόνα, Ορολογικά αποτελέσματα, Θεραπεία και απομόνωση στελεχών *C. burnetii* από ασθενείς.

Στέλεχος	Κλινική εικόνα	Θεραπεία	Τίτλος αντισωμάτων φάσης II			Καλλιέργεια (ημέρες) ^β
			IgM	IgG	IgA	
C.B.1	Πυρετός ^α (10)	Vibramycin	3.200	3.840	200	+10
C.B.2	Πνευμονία + Πυρετός (8)	Vibramycin	800	7.680	800	+12
C.B.3	Πνευμονία + Πυρετός (6)	Vibramycin	6.400	30.700	6.900	+11
C.B.4	Πνευμονία + Πυρετός (9)	Macrolide	51.200	61.440	12.800	+8
C.B.5	Πνευμονία + Πυρετός (10)	Macrolide	102.400	122.880	200	+6
C.B.6	Πνευμονία + Πυρετός (6)	Macrolide	3.200	7.680	800	+10
C.B.7	Πνευμονία + Πυρετός (8)	Vibramycin	6.400	30.720	12.800	+8
C.B.8	Πνευμονία + Πυρετός (5)	Macrolide	800	3.840	200	+12
C.B.9	Πνευμονία + Πυρετός (6)	Macrolide	3.200	7.680	800	+12

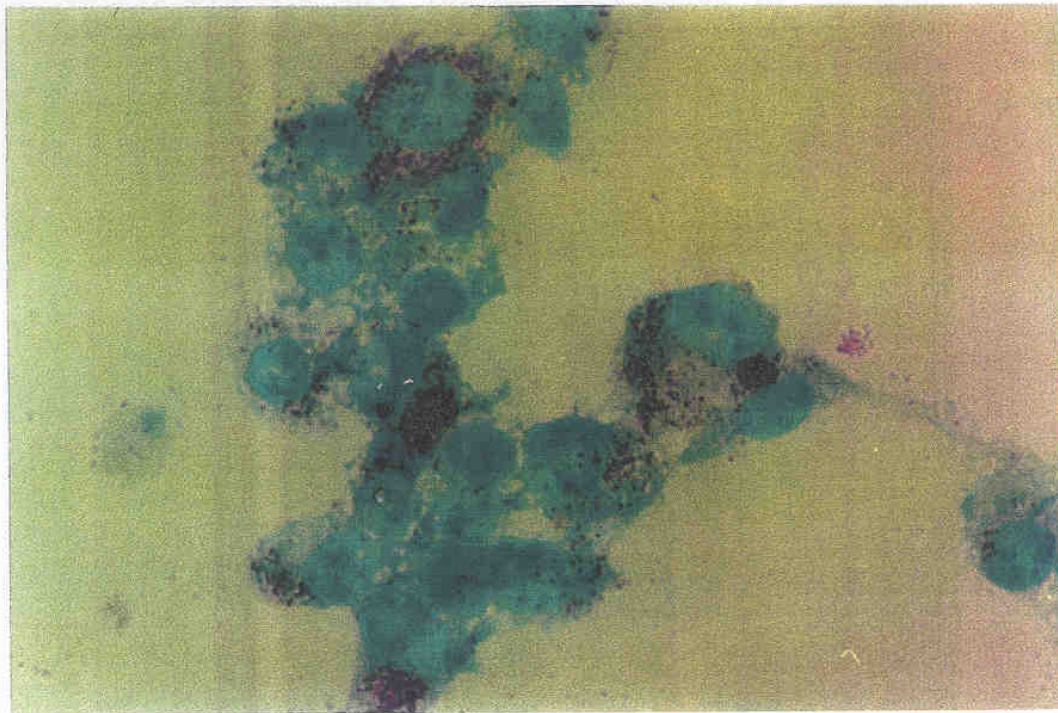
^α: Πυρετός μεγαλύτερος ή ίσος με 38°C.

^β: +, θετικές καλλιέργειες στα shell vial.

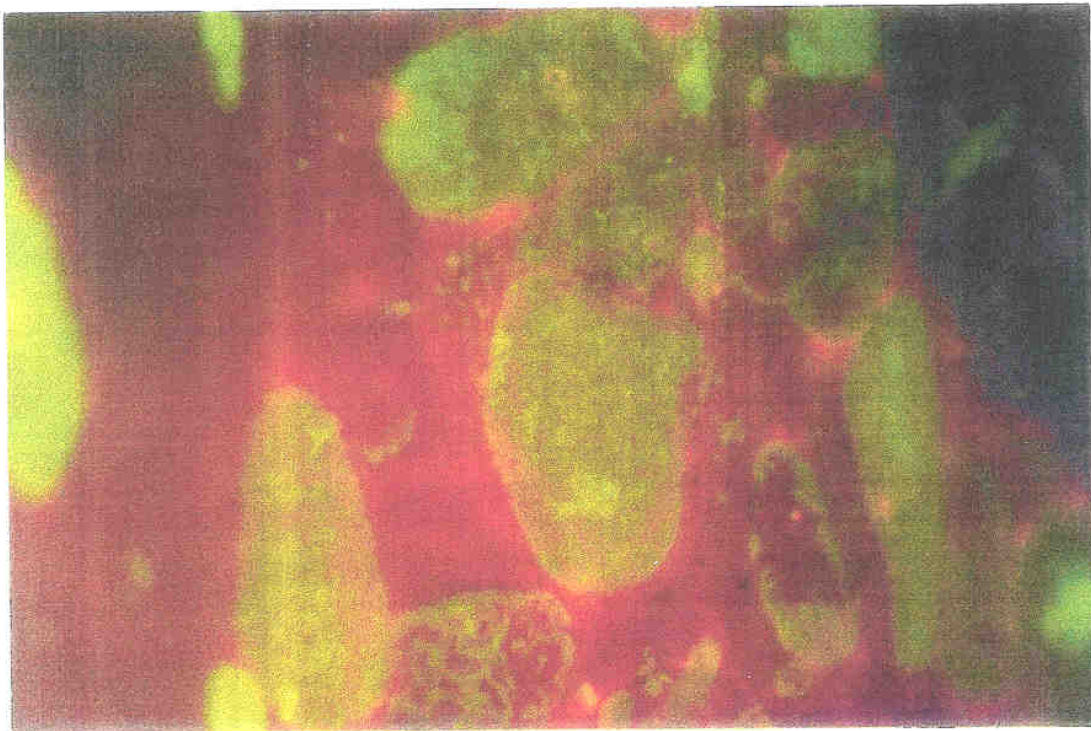
Όπως φαίνεται στον παραπάνω πίνακα η θεραπεία με Vibramycin ή Macrolide δεν επηρέασε τη δυνατότητα απομόνωσης του μικροοργανισμού.

Φωτογραφία 5. Χρώση Gimenez σε Vero κύτταρα μολυσμένα με

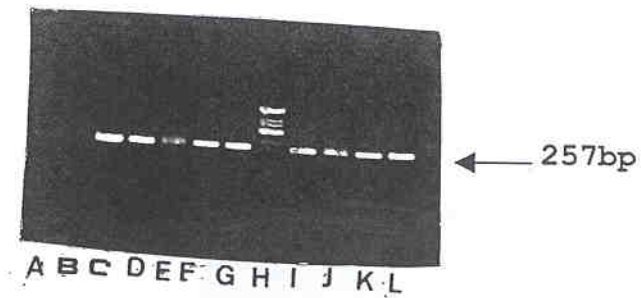
στέλεχος *C. burnetii* που απομονώθηκε από ασθενή.



Φωτογραφία 6. Άμεσος ανοσοφθορισμός σε Vero κύτταρα μολυσμένα με στέλεχος *C. burnetii* που απομονώθηκε από ασθενή.



Φωτογραφία 7. Vero κύτταρα μολυσμένα με τα απομονωθέντα στελέχη *C. burnetii* από ασθενείς με οξεία λοίμωξη πυρετού Q. Ανίχνευση του μικροοργανισμού με τη τεχνική της PCR, χρησιμοποιώντας τους ειδικούς εναρκτές CB1/CB2, για τον πολ/σμό του γονιδίου της υπεροξειδικής δισμουτάσης, της *C. burnetii*.



Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 2%.

A: Στέλεχος αναφοράς Nine Mile.

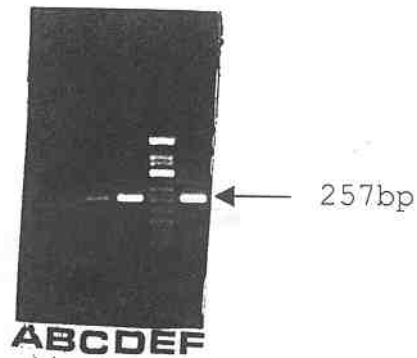
B: Αρνητικός μάρτυρας (φυσιολογικά Vero κύτταρα).

C-G: Θετικά δείγματα.

H: Molecular size marker (ΦX174/HinfI).

I-L: Θετικά δείγματα.

Φωτογραφία 8. Vero κύτταρα μολυσμένα με τα απομονωθέντα στελέχη *C. burnetii* από αιγοπρόβατα. Ανίχνευση του μικροοργανισμού με τη τεχνική της PCR, χρησιμοποιώντας τους ειδικούς εναρκτές CB1/CB2, για τον πολ/σμό του γονιδίου της υπεροξειδικής δισμουτάσης της *C. burnetii*.



Ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αγαρόζης 2%.

A: Αρνητικός μάρτυρας (φυσιολογικά κύτταρα).

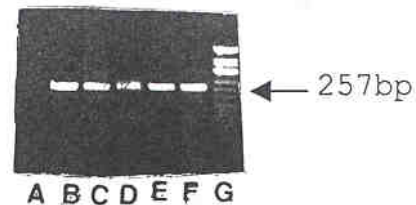
B-C: Θετικά δείγματα.

D: Στέλεχος αναφοράς Nine Mile.

E: Molecular size marker (ΦX174/HinfI).

F: Στέλεχος αναφοράς Q212.

Φωτογραφία 9. Vero κύτταρα μολυσμένα με τα απομονωθέντα στελέχη *C. burnetii* από αιμόλεμφο και σώμα κρότωνα. Ανίχνευση του μικροοργανισμού με τη τεχνική της PCR, χρησιμοποιώντας τους ειδικούς εναρκτές CB1/CB2, για τον πολ/σμό του γονιδίου της υπεροξειδικής δισμουτάσης της *C. burnetii*.



Ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αγαρόζης 2%.

A: Αρνητικός μάρτυρας (φυσιολογικά κύτταρα).

B: Θετική απομόνωση από αιμόλεμφο.

C-D: Θετικές απομονώσεις από σώμα κρότωνα.

E-F: Στέλεχος αναφοράς Nine Mile και Q212.

G: Molecular size marker (ΦX174/HinfI).

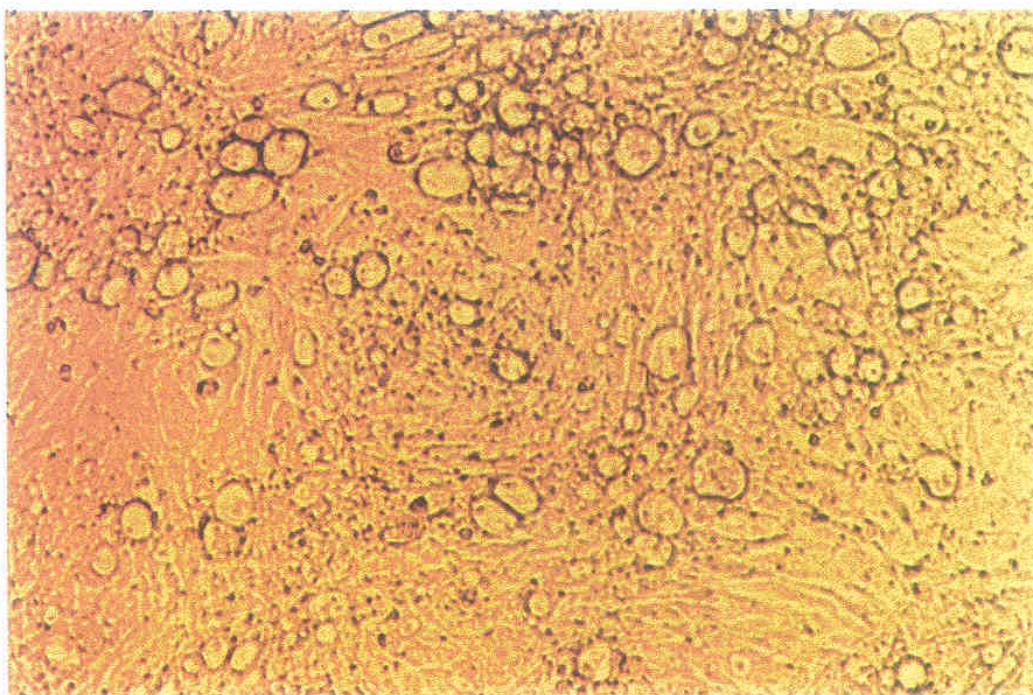
Καλλιέργεια των απομονωθέντων στελεχών *C. burnetii*.

Τα 14 συνολικά απομονωθέντα στελέχη *C. burnetii*, καλλιεργήθηκαν σε Vero κύτταρα για την μαζική παραγωγή του μικροοργανισμού.

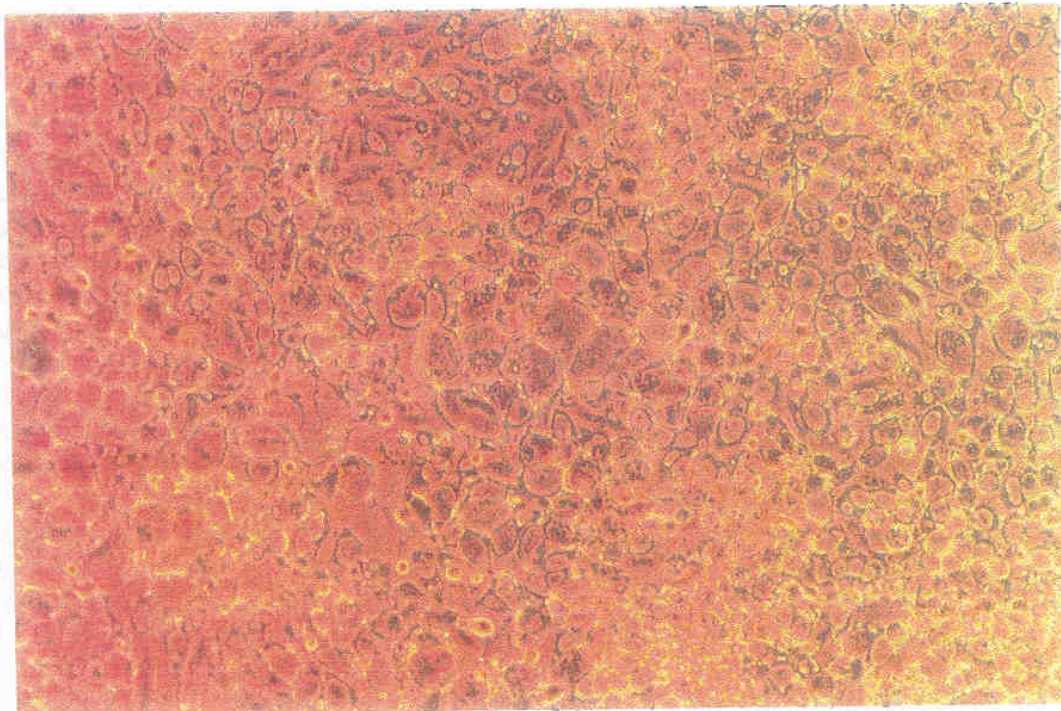
Ο έλεγχος ανάπτυξης της *C. burnetii* στην κυτταροκαλλιέργεια έγινε μετά από εφαρμογή της χρώσης Gimenez, και η κυτταροπαθογόνος δράση της *C. burnetii*, στα Vero κύτταρα, ήταν εμφανής μετά από 15 έως 21 ημέρες επώσης της μολυσμένης καλλιέργειας στους 35°C / 5% CO₂ (Φωτογραφίες 10, 11).

Vero κύτταρα μολυσμένα με τα απομονωθέντα στελέχη *C. burnetii* από άνθρωπο, αιγοπρόβατα και κρότωνα έχουν φυλαχτεί στους -80°C για περαιτέρω μελέτη.

Φωτογραφία 10. Αρχή της κυτταροπαθογόνου δράσης της *C. burnetii* σε Vero κύτταρα.



Φωτογραφία 11. Vero κύτταρα 100% μολυσμένα με *C. burnetii*.



Ταυτοποίηση των απομονωθέντων στελεχών *C. burnetii*, μετά από χρήση των τεχνικών PCR-RFLP και sequencing.

PCR-RFLP

Για την ταυτοποίηση της *C. burnetii* εφαρμόστηκαν οι τεχνικές PCR-RFLP σε Vero κύτταρα μολυσμένα με τα απομονωθέντα στελέχη. Η γενετική ανάλυση βασίστηκε στον γενωμικό πολλαπλασιασμό του γονιδίου της υπεροξειδικής δισμουτάσης, χρησιμοποιώντας ειδικούς για την *C. burnetii* εναρκτές (CB1-CB2) και την μετέπειτα ανάλυση των προϊόντων της PCR με την επίδραση περιοριστικών ενζύμων (RFLP).

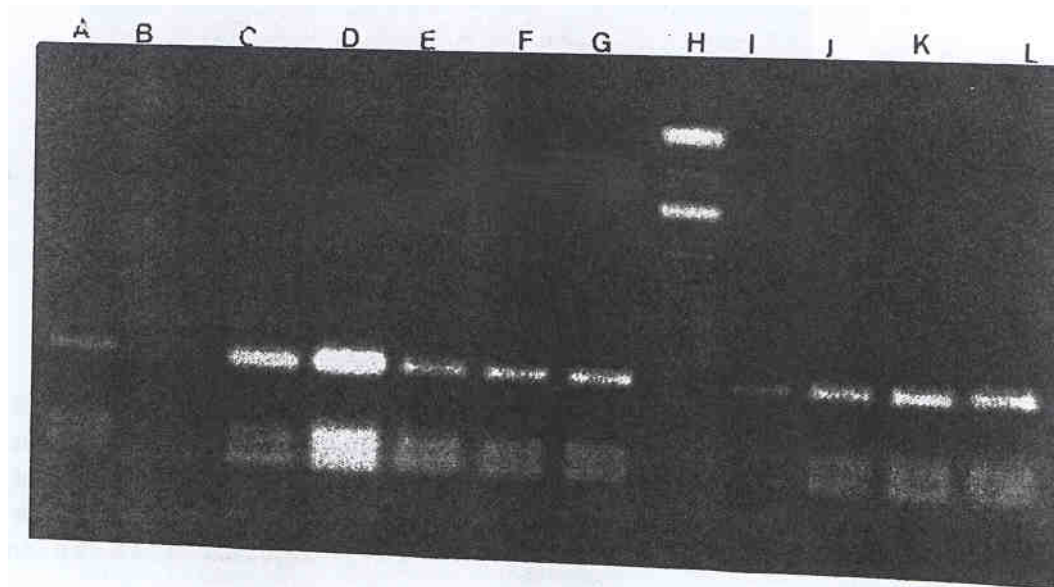
Το ειδικό προϊόν των 257bp της PCR, μετά από χρήση των εναρκτών CB1-CB2, ήταν εμφανές σε όλα τα απομονωθέντα στελέχη *C. burnetii* και στα στελέχη αναφοράς Nine Mile (οξείας λοίμωξης) και Q212 (χρόνιας λοίμωξης).

Η κατατομή των κλασμάτων του DNA μετά από την επίδραση του περιοριστικού ενζύμου AluI, στο προϊόν της PCR (257bp) ήταν: 186-68-3 bp (φωτ. 12, 13) ενώ μετά από την επίδραση στο ίδιο προϊόν με το περιοριστικό ένζυμο TaqI, τα κλάσματα του DNA ήταν: 118-57- 43- 39 bp (φωτ. 14, 15). Η κατατομές των κλασμάτων του DNA στα απομονωθέντα στελέχη, μετά την εφαρμογή της τεχνικής RFLP, βρέθηκε ταυτόσημη με αυτή των στελεχών αναφοράς Nine Mile και Q212.

Τα απομονωθέντα στελέχη παρουσίασαν την ίδια αλληλουχία βάσεων μετά από sequencing στα προϊόντα της PCR (πίνακας 10). Τα αποτελέσματα των τεχνικών PCR-RFLP και Sequencing έδειξαν ότι δεν υπάρχει ετερογένεια μεταξύ των απομονωθέντων στελεχών και των στελεχών αναφοράς Nine Mile και Q212.

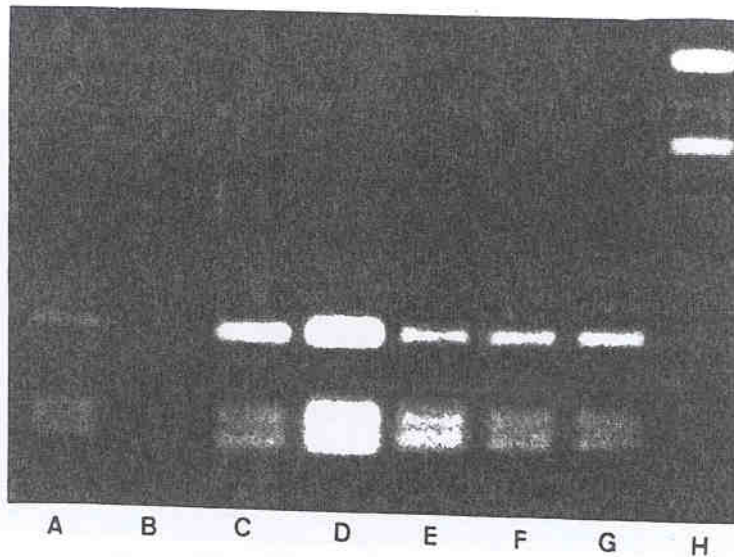
Η τεχνική της PCR εφαρμόστηκε επίσης στα απομονωθέντα στελέχη *C. burnetii* από ασθενείς, αιγοπρόβατα και κρότνες, χρησιμοποιώντας το ζεύγος των γενωμικών εναρκτών G4131-G4132 και των ριβοσωμικών 16S1-16S2N (Φωτ. 16). Όλα τα δείγματα έδωσαν τη χαρακτηριστική μπάνα των 183bp και 779 bp αντίστοιχα.

Φωτογραφία 12. Γονοτυπική ταυτοποίηση των απομονωθέντων στελεχών *C. burnetii* από ασθενείς με τη χρήση της PCR-RFLP. Επίδραση στα προϊόντα της PCR (257bp) με το περιοριστικό ένζυμο AluI. Η κατατομή των κλασμάτων του DNA φαίνεται μετά από ηλεκτροφόρηση σε πηκτική LMP αγαρόζη 3%.



A: Στέλεχος αναφοράς Nine Mile.
B: Αρνητικός μάρτυρας (φυσιολογικά κύτταρα).
C-G: Θετικά δείγματα.
H: Molecular size marker (ΦX174/HinfI).
I-L: Θετικά δείγματα.

Φωτογραφία 13. Γονοτυπική ταυτοποίηση των απομονωθέντων στελεχών *C. burnetii* από αιγοπρόβατα και κρότνες. Επίδραση στα προϊόντα της PCR (257bp) με το περιοριστικό ένζυμο AluI. Η κατατομή των κλασμάτων του DNA φαίνεται μετά από ηλεκτροφόρηση σε πηκτή LMP αγαρόζης 3%.



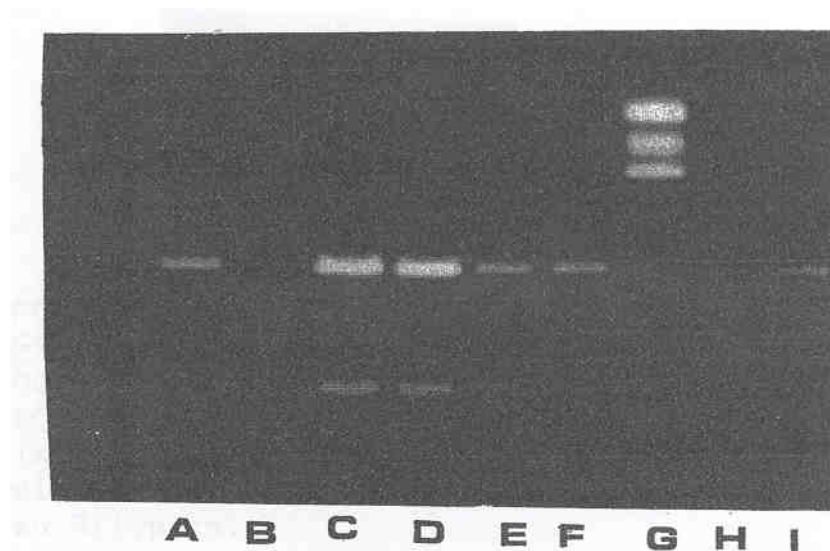
A: Στέλεχος αναφοράς Nine Mile.
B: Αρνητικός μάρτυρας (Φυσιολογικά κύτταρα).
C-D: Θετικά δείγματα από αιγοπρόβατα.
E-G: Θετικά δείγματα από αιμόλεμφο και σώμα κρότνας.
H: Molecular size marker (ΦX174/HinfI).

Φωτογραφία 14. Γονοτυπική ταυτοποίηση των απομονωθέντων στελεχών *C. burnetii* από ασθενή με τη τεχνική PCR-RFLP. Επίδραση στα προϊόντα της PCR (257bp) με το περιοριστικό ένζυμο TaqI. Η κατατομή των κλασμάτων του DNA φαίνεται μετά από ηλεκτροφόρηση σε πηκτή LMP αγαρόζης 3%.



A: Στέλεχος αναφοράς Nine Mile.
B: Αρνητικός μάρτυρας (φυσιολογικά κύτταρα).
C-F: Θετικά δείγματα.
G: Molecular size marker (ΦX174/HinfI).
H-K: Θετικά δείγματα.

Φωτογραφία 15. Γονοτυπική ταυτοποίηση των απομονωθέντων στελεχών *C. burnetii* αιγοπρόβατα και κρότωνα με τη τεχνική PCR-RFLP. Επίδραση στα προϊόντα της PCR (257bp) με το περιοριστικό ένζυμο *TaqI*. Η κατατομή των κλασμάτων του DNA φαίνεται μετά από ηλεκτροφόρηση σε πηκτή LMP αγαρόζης 3%.



A: Στέλεχος αναφοράς Nine Mile.
 B: Αρνητικός μάρτυρας (φυσιολογικά κύτταρα).
 C-D: Θετικά δείγματα από σώμα κρότωνα.
 E: Θετικό δείγμα από αιμόλεμφο.
 F: Στέλεχος αναφοράς Q212.
 G: Molecular size marker (ΦX174/*HinfI*).
 H-I: Θετικά δείγματα από αιγοπρόβατα.

Η κατατομή ζωνών των απομονωθέντων στελεχών *C. burnetii* βρέθηκε ταυτόσημη μ'αυτή των στελεχών αναφοράς Nine Mile και Q212, ανεξάρτητα από τη γεωγραφική προέλευση των δειγμάτων, τον ξενιστή και τη διαφορετική κλινική εικόνα των ασθενών με πυρετό Q.

Φωτογραφία 16. Ανίχνευση των απομονωθέντων στελεχών *C. burnetii* χρησιμοποιώντας τη τεχνική PCR και τους εναρκτές:

- 1) G4131-G4132 (γενωμικοί) και
- 2) 16S1-16S2N (ριβοσωμικοί).

1)



Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR, μετά από χρήση των εναρκτιών G4131-G4132, σε πηκτική αγαρόζης 2%.

A: Στέλεχος αναφοράς Nine Mile.

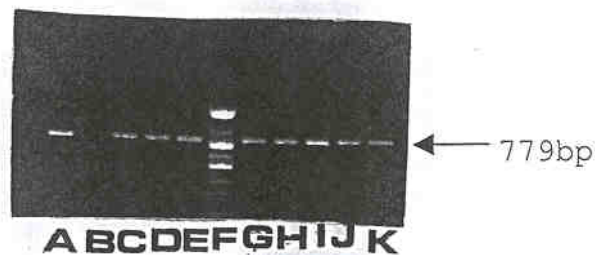
B: Αρνητικός μάρτυρας (φυσιολογικά κύτταρα).

C- F: Θετικά δείγματα.

G: Molecular size marker (Φ X174/HinfI).

H-K: Θετικά δείγματα.

2)



των προϊόντων της PCR, μετά από χρήση των εναρκτιών 16S1-16S2N, σε πηκτική αγαρόζης 2%.

A: Στέλεχος αναφοράς Nine Mile.

B: Αρνητικός μάρτυρας (φυσιολογικά κύτταρα).

C- E: Θετικά δείγματα.

F: Molecular size marker (PUC 19/Sau 3AI- PUC 19/TaqI).

G-K: Θετικά δείγματα.

Πίνακας 10. Αλληλουχία του γονιδίου της υπεροξειδικής
δισμουτάσης της *C. burnetii*.

1 ATGGCTTTTGAATTACCGGATTGCCCTACAACTCAACGCACTGGAACCGGATATCTCT 60
M A F E L P D L P Y K L N A L E P H I S

61 CAAGAAACGCTCGAATATCACCACGGAAAAACCATAGAGCTTATGTCAATAAACTCAAC 120
Q E T L E Y H H G K H H R A Y V N K L N

121 AAATTATCGAAGGCACCCCTTTTGAAAAGGAACCTCTGGAAGAAATATTGCGAAAATCC 180
K L I E G T P F E K E P L E E I I R K S

181 GACGGCGGAATCTTCAACAATGCAGCACAACATTGGAACCATACATTTTATTGGCACTGC 240
D G G I F N N A A Q H W N H T F Y W H C

241 ATGAGCCCTGATGGCGGTGGAGATCCTTCTGCGAATTGGCTTCAGCTATTGATAAACT 300
M S P D G G G D P S G E L A S A I D K T

301 TTTGGATCTTTAGAGAAATTTAAAGCGCTTTTACCGACTCCGCAAATAATCATTTTCGGC 360
F G S L E K F K A L F T D S A N N H F G

361 TCGGATGGGCTTGGCTCGTTAAAGATAACAATGGCAAATTAGAAGTCTTAAGCACTGTC 420
S G W A W L V K D N N G K L E V L S T V

421 AACGCTCGTAATCCCATGACTGAAGGCAAAAACCCCTAATGACTTGTGATGTTTGGGAA 480
N A R N P M T E G K K P L M T C D V W E

481 CACGCCTATTACATCGATACCCGGAACGACCGCCCAATACGTTAATAACTTTGGCAA 540
H A Y Y I D T R N D R P K Y V N N F W Q

541 GTGGTCAATTGGGATTTGTGATGAAAACTTCAAATCCTAA 582
V V N W D F V M K N F K S

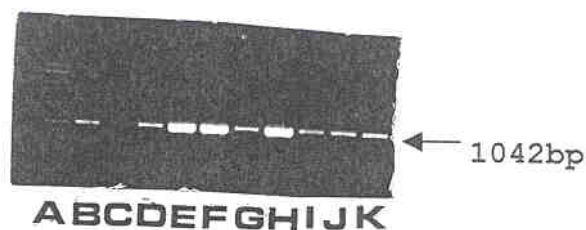
Έλεγχος των πλασμιδίων των απομονωθέντων στελεχών *C. burnetii* χρησιμοποιώντας τη τεχνική της PCR.

Οι εναρκτές QpH11-QpH12 κωδικοποιούν μια αλληλουχία 1042 ζευγών βάσεων του πλασμιδίου της οξείας λοίμωξης της *C. burnetii* ενώ οι QpRS01-QpRS02 κωδικοποιούν μια αλληλουχία 363 ζευγών βάσεων του πλασμιδίου της χρόνιας λοίμωξης της *C. burnetii*.

Εφαρμόζοντας τη τεχνική PCR και χρησιμοποιώντας τους πλασμιδιακούς εναρκτές QpH11-QpH12 και QpRS01-QpRS02, έγινε προσπάθεια ανίχνευσης του είδους των πλασμιδίων των απομονωθέντων στελεχών της *C. burnetii*.

Τα απομονωθέντα στελέχη *C. burnetii* από ασθενείς με οξεία λοίμωξη πυρετού Q, βρέθηκαν θετικά στη PCR μόνο μετά από χρήση των εναρκτών QpH11-QpH12 (Φωτ. 17).

Φωτογραφία 17. Ανίχνευση πλασμιδίων οξείας λοίμωξης με τη τεχνική της PCR και τη χρήση των εναρκτών QpH11-QpH12. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1,5%.



- A: Molecular size marker (DNA ladder 1000-3000bp)
 B: Στέλεχος αναφοράς Nine Mile.
 C: Αρνητικός μάρτυρας (φυσιολογικά κύτταρα).
 D-K: Θετικά απομονωθέντα στελέχη *C. burnetii* από ασθενείς με οξεία λοίμωξη πυρετού Q.

♦ **Clarithromycin και vibramycin.**

Τα 9 απομονωθέντα στελεχή *C. burnetii* από ασθενή με οξεία λοίμωξη πυρετού Q και τα δύο στελέχη αναφοράς Nine Mile και Q212 ελέγχθησαν στα αντιβιοτικά clarithromycin και vibramycin για τον προσδιορισμό καλύτερης θεραπευτικής αγωγής για τον πυρετό Q. Ο έλεγχος ευαισθησίας έγινε *in vitro*, σε Vero κύτταρα, χρησιμοποιώντας τις τεχνικές των shell vials και του άμεσου ανοσοφθορισμού.

Οι τιμές των MICs στα παραπάνω αντιβιοτικά ήταν από 2-4 $\mu\text{g/ml}$ για την clarithromycin και από 1-2 $\mu\text{g/ml}$ για την vibramycin (πιν. 12).

Πίνακας 12.

MIC	ΤΩΝ	ΑΠΟΜ/ΝΤΩΝ	ΣΤΕΛΕΧΩΝ (μg/ml)								
Αντιβιοτικό	Nine Mile	Q212	CP1	CP2	CP3	CP4	CP5	CP6	CP7	CP8	CP9
Clarithromycin	2	4	4	2	2	2	2	2	2	2	2
Vibramycin	1	2	2	1	1	2	1	1	1	1	1

Προσδιορισμός βακτηριοκτόνου δράσης.

♦ Τροβαφλοξασίνη:

Για πρώτη φορά εξετάστηκε η δράση, *in vitro*, της trovafloxacin στη *C. burnetii*. Η μελέτη έγινε σε Vero κύτταρα μολυσμένα με το στέλεχος αναφοράς Nine Mile ή Q212. Τα στελέχη αυτά μετατράπηκαν σε επίμονα μολυσμένα κύτταρα μετά από καλλιέργεια τους για περίπου 5 μήνες στα ίδια κύτταρα ξενιστή.

Η μελέτη έδειξε ότι η trovafloxacin στην συγκέντρωση των 4 μg/ml δεν παρουσιάζει βακτηριοκτόνο δράση για την *C. burnetii* (πιν. 13).

Πίνακας 13. Μελέτη βακτηριοκτόνου δράσης της trovafloxacin.

Στέλεχος	trovafloxacin
Nine Mile ^a	10 ⁻⁵
Nine Mile ^b (επώαση 24 ώρες με pefloxacin)	10 ⁻⁵
Q212 ^a	10 ⁻⁷
Q212 ^b (επώαση 24 ώρες με pefloxacin)	10 ⁻⁷

Τίτλος πρόσφατων^a Vero κυττάρων, μολυσμένων με το στέλεχος Nine Mile ή Q212 και των αντίστοιχων επίμονων^b Vero μολυσμένων κυττάρων, μετά από 24 ώρες επώασης με 4 μg/ml trovafloxacin.

Σύγκριση των MICs, των απομονωθέντων στελεχών *C. burnetii* μεταξύ τους και με τις MICs των στελεχών αναφοράς, Nine Mile και Q212, στα εξεταζόμενα αντιβιοτικά.

Πίνακας 14.

	Pefl/cin	Ofl/cin	Cipr/cin	Trov/cin	Clar/mycin	Dox/ine
PCS ^a	3.8	3	1.6	2.2	4	4.4
Στέλεχος	MIC ^b					
Nine Mile	1	1	4	1	2	1
Q212	4	2	8	2	4	2
CP1	4	2	8	2	4	2
CP2	1	1	4	1	2	1
CP3	1	1	4	1	2	1
CP4	2	1	4	1	2	2
CP5	1	1	4	1	2	1
CP6	1	1	4	1	2	1
CP7	1	1	4	1	2	1
CP8 1	1	1	4	1		2
CP9 1		2	1	1	1	4

^a: Serum PIC concentrations ($\mu\text{g/ml}$) with a single dose of antibiotic.

^b: Minimal Inhibitory Concentration.

Η μελέτη ευαισθησίας των απομονωθέντων στελεχών *C. burnetii* και των δύο στελεχών αναφοράς Nine Mile και Q212 στα παραπάνω εξεταζόμενα αντιβιοτικά έδειξε ότι:

1. Οι τεχνικές των shell vials και του άμεσου ανοσοφθορισμού μπορούν να εφαρμοστούν, με επιτυχία, στη μελέτη της ευαισθησίας ενδοκυττάρων βακτηρίων μιας και δεν μπορούν να εφαρμοστούν οι κλασικές μέθοδοι υπολογισμού της MIC των εξωκυττάρων βακτηρίων.
2. Τα απομονωθέντα στελέχη *C. burnetii*, καθώς και τα στελέχη αναφοράς Nine Mile και Q212 παρουσιάζουν μεγαλύτερη ευαισθησία στην ofloxacin, trovafloxacin και doxycycline με MICs από 1-2 µg/ml. Ακολουθούν η refloxacin με MIC 1-4 µg/ml, η clarithromycin με 2-4 µg/ml και τέλος η ciprofloxacin με 4-8 µg/ml.
3. Η trovafloxacin μπορεί να χρησιμοποιηθεί εναλλακτικά στη θεραπευτική αγωγή της οξείας λοίμωξης πυρετού Q.
4. Η trovafloxacin, όπως και τα άλλα αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται στη θεραπεία του πυρετού Q, δεν έχουν βακτηριοκτόνο δράση για τη *C. burnetii*.

2. ΜΕΛΕΤΗ ΑΝΤΟΧΗΣ ΤΗΣ *C. burnetii* ΣΤΙΣ ΚΙΝΟΛΟΝΕΣ.

Έλεγχος ευαισθησίας των *in vitro* ανθεκτικών στελεχών, στις κινολόνες.

Προκειμένου να μελετηθεί η αντοχή της *C. burnetii* στις κινολόνες, δύο ευαίσθητα απομονωθέντα στελέχη από ασθενή με οξεία λοίμωξη πυρετού Q (SCP2 και SCP4), μετατράπηκαν *in vitro*, σε στελέχη αντοχής στη refloxacin. Η μετατροπή έγινε μετά από καλλιέργεια των ευαίσθητων στελεχών σε θρεπτικό υλικό παρουσία του αντιβιοτικού.

Όταν η συγκέντρωση της refloxacin ήταν 5µg/ml στο θρεπτικό υλικό καλλιέργειας, η MIC των καλλιεργούμενων σ' αυτό απομονωθέντων στελεχών ήταν 32 και 64 µg/ml. Έγινε έλεγχος ευαισθησίας, των *in vitro* ανθεκτικών στη refloxacin στελεχών *C. burnetii*, και στις άλλες κινολόνες. Τα *in vitro* ανθεκτικά στη refloxacin στελέχη, παρουσίασαν αντοχή σε άλλες τις κινολόνες κατά δύο αραιώσεις. Μεγαλύτερη αντοχή παρατηρήθηκε στη ciprofloxacin (64 µg/ml) (πιν. 15).

Πίνακας 15. MICs της refloxacin και ciprofloxacin των ευαίσθητων^a και των αντίστοιχων *in vitro* ανθεκτικών^b στη refloxacin στελεχών *C. burnetii*.

MIC

(µg/ml) :

Isolate	Pefloxacin	Ciprofloxacin
SCP2 ^a	1	4
RCP2 ^b	32	64
SCP4 ^a	2	4
RCP4 ^b	64	64

Έλεγχος πολλαπλής αντοχής, των *in vitro* ανθεκτικών στη *refloxacin* στελεχών.

Στη συνέχεια έγινε έλεγχος ευαισθησίας των στελεχών αντοχής, στα αντιβιοτικά *vibramycin* και *clarithromycin* για την ανίχνευση πολλαπλής αντοχής. Παρατηρήθηκε μια μικρή αύξηση της MIC στα εξεταζόμενα αντιβιοτικά (πίν. 16).

Πίνακας 16. MICs της *vibramycin* και *clarithromycin* των ευαίσθητων^α και των αντίστοιχων *in vitro* ανθεκτικών^β στη *refloxacin* στελεχών *C. burnetii*.

MIC (μg/ml)

Στέλεχος	Αντιβιοτικό	
	Vibr/cin	Clar/cin
SCP2 ^α	1	2
RCP2 ^β	2	4
SCP4 ^α	1	2
RCP4 ^β	2	4

◆ Ρόλος της DNA γυράσης στην *in vitro* αντοχή της *C. burnetii*.

Μελέτη της περιοχής QRDR της γυράσης A.

Προκειμένου να μελετηθεί η αντοχή της *C. burnetii* στις κινολόνες, δύο ευαίσθητα και τα αντίστοιχα ανθεκτικά στελέχη *C. burnetii* εξετάστηκαν στη περιοχή QRDR του γονιδίου *gyrA* της *C. burnetii*. Σαν μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν τα στελέχη αναφοράς Nine Mile και Q212.

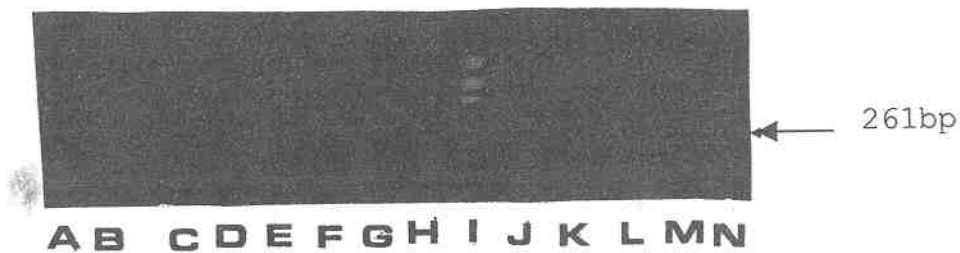
Η ανάλυση βασίστηκε στον πολλαπλασιασμό της περιοχής QRDR του γονιδίου *gyrA* της *C. burnetii* εφαρμόζοντας τη τεχνική PCR. Η ανίχνευση της περιοχής QRDR ήταν δυνατή σε όλα τα εξεταζόμενα στελέχη *C. burnetii*. Το προϊόν της PCR ήταν 261bp (φωτ. 18).

Στη συνέχεια έγινε μελέτη της αλληλουχίας της περιοχής QRDR του γονιδίου *gyrA*, χρησιμοποιώντας τη τεχνική του sequencing, κατευθείαν στο προϊόν της PCR ευαίσθητων και ανθεκτικών στελεχών *C. burnetii*. Βρέθηκε μια σημειακή μετάλλαξη, στα ανθεκτικά στελέχη, στο κωδικόνιο που αντιστοιχεί στη θέση 87 του γονιδίου *gyrA* της *E. coli*. Τα ευαίσθητα στη *refloxacin* στελέχη *C. burnetii* παρουσίασαν στην θέση 159, της περιοχής QRDR, τη βάση G ενώ τα ανθεκτικά στελέχη τη βάση A (πίνακας 17).

Η αλλαγή της βάσης (G →A), στην αλληλουχία των νουκλεοτιδίων, είχε σαν αποτέλεσμα την μετατροπή του γλουταμινικού οξέως (GAG) σε λυσίνη (AAG) (πίνακας 18). Η αλλαγή αυτή αντιστοιχεί στη θέση 87 των αμινοξέων της *E. coli* (πίνακας 19).

Η μετάλλαξη στη περιοχή QRDR του γονιδίου *gyrA* της *C. burnetii*, ήταν εμφανής σε όλα τα στελέχη με MIC >/8μg/ml.

Φωτογραφία 18. Εφαρμογή της τεχνικής PCR, για την ανίχνευση της περιοχής QRDR του γονιδίου *gyrA* της *C. burnetii*, σε ευαίσθητα και *in vitro* ανθεκτικά στη *refloxacin* στελέχη.



- A: Στέλεχος αναφοράς Nine Mile.
- B: Αρνητικός μάρτυρας (φυσιολογικά κύτταρα).
- C: Στέλεχος αναφοράς Q212.
- D-H: Θετικές απομονώσεις από άνθρωπο.
- I: Molecular size marker (ΦX174/HinfI).
- J-M: Θετικές απομονώσεις από άνθρωπο.
- N: Θετική απομόνωση από αίγα.

Πίνακας 17. Αλληλουχία των νουκλεοτιδίων της περιοχής QRDR του γονιδίου *gyrA*, ευαίσθητων (γραμμή 1) και ανθεκτικών (γραμμή 2) στη *refloxacin* στελεχών *C. burnetii*.

```

1
1} TTGCGCATAT CGCAGACGGT TTAAAGCCCG TCCAGCGTCG AATCGTGTAC
2} TTGCGCATAT CGCAGACGGT TTAAAGCCCG TCCAGCGTCG AATCGTGTAC
Consensus TTGCGCATAT CGCAGACGGT TTAAAGCCCG TCCAGCGTCG AATCGTGTAC

51
1} GCCATGTCAG AATTGGGTTT AAAATCAACC GCTAAGTATA AGAAATCAGC
2} GCCATGTCAG AATTGGGTTT AAAATCAACC GCTAAGTATA AGAAATCAGC
Consensus GCCATGTCAG AATTGGGTTT AAAATCAACC GCTAAGTATA AGAAATCAGC

101
1} GCGGACGGTA GCGGACGTTT TGGGTAAATT CCATCCGCAC GGAGACACCG
2} GCGGACGGTA GCGGACGTTT TGGGTAAATT CCATCCGCAC GGAGACACCG
Consensus GCGGACGGTA GCGGACGTTT TGGGTAAATT CCATCCGCAC GGAGACACCG

151
1} CCTGTTACGA GGCCATGGTA TTGATGGCCC AACCTTTTTTC ATTTTCGCTAT
2} CCTGTTACAA GGCCATGGTA TTGATGGCCC AACCTTTTTTC ATTTTCGCTAT
Consensus CCTGTTAC-A GGCCATGGTA TTGATGGCCC AACCTTTTTTC ATTTTCGCTAT

201
1} CCCTTTGTCG ATGGGCAAGG CAATTGGGGG AGCGCGGATG ATCCCAAATC
2} CCCTTTGTCG ATGGGCAAGG CAATTGGGGG AGCGCGGATG ATCCCAAATC
Consensus CCCTTTGTCG ATGGGCAAGG CAATTGGGGG AGCGCGGATG ATCCCAAATC

251
1} CTTTGCCGCC A
2} CTTTGCCGCC A
Consensus CTTTGCCGCC A

```

Πίνακας 18. Αλληλουχία των νουκλεοτιδίων και των αμινοξέων ευαίσθητων στελεχών *C. burnetii* και σύγκριση μ'αυτά των ανθεκτικών *in vitro* στη pefloxacin στελεχών *C. burnetii* *.

```

TTGCGCATATCGCAGACGGTTTAAAGCCCGTCCAGCGTCGAATCGTGTACGCCATGTCAGAATTGGGTT
---A--H--I--A--D--G--L--K--P--V--Q--R--R--I--V--Y--A--M--E--L--E--T--
      35          40          45          50          55

TAAAAATCAACCGCTAAGTATAAGAAATCAGCGCGGACGGTAGGCGACGTTTTGGGTAAATTCATCCGC
L--K--S--T--A--K--Y--K--K--S--A--R--T--V--G--D--V--L--G--K--F--H--P--
      60          65          70          75

ACGGAGACACCGCCTGTTACGAGGCCATGGTATTGATGGCCCAACCTTTTTTCATTCGCTATCCCTTG
H--G--D--T--A--C--Y--E--A--M--V--L--M--A--Q--P--F--S--F--R--Y--P--F--
      80          85          87          90          95          100

TCGATGGGCAAGGCAATTGGGGGAGCGCGGATGATCCCAAATCCTTTGCCGCCA
V--D--G--Q--G--N--W--G--S--A--D--D--P--K--S--F--A--A--
      105          110

115          120

```

Πίνακας 19. Αλληλουχία αμινοξέων της GyrA της *C. burnetii* (CB GyrA) και σύγκριση της μ'αυτή των ανθεκτικών στη pefloxacin (PCBR GyrA) και στη ciprofloxacin (CCBR GyrA) στελεχών *C. burnetii*. Σύγκριση και με την αλληλουχία των αμινοξέων της *E. coli* (EC GyrA).

```

1) ARTVGDVLGKFHPHGDTACYEAMVLMAQPFSFRYPFVDGQ      CB
GyrA
2) -----K-----
-----PCBR GyrA
3) -----G-----
-----CCBR GyrA
4) ---V-----I---V-----S-V-DTI---R-----
---L---ML-----EC GyrA

```

Ανίχνευση ανθεκτικών, στις κινολόνες, στελεχών *C. burnetii* με τη χρήση της PCR-RFLP.

Μετά το πολλαπλασιασμό της περιοχής QRDR του γονιδίου *gyrA* της *C. burnetii*, χρησιμοποιώντας τη τεχνική PCR, έγινε μελέτη της αλληλουχίας των προϊόντων του DNA. Χρησιμοποιώντας τη τεχνική sequencing βρέθηκε μια σημειακή μετάλλαξη στην αλληλουχία των νουκλεοτιδίων των στελεχών αντοχής.

Εφαρμόζοντας το πρόγραμμα GCG Wisconsin PACKAGE, στην αλληλουχία της περιοχής QRDR του γονιδίου *gyrA* της *C. burnetii*, καθορίστηκαν τα περιοριστικά ένζυμα τα οποία "κόβουν" την αλληλουχία των ευαίσθητων και ανθεκτικών στελεχών *C. burnetii* (πίνακες 20 και 21).

Στη συνέχεια για την ανίχνευση της μετάλλαξης στα στελέχη αντοχής επιχειρήθηκε η εφαρμογή της τεχνικής PCR-RFLP. Η τεχνική της PCR εφαρμόστηκε σε όλα τα στελέχη *C. burnetii* με υψηλές τιμές MIC στη pefloxacin (MIC >/8 µg/ml) και ciprofloxacin (MIC >32µg/ml), καθώς επίσης και στα αντίστοιχα ευαίσθητα απομονωθέντα στελέχη *C. burnetii*. Μετά από τον πολλαπλασιασμό της περιοχής QRDR του γονιδίου *gyrA* της *C. burnetii*, σε ευαίσθητα και ανθεκτικά στελέχη, ακολούθησε η επίδραση περιοριστικών ενζύμων στα προϊόντα της PCR. Τα περιοριστικά ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν είναι το *MnII*, *HaeIII*, *HinfI* και το *XcmI*.

Το περιοριστικό ένζυμο *MnII* "κόβει" μόνο τα προϊόντα της PCR που προέρχονται από τα ευαίσθητα στελέχη παράγοντας δύο κλάσματα 152 και 109 bp (φωτ. 19). Τα ένζυμα *HaeIII*, *HinfI* και το *XcmI* "κόβουν" προϊόν της PCR προερχόμενο και από τα ευαίσθητα και από τα ανθεκτικά στελέχη *C. burnetii*.

Όπως φαίνεται στη φωτογραφία 20, με τη ταυτόχρονη χρήση των ενζύμων *MnII* και *HaeIII*, παράγονται 4 κλάσματα με 152, 84, 15 και 10 bp. Τα ένζυμα *MnII* και *HinfI* παράγουν 3 κλάσματα με 112, 109 και 40 bp στο ευαίσθητο στέλεχος, ενώ 2 κλάσματα των 221 και 40 bp στο ανθεκτικό στέλεχος. Η αντίστοιχη σύγκριση του ευαίσθητου και του ανθεκτικού στέλεχους μετά από χρήση των ενζύμων *MnII* και *XcmI* είναι 4 κλάσματα των 93, 91, 59 και 18 bp για το ευαίσθητο και 3 κλάσματα των 111, 91 και 59 bp για το αντίστοιχο ανθεκτικό στέλεχος.

Επομένως, με την εφαρμογή των τεχνικών PCR-RFLP και τη χρήση των παραπάνω ενζύμων, μπορεί να γίνει ανίχνευση της μετάλλαξης και κατά συνέπεια ταυτόχρονη ταυτοποίηση και διαφοροποίηση ευαίσθητων και ανθεκτικών στελεχών *C. burnetii*, σε κλινικά δείγματα ασθενών (ολικό αίμα, λευκά αιμοσφαίρια) ή σε κυτταρικές σειρές.

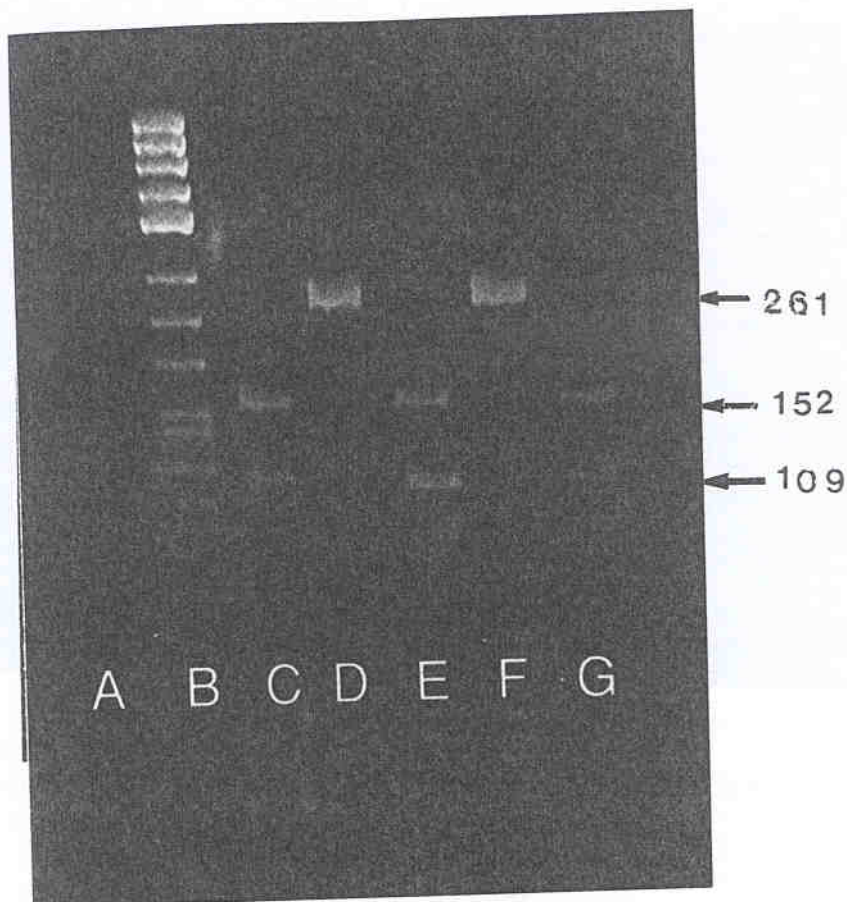
Πίνακας 22. Ο Γενετικός Κώδικας.

	U	C	A	G	
	Phe	Ser	Tyr	Cys	U
U	Phe	Ser	Tyr	Cys	C
	Leu	Ser	(och)	Stop	A
	Leu	Ser	(amb)	Trp	G
	Leu	Pro	His	Arg	U
C	Leu	Pro	His	Arg	C
	Leu	Pro	Gln	Arg	A
	Leu	Pro	Gln	Arg	G
	Ile	Thr	Asn	Ser	U
A	Ile	Thr	Asn	Ser	C
	Ile	Thr	Lys	Arg	A
	Met	Thr	Lys	Arg	G
	Val	Ala	Asp	Gly	U
G	Val	Ala	Asp	Gly	C
	Val	Ala	Glu	Gly	A
	Val (Met)	Ala	Glu	Gly	G

Αμινοξέα

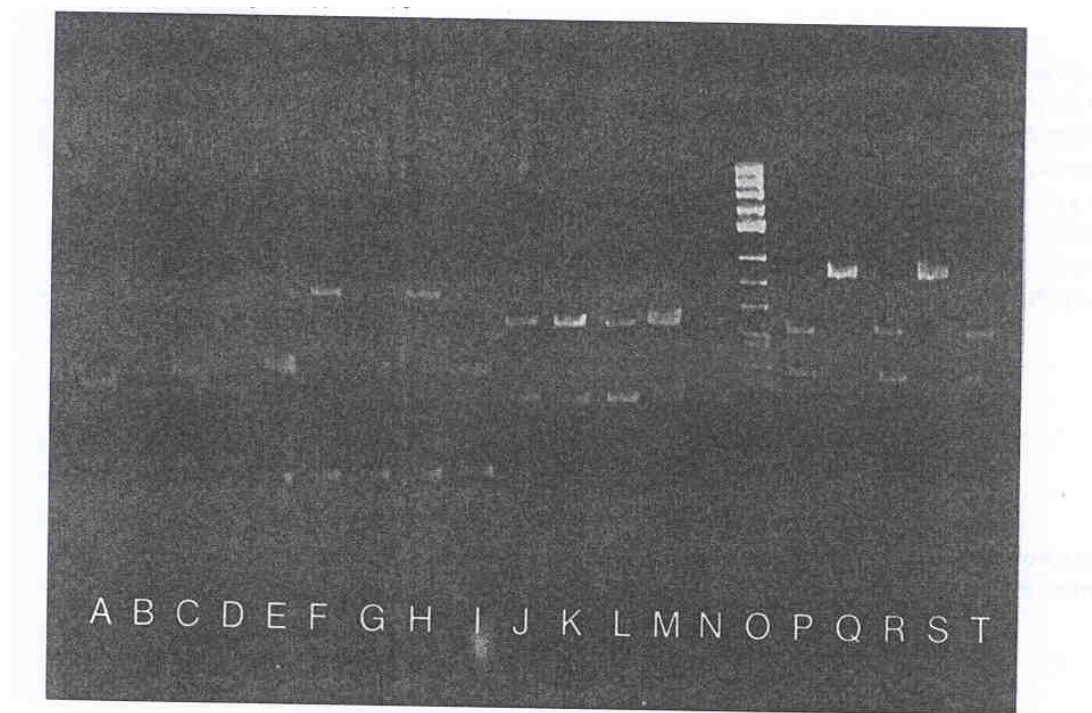
Κωδικόνια

Φωτογραφία 19. Ανίχνευση της σημειακής μετάλλαξης, στη περιοχή QRDR του γονιδίου *gyrA* της *C. burnetii*, σε *in vitro* ανθεκτικά στελέχη, χρησιμοποιώντας τη τεχνική PCR-RFLP. Επίδραση στα προϊόντα της PCR με το περιοριστικό ένζυμο *MnlI*. Η κατατομή των κλασμάτων φαίνεται μετά από ηλεκτροφόρηση σε πηκτή LMP αγαρόζης 3%.



A: Αρνητικός μάρτυρας (φυσιολογικά κύτταρα).
B: Molecular size marker (Φ X174/*HinfI*).
C, E, G: Ευαίσθητα στελέχη *C. burnetii*.
D, F: Ανθεκτικά στελέχη *C. burnetii*.

Φωτογραφία 20. Ανίχνευση και ταυτόχρονη διάκριση στελεχών *C. burnetii* σε ευαίσθητα ή ανθεκτικά στις κινολόνες, με τη χρήση της τεχνικής PCR-RFLP.



Ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αγαρόζης (LMP) 3%.

Επίδραση στα προϊόντων της PCR με τα περιοριστικά ένζυμα MnlI και HinfI.

A, C: Ανθεκτικά στελέχη *C. burnetii*.

B, D: Ευαίσθητα στελέχη *C. burnetii*.

Επίδραση στα προϊόντων της PCR με τα περιοριστικά ένζυμα MnlI και XcmI.

E, G: Ανθεκτικά στελέχη *C. burnetii*.

F, H: Ευαίσθητα στελέχη *C. burnetii*.

I: Molecular size marker (ΦX174/HinfI).

Επίδραση στα προϊόντων της PCR με τα περιοριστικά ένζυμα MnlI και HaeIII.

J, M: Ανθεκτικά στελέχη *C. burnetii*.

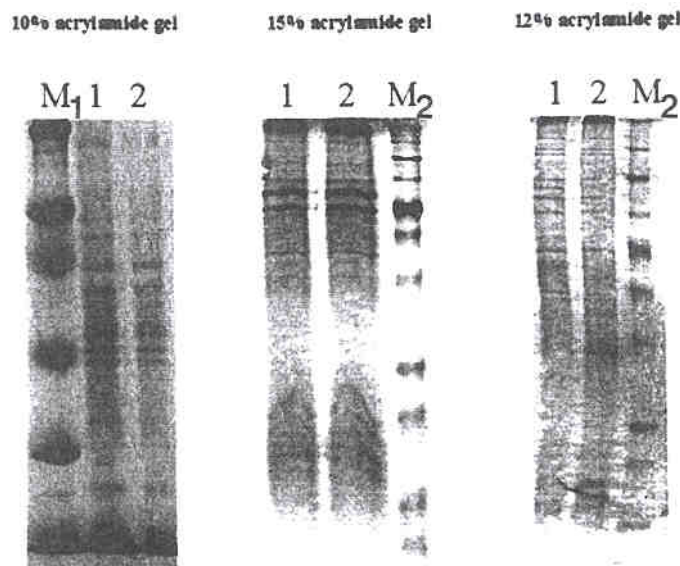
K, L: Ευαίσθητα στελέχη *C. burnetii*.

◆ Μελέτη αδιαβατότητας της μεμβράνης της *C. burnetii*.

Ανίχνευση των πρωτεϊνών της εξωτερικής μεμβράνης της *C. burnetii*.

Προκειμένου να διερευνηθεί ο πιθανός ρόλος της μεμβράνης της *C. burnetii*, στην αντοχή στις κινολόνες, έγινε ανίχνευση των πρωτεϊνών της εξωτερικής μεμβράνης ευαίσθητων και ανθεκτικών στελεχών *C. burnetii*. Η τεχνική που χρησιμοποιήθηκε ήταν η SDS-PAGE. Η πρωτεϊνική κατατομή των ευαίσθητων στελεχών συγκρίθηκε μ'αυτή των ανθεκτικών στελεχών. Παρατηρήθηκε πλήρης ταύτιση των πρωτεϊνών της εξωτερικής μεμβράνης ανάμεσα σε ευαίσθητα και ανθεκτικά στελέχη *C. burnetii* (Φωτογραφία 21).

Φωτογραφία 21. Προφίλ πρωτεϊνών εξωτερικής μεμβράνης ευαίσθητων¹ και ανθεκτικών² στελεχών *C. burnetii* μετά από ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE. M: Molecular weight marker.



M₁: Rainbow™ coloured protein molecular weight markers.

M₂: BENCHMARK™ pre-stained protein Ladder.

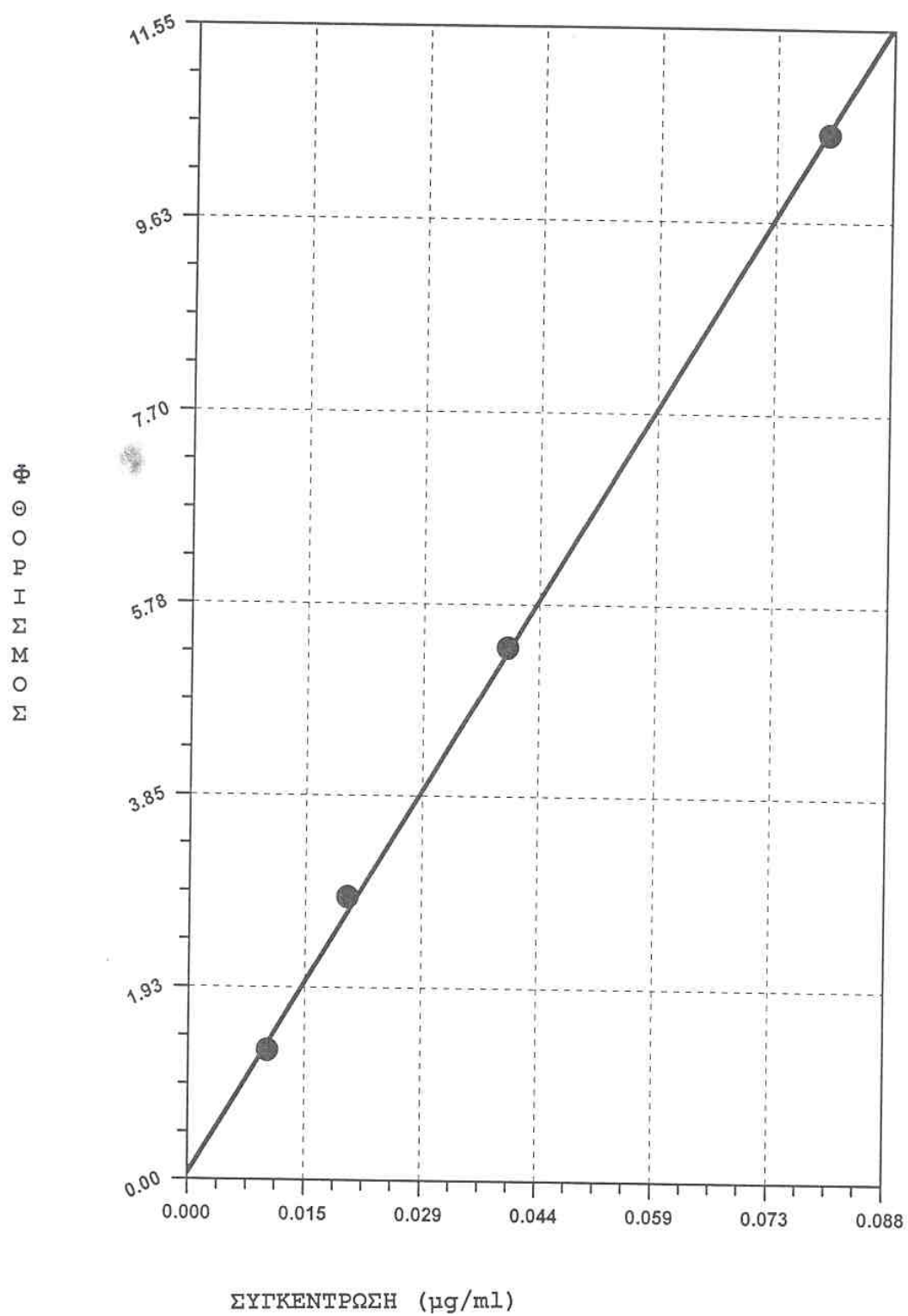
Παρασκευή της πρότυπης γραφικής παράστασης της refloxacin.

Πίνακας 23. Αραίωση της refloxacin και μέτρηση του φθορισμού (emission 442, excitation 278).

Συγκέντρωση μg/ml	Φθορισμός
0.01	1,3
0,02	2,83
0,04	5,34
0,08	10,5

Στα παραπάνω δεδομένα έγινε linear regression ανάλυση με correlation coefficient 0,99 και standard error 0,1. Ο τύπος της εξίσωσης είναι $\psi=131,025X+0,063$ όπου ψ ο φθορισμός, X η συγκέντρωση και 0,063 σταθερά.

Σχήμα 8. Γραφική παράσταση της refloxacin.



Υπολογισμός ενδοκυττάριας συγκέντρωσης της pefloxacin (uptake).

Vero κύτταρα μολυσμένα με το ευαίσθητο ή το in vitro ανθεκτικό στέλεχος.

Η μελέτη της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης του αντιβιοτικού (pefloxacin) έγινε σε pH 7.2 και 4.5. Ο αριθμός των Vero κυττάρων, μολυσμένων με το ευαίσθητο ή το ανθεκτικό στέλεχος, ήταν 10^4 κύτταρα/ml σε κάθε πείραμα. Το ίδιο πείραμα επαναλαμβανόταν τουλάχιστον 4 φορές, παρουσία ή απουσία του CCCP. Η ίδια μελέτη έγινε σε θερμοκρασία 25 και 37⁰C.

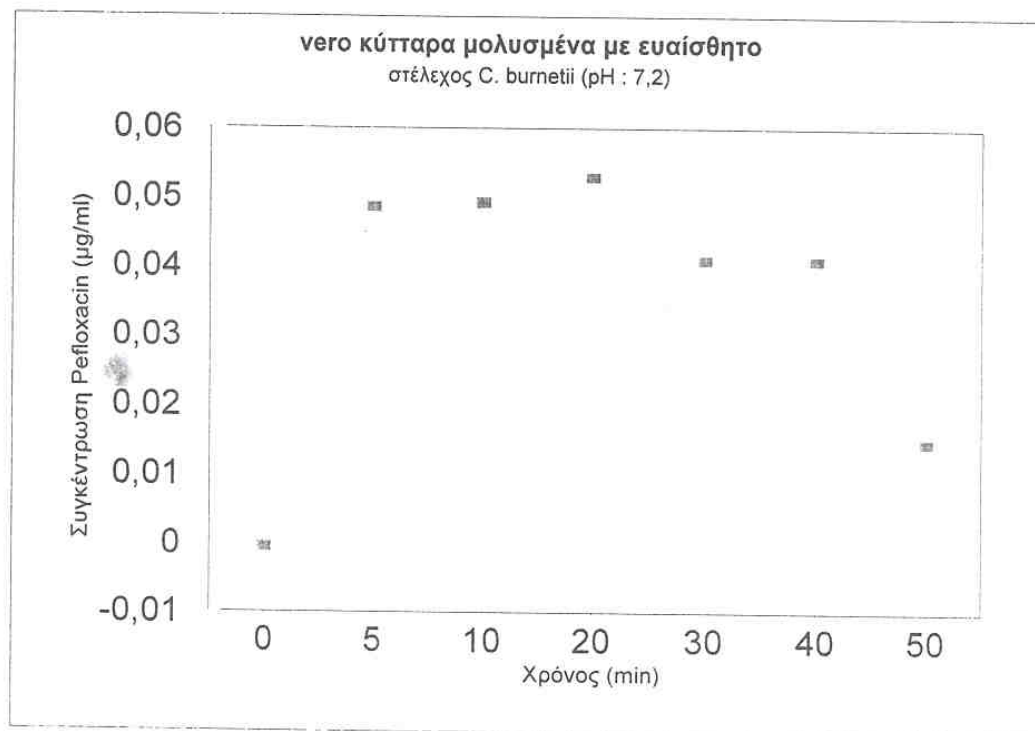
Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης του αντιβιοτικού στα μολυσμένα κύτταρα έγινε με τη χρήση του φθοριόμετρου, μετρώντας τον φθορισμό του αντιβιοτικού μετά την λύση των κυττάρων και την ελευθέρωση του. Έγινε υπολογισμός της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης της pefloxacin μετά από 5, 10, 20, 30, 40 και 50 λεπτά από τη προσθήκη του αντιβιοτικού.

Στη συνέχεια οι τιμές του φθορισμού μετατράπηκαν σε μg/ml με τη βοήθεια της πρότυπης γραφικής παράστασης του αντιβιοτικού.

Πίνακας 24.

Vero κύτταρα μολυσμένα με το ευαίσθητο στέλεχος <i>C. burnetii</i> (pH 7.2).		
T (min)	Φθορισμός (μέσος όρος)	Συγκέντρωση (από εξίσωση μg/ml)
0	0	0
5	6,44	0,049
10	6,52	0,049
20	7	0,053
30	5,44	0,041
40	5,44	0,041
50	2	0,015

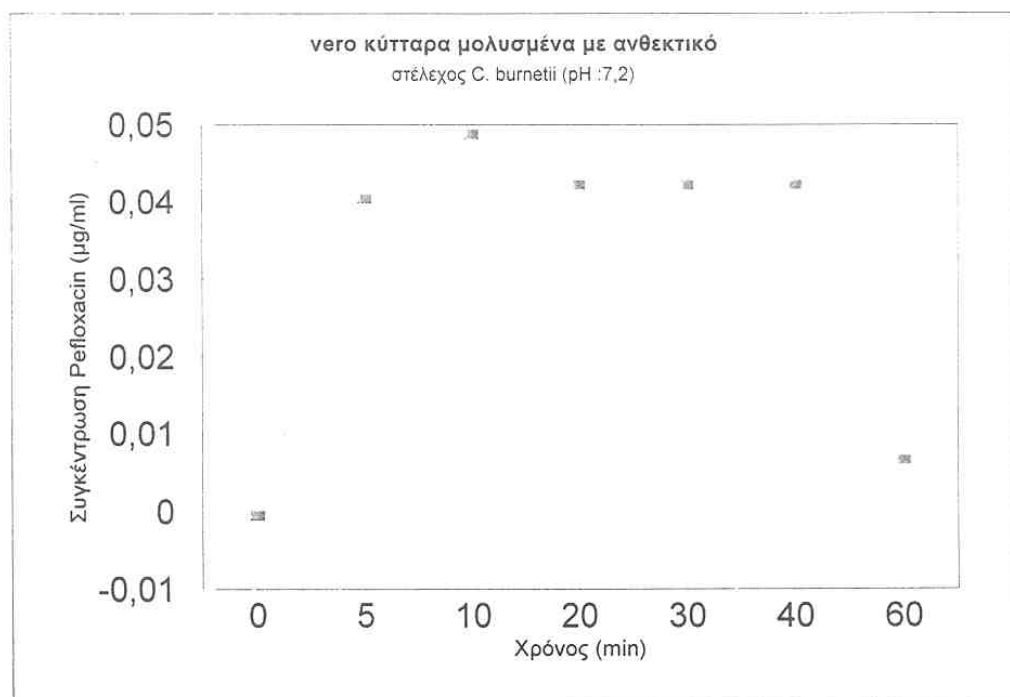
Σχήμα 9. Γραφική παράσταση της συγκέντρωσης του αντιβιοτικού σε Vero κύτταρα μολυσμένα με το ευαίσθητο στέλεχος *C. burnetii* σε pH 7,2.



Πίνακας 25.

Vero κύτταρα μολυσμένα με το ανθεκτικό στέλεχος <i>C. burnetii</i> (pH 7.2).		
T (min)	Φθορισμός (μέσος όρος)	Συγκέντρωση (από εξίσωση μg/ml)
0	0	0
5	5,368	0,040
10	6,462	0,049
20	5,6	0,042
30	5,6	0,042
40	5,6	0,042
60	0,92	0,007

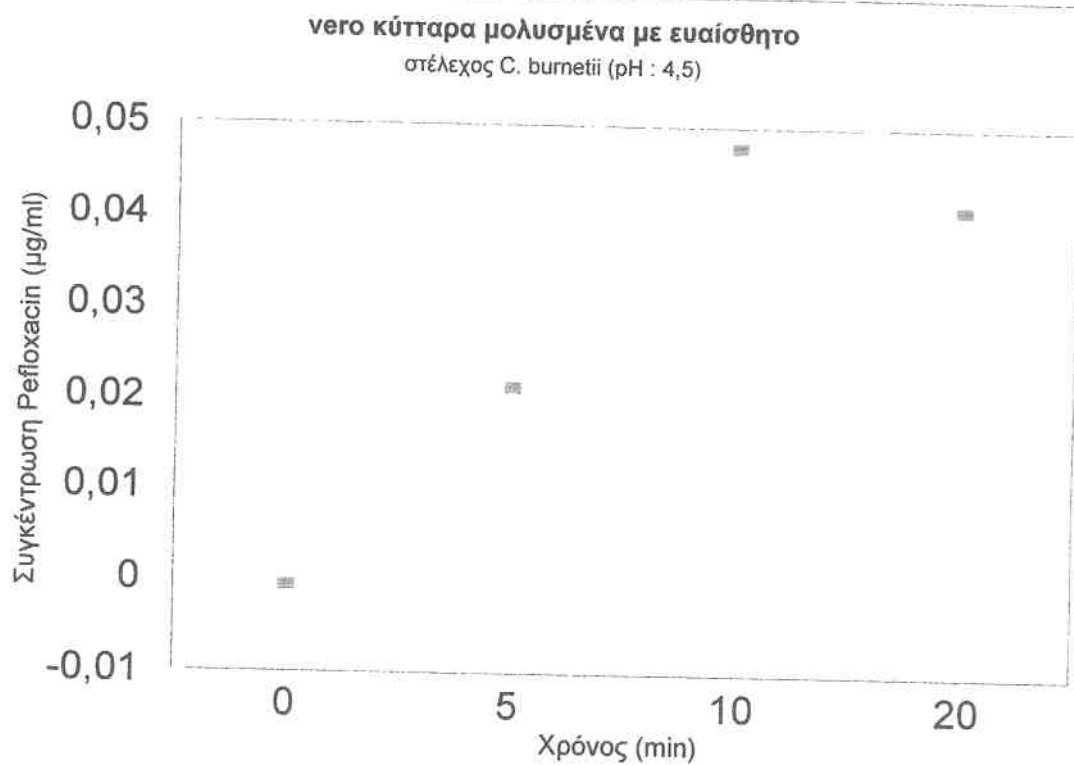
Σχήμα 10. Γραφική παράσταση της συγκέντρωσης του αντιβιοτικού σε Vero κύτταρα μολυσμένα με το ανθεκτικό στέλεχος *C. burnetii* σε pH 7,2.



Πίνακας 26.

Vero κύτταρα μολυσμένα με το ευαίσθητο στέλεχος <i>C. burnetii</i> (pH 4,5).		
T (min)	Φθορισμός (μέσος όρος)	Συγκέντρωση (από εξίσωση μg/ml)
0	0	0
5	2,864	0,021
10	6,332	0,048
20	5,464	0,041

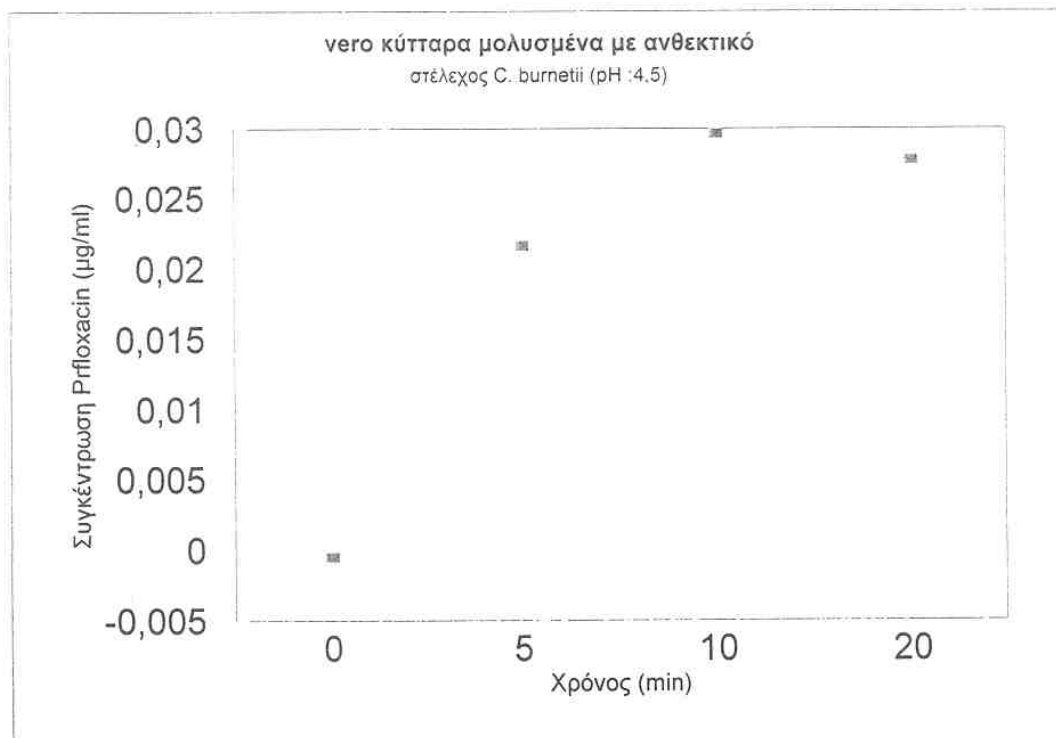
Σχήμα 11. Γραφική παράσταση της συγκέντρωσης του αντιβιοτικού σε Vero κύτταρα μολυσμένα με το ευαίσθητο στέλεχος *C. burnetii* σε pH 4,5.



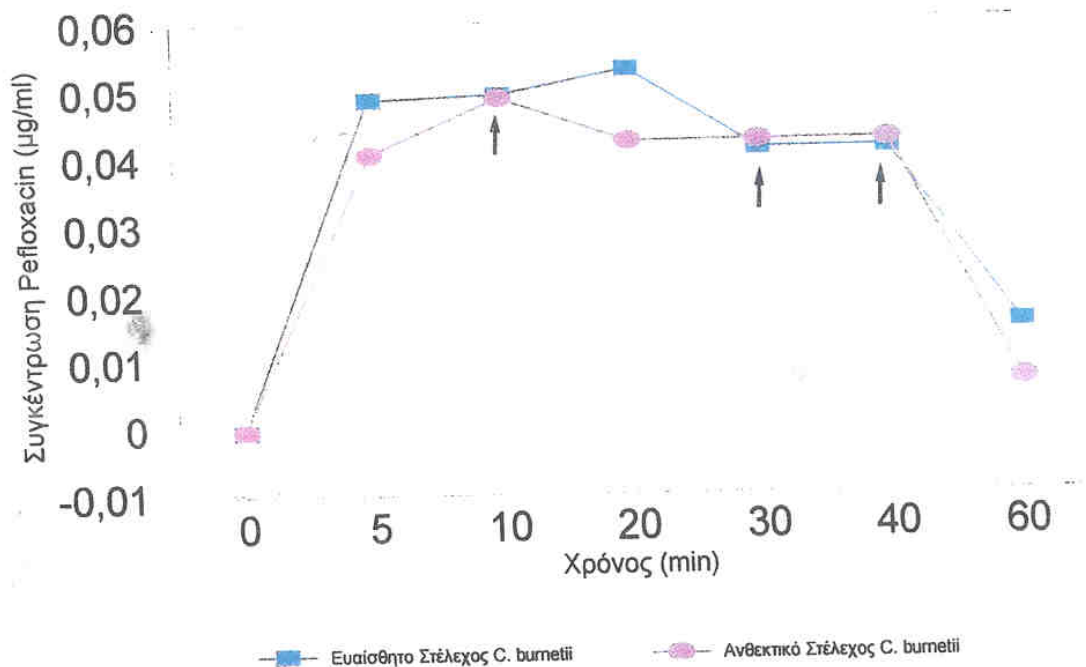
Πίνακας 27.

Vero κύτταρα μολυσμένα με το ανθεκτικό στέλεχος <i>C. burnetii</i> (pH 4,5).		
T (min)	Φθορισμός (μέσος όρος)	Συγκέντρωση (από εξίσωση μg/ml)
0	0	0
5	2,9	0,022
10	3,95	0,030
20	3,7	0,028

Σχήμα 12. Γραφική παράσταση της συγκέντρωσης του αντιβιοτικού σε Vero κύτταρα μολυσμένα με το ανθεκτικό στέλεχος *C. burnetii* σε pH 4,5.

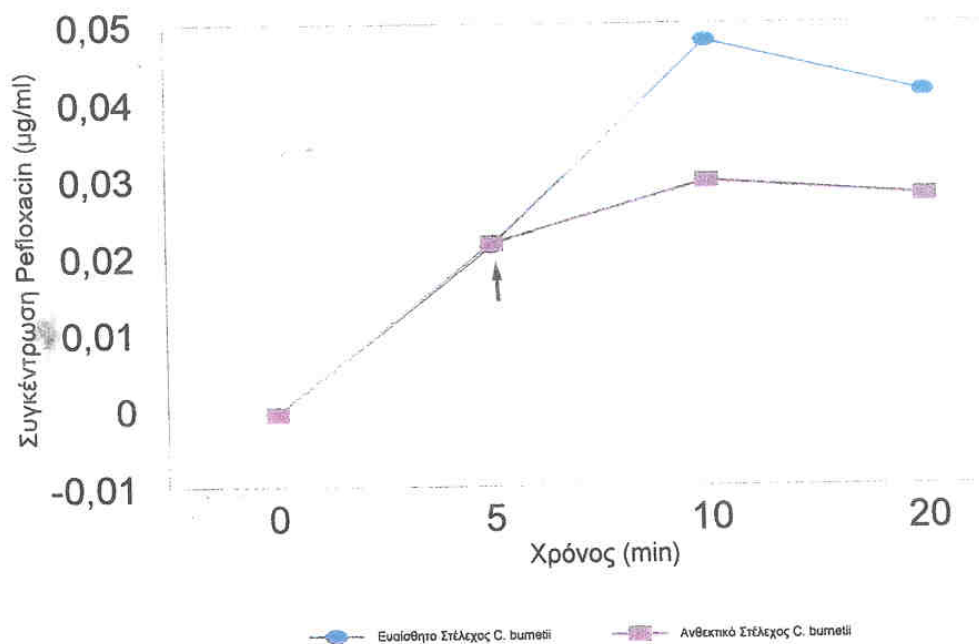


Σχήμα 13. Σύγκριση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης της refloxacin σε Vero κύτταρα μολυσμένα με το ευαίσθητο ή το ανθεκτικό στέλεχος *C. burnetii* σε pH 7,2.



Στη γραφική παράσταση φαίνεται η ενδοκυττάρια συγκέντρωση της refloxacin ($\mu\text{g/ml}$), σε Vero κύτταρα μολυσμένα με το ευαίσθητο ή το ανθεκτικό στις κινολόνες στέλεχος *C. burnetii*, σε συνάρτηση με το χρόνο. Η συγκέντρωση της refloxacin είναι ελάχιστα μεγαλύτερη στα Vero κύτταρα μολυσμένα με το ευαίσθητο στέλεχος *C. burnetii*. Μετά από στατιστική ανάλυση βρέθηκε ότι η αύξηση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης της refloxacin είναι στατιστικά σημαντική γιατί το $P < 0,05$ (Pvalue). Μόνο στα σημεία που υποδεικνύουν τα βελάκια δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στην ενδοκυττάρια συγκέντρωση του αντιβιοτικού.

Σχήμα 14. Σύγκριση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης της refloxacin σε Vero κύτταρα μολυσμένα με το ευαίσθητο ή το ανθεκτικό στέλεχος *C. burnetii* σε pH 4,5.



Στη γραφική παράσταση φαίνεται η ενδοκυττάρια συγκέντρωση της refloxacin ($\mu\text{g/ml}$), σε Vero κύτταρα μολυσμένα με το ευαίσθητο ή το ανθεκτικό στις κινολόνες στέλεχος *C. burnetii*, σε συνάρτηση με το χρόνο. Η συγκέντρωση της refloxacin είναι μεγαλύτερη στα Vero κύτταρα μολυσμένα με το ευαίσθητο στέλεχος *C. burnetii*. Η ενδοκυττάρια αύξηση της συγκέντρωσης του αντιβιοτικού στα Vero κύτταρα μολυσμένα με το ευαίσθητο στέλεχος είναι στατιστικά σημαντική αφού $P < 0,05$. Μόνο στο σημείο που υποδεικνύει το βελάκι δεν υπάρχει διαφορά στην ενδοκυττάρια συγκέντρωση της refloxacin.

Μελέτη της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης του αντιβιοτικού (refloxacin) σε καθαρά από το κύτταρο του ξενιστή βακτηρία *C. burnetii* (εαυαίσθητα-ανθεκτικά).

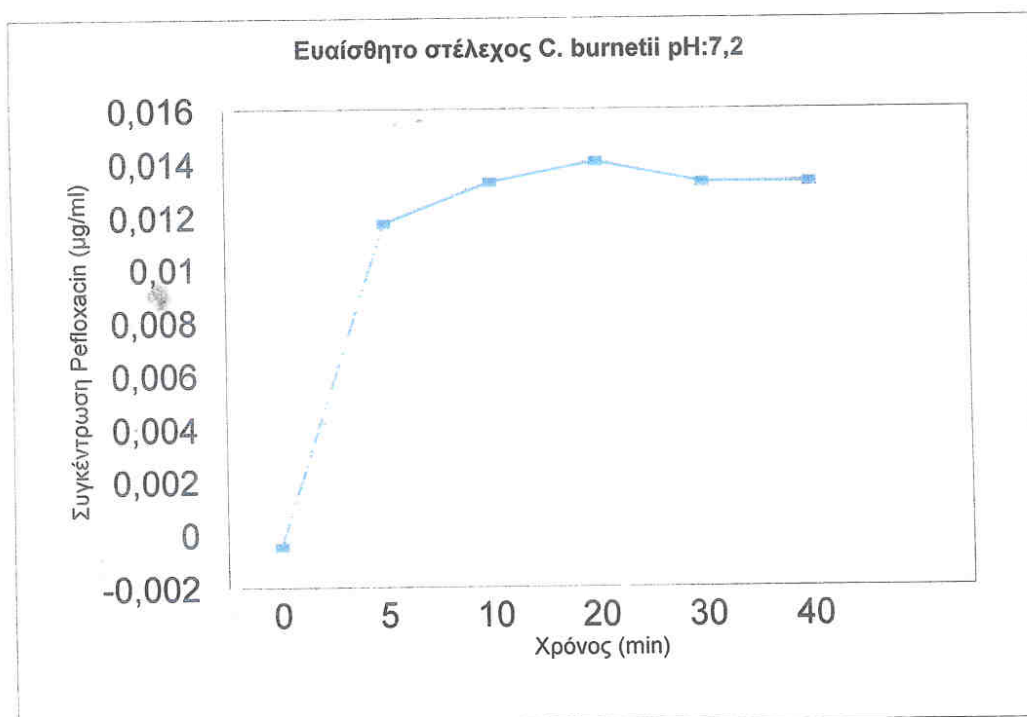
Έγινε μελέτη της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης του αντιβιοτικού σε βακτήρια *C. burnetii* μετά από το καθαρισμό τους από τα Vero κύτταρα. Ο υπολογισμός της ενδοκυττάριας συσσώρευσης της refloxacin έγινε σε pH 7.2 και 4.5, παρουσία ή απουσία CCCP. Εξετάστηκε και η επίδραση της θερμοκρασίας (25 και 37°C) στη πρόσληψη του αντιβιοτικού.

Η διαδικασία υπολογισμού του αντιβιοτικού ήταν η ίδια μ'αυτή των μολυσμένων κυττάρων με *C. burnetii*. Η συγκέντρωση των βακτηρίων, μετά από τιτλοποίηση, σε όλα τα πειράματα ήταν 10^6 μικροοργανισμοί/ml και η αντιστοιχία σε ξηρό βάρος ήταν 20mg/ml. Το ίδιο πείραμα επαναλαμβάνονταν τουλάχιστο 4 φορές.

Πίνακας 28.

Ευαίσθητο στέλεχος <i>C. burnetii</i> (pH 7.2).		
T (min)	Φθορισμός (μέσος όρος)	Συγκέντρωση (από εξίσωση µg/ml)
0	0	0
5	1,6	0,012
10	1,8	0,013
20	1,9	0,014
30	1,8	0,013
40	1,8	0,013

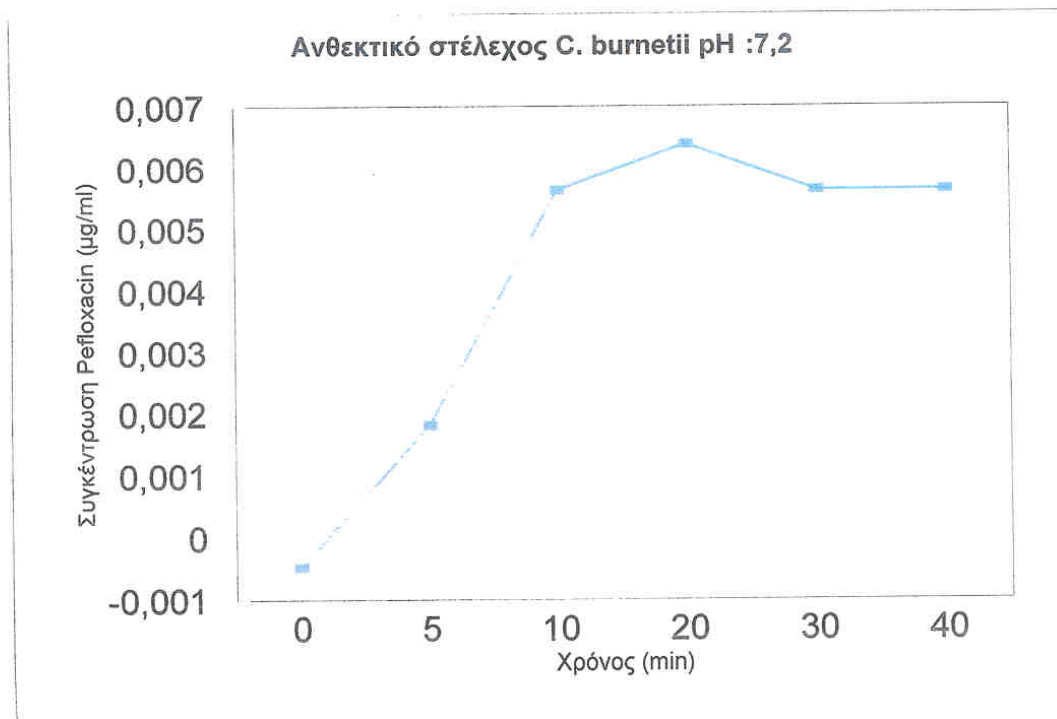
Σχήμα 15. Γραφική παράσταση της συγκέντρωσης του αντιβιοτικού στο ευαίσθητο στέλεχος *C. burnetii* σε pH 7,2.



Πίνακας 29.

Ανθεκτικό στέλεχος <i>C. burnetii</i> (pH 7.2).		
T (min)	Φθορισμός (μέσος όρος)	Συγκέντρωση (από εξίσωση µg/ml)
0	0	0
5	0,3	0,002
10	0,8	0,006
20	0,9	0,006
30	0,8	0,006
40	0,8	0,006

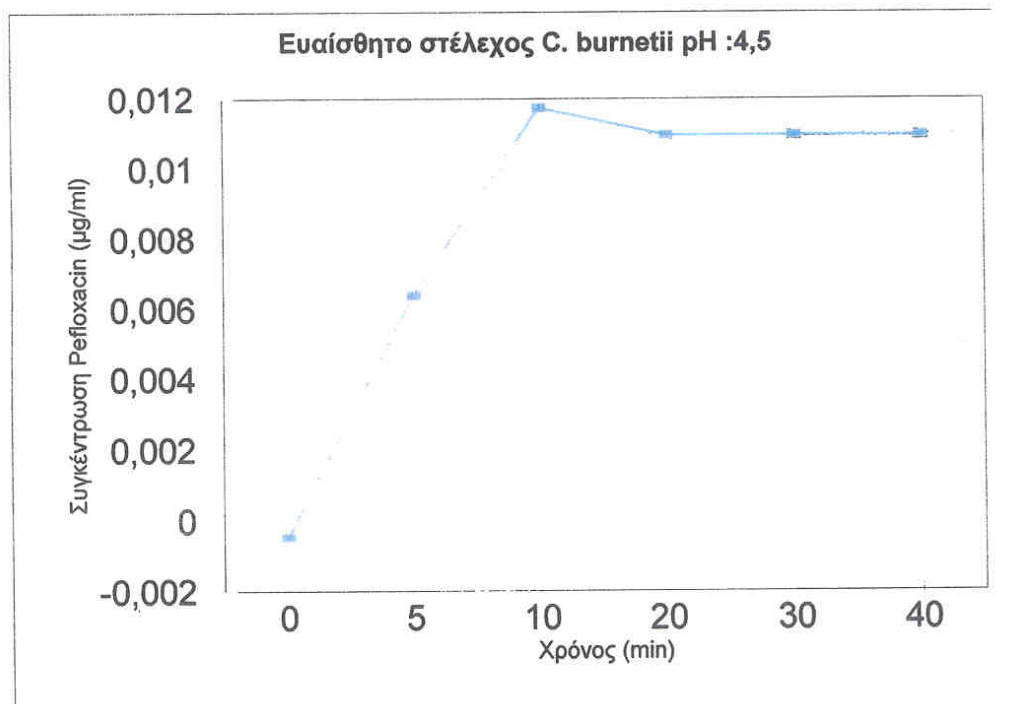
Σχήμα 16. Γραφική παράσταση της συγκέντρωσης του αντιβιοτικού στο ανθεκτικό στέλεχος *C. burnetii* σε pH 7,2.



Πίνακας 30.

Ευαίσθητο στέλεχος <i>C. burnetii</i> (pH 4,5).		
T (min)	Φθορισμός (μέσος όρος)	Συγκέντρωση (από εξίσωση µg/ml)
0	0	0
5	0,9	0,006
10	1,6	0,012
20	1,5	0,011
30	1,5	0,011
40	1,5	0,011

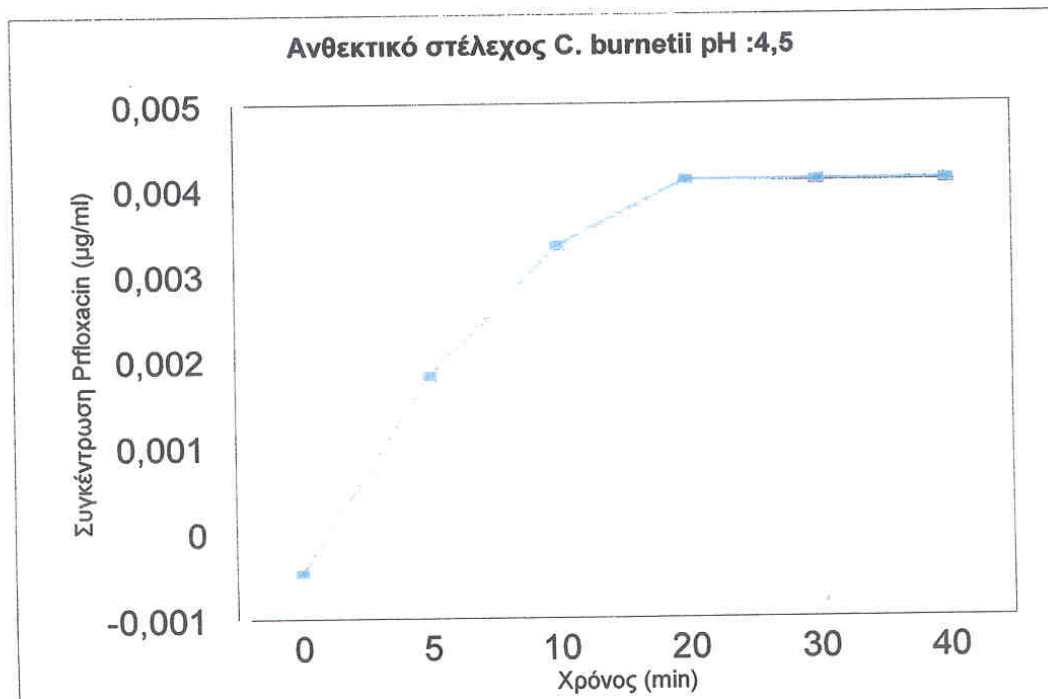
Σχήμα 17. Γραφική παράσταση της συγκέντρωσης του αντιβιοτικού στο ευαίσθητο στέλεχος *C. burnetii* σε pH 4,5.



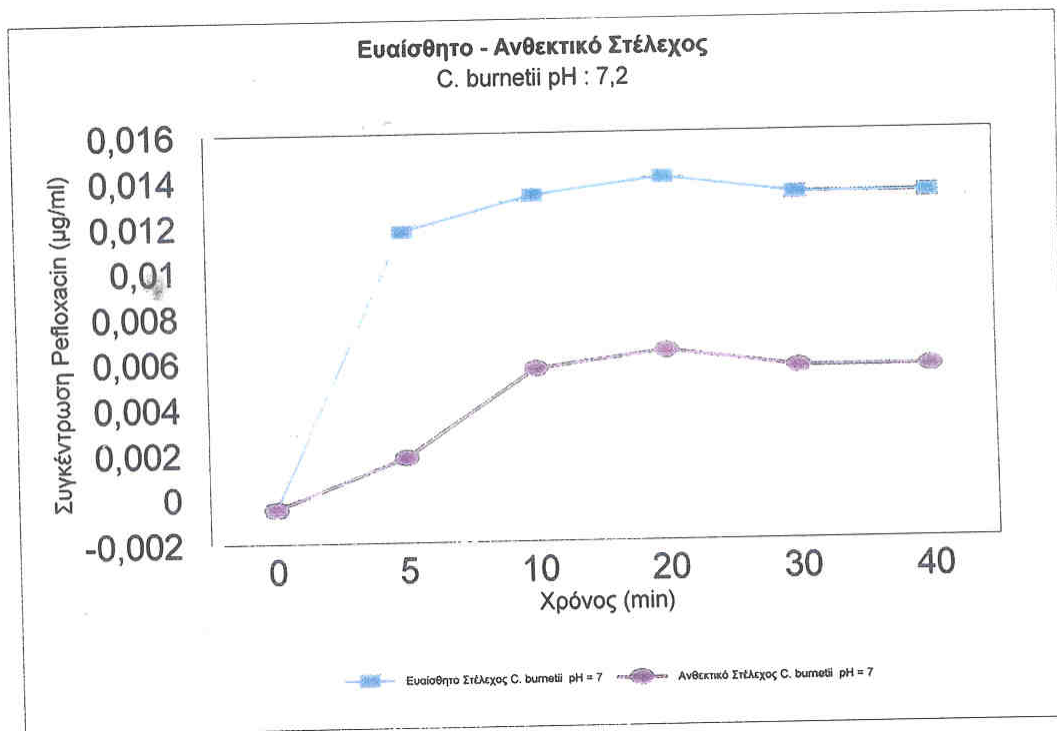
Πίνακας 31.

Ανθεκτικό στέλεχος <i>C. burnetii</i> (pH 4,5).		
T (min)	Φθορισμός (μέσος όρος)	Συγκέντρωση (από εξίσωση $\mu\text{g/ml}$)
0	0	0
5	0,3	0,002
10	0,5	0,003
20	0,6	0,004
30	0,6	0,004
40	0,6	0,004

Σχήμα 18. Γραφική παράσταση της συγκέντρωσης του αντιβιοτικού στο ανθεκτικό στέλεχος *C. burnetii* σε pH 4,5.

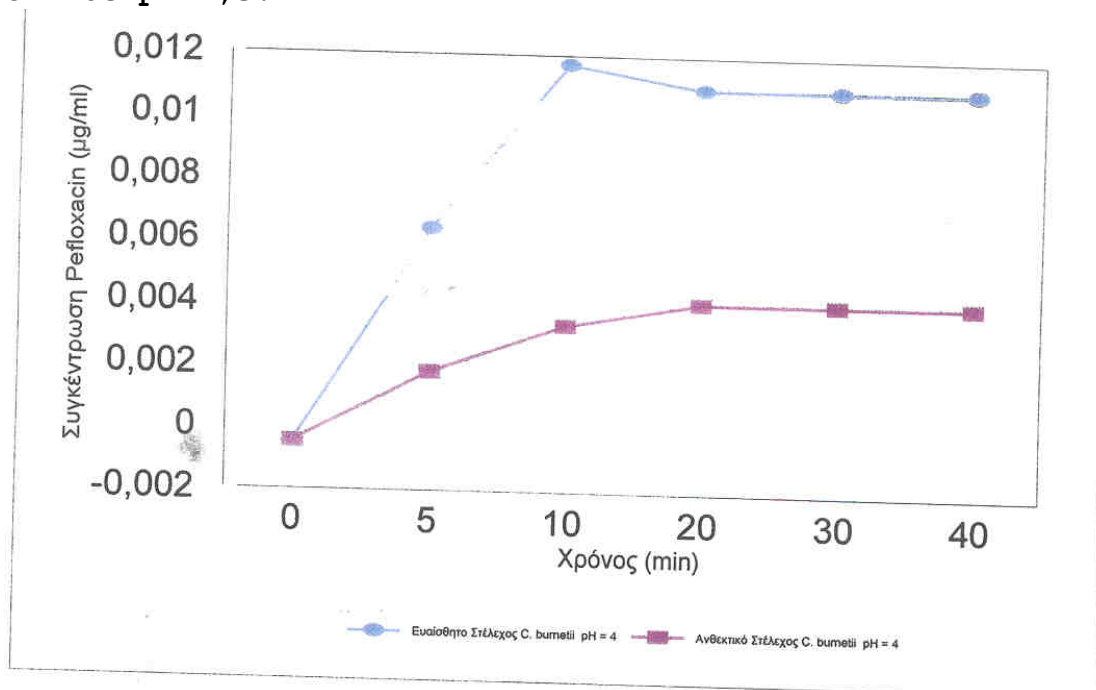


Σχήμα 19. Σύγκριση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης της refloxacin σε ευαίσθητα και ανθεκτικά βακτήρια *C. burnetii* σε pH 7,2.



Στη γραφική παράσταση φαίνεται η ενδοκυττάρια συγκέντρωση της refloxacin (µg/ml), σε ευαίσθητα και ανθεκτικά στις κινολόνες βακτήρια *C. burnetii*, σε συνάρτηση με το χρόνο. Η συγκέντρωση της refloxacin είναι μεγαλύτερη στα ευαίσθητα βακτήρια *C. burnetii*. Μετά από στατιστική ανάλυση βρέθηκε ότι η μεγαλύτερη ενδοκυττάρια συγκέντρωση του αντιβιοτικού στο ευαίσθητο στέλεχος είναι στατιστικά σημαντική αφού το $P < 0,05$.

Σχήμα 20. Σύγκριση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης της *refloxacin* σε ευαίσθητα και ανθεκτικά βακτήρια *C. burnetii* σε pH 4,5.



Στη γραφική παράσταση φαίνεται η ενδοκυττάρια συγκέντρωση της *refloxacin* ($\mu\text{g/ml}$), στα ευαίσθητα και ανθεκτικά στις κινολόνες βακτήρια *C. burnetii*, σε συνάρτηση με το χρόνο. Η συγκέντρωση της *refloxacin* είναι μεγαλύτερη στα ευαίσθητα βακτήρια *C. burnetii*. Στατιστικά είναι σημαντική η διαφορά της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης του αντιβιοτικού αφού $P < 0,05$.

♦ Έλεγχος ενεργού εκροής της *refloxacin*.

Υπολογισμός ενδοκυττάριας συγκέντρωσης της *refloxacin* παρουσία CCCP.

Πειράματα πρόσληψης της *refloxacin* σε Vero κύτταρα μολυσμένα με το ευαίσθητο ή το ανθεκτικό στέλεχος *C. burnetii*, καθώς και στα αντίστοιχα βακτηριακά κύτταρα, έδειξαν ότι η ενδοκυττάρια συγκέντρωση του αντιβιοτικού δεν μεταβάλλεται, όταν η πρόσληψη του γίνεται παρουσία του CCCP.

Επομένως, η ελάττωση του αντιβιοτικού στα *in vitro* ανθεκτικά στις κινολόνες στελέχη *C. burnetii* δεν σχετίζεται με την ενεργό εκροή της *refloxacin* από το κύτταρο.

Επίδραση της θερμοκρασίας και του pH στην πρόσληψη της *refloxacin*.

Πειράματα πρόσληψης της *refloxacin* στο ίδιο pH και σε διαφορετικές θερμοκρασίες (25 και 37°C) έδωσαν τα ίδια αποτελέσματα.

Η πρόσληψη της *refloxacin*, από Vero κύτταρα μολυσμένα με *C. burnetii* και βακτηριακά κύτταρα *C. burnetii*, σε όξινο και ουδέτερο pH, έδειξε ότι η ενδοκυττάρια συγκέντρωση του αντιβιοτικού ελαττώνεται όταν η πρόσληψη του γίνεται σε όξινο περιβάλλον (βλέπε γραφικές παραστάσεις 13, 14, 19, 20).

Επομένως, η θερμοκρασία δεν επηρεάζει την ενδοκυττάρια συγκέντρωση της *refloxacin*, ενώ το όξινο pH επιδρά αρνητικά στη πρόσληψή της.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο πυρετός Q είναι ζωνόσος οφειλόμενη στην *C. burnetii* και έχει παγκόσμια εξάπλωση (93, 137, 140, 141). Η επιδημιολογία και η κλινική εικόνα του πυρετού Q διαφέρει από χώρα σε χώρα (2, 8, 18, 27, 32, 40, 47, 64, 81, 92, 104, 117, 168, 181, 191). Διατηρείται στη φύση μέσα από πολύπλοκους κύκλους στους οποίους εμπλέκονται αρθρώποδα, τρωκτικά, πουλιά, άγρια και κατοικίδια ζώα (1, 141).

Η *C. burnetii* είναι υποχρεωτικά ενδοκυττάριο παράσιτο, που εμφανίζει ποικιλομορφία ως προς την λοιμογόνο της δύναμη και την ευαισθησία στα αντιβιοτικά (59, 61, 141).

Η μετάδοση του παθογόνου παράγοντα μεταξύ των ζώων και από τα ζώα στον άνθρωπο γίνεται με εισπνοή μολυσμένης σκόνης ή με κατανάλωση μολυσμένου κρέατος και γάλακτος (1, 93, 141). Η μετάδοση διευκολύνεται από την δυνατότητα της *C. burnetii* να παράγει ενδοσπόρια (ανθεκτικές μορφές) με αποτέλεσμα να είναι πιο ανθεκτική σε διάφορους φυσικούς και χημικούς παράγοντες και στο περιβάλλον (141).

Η *C. burnetii* συνήθως εγκαθίσταται στον πλακούντα των μηρυκαστικών καθώς και στους αδένες των μαστών και εκκρίνεται για μεγάλες περιόδους στο γάλα και μάλιστα σε υψηλές συγκεντρώσεις. Βρίσκεται επίσης σε υψηλές συγκεντρώσεις στον πλακούντα και στα λόχεια των ζώων, μολύνοντας κατ'αυτό τον τρόπο το περιβάλλον. Συχνά η μόλυνση στα ζώα προκαλεί αυτόματες εκτρώσεις και συνοδεύεται από προβλήματα στειρότητας (141). Η μόλυνση των οικιακών ζώων δεν επηρεάζει την ανάπτυξη τους ή την παραγωγή γάλακτος.

Στον άνθρωπο, μετά από περίοδο επώασης 10-14 ημερών, η νόσος εκδηλώνεται με υψηλό πυρετό, πονοκέφαλο, διάμεση πνευμονία, και λιγότερο συχνά ηπατίτιδα. Η οξεία λοίμωξη με *C. burnetii* είναι μια συνήθως αυτοιώμενη νόσος. Η διαφορετική κλινική εικόνα του οξέος πυρετού Q, μπορεί να οφείλεται στη διαφορετική οδό της μόλυνσης, στην ποσότητα του μικροοργανισμού που ενέχεται στη λοίμωξη, στην πλασμιδιακή διαφορά των στελεχών ή στο αμυντικό σύστημα του ξενιστή (141). Η νόσος, σε σπάνιες περιπτώσεις, μπορεί να έχει χρόνια εξέλιξη και να καταλήξει σε ενδοκαρδίτιδα, οστεομυελίτιδα ή χρόνια ηπατίτιδα (1, 141).

Σε Ελλάδα και Κύπρο υπάρχουν σποραδικές αναφορές οροεπιδημιολογικών και κλινικών μελετών (25, 152, 153, 168). Στην Ελλάδα για πρώτη φορά, το 1946 ο Καμινόπετρος ανίχνευσε *C. burnetii* στον ορό ενός Γερμανού στρατιώτη, με

μεθόδους που δεν χρησιμοποιούνται σήμερα στην κλινική διάγνωση του πυρετού Q (25). Από το 1950, μόνο σποραδικά κρούσματα πυρετού Q αναφέρονται στη βιβλιογραφία. Το 1970 ο Ι. Τσελέντης, στη διδακτορική του διατριβή, μελέτησε την επιδημιολογική, ανοσοβιολογική και κλινική εικόνα των ρικετσιώσεων στην Ελλάδα. Το 1995, σε μια πρόσφατη οροεπιδημιολογική μελέτη που έγινε στη Κρήτη, οι Τσελέντης και συν. αναφέρουν ότι τα κυρίαρχα κλινικά συμπτώματα του πυρετού Q είναι ο πυρετός (91,7%) και οι αναπνευστικές λοιμώξεις (88,5%), ενώ ένας μικρός αριθμός ασθενών εμφάνισε ηπατίτιδα (7,1%)(161).

Σε οροεπιδημιολογικές μελέτες που έγιναν στη Κύπρο, κατά τη δεκαετία του 1970 από τους Spicer και συν., χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της συγκόλλησης του συμπληρώματος, ανιχνεύτηκαν αντισώματα εναντίον της *C. burnetii* στον ανθρώπινο πληθυσμό αλλά και στα ζώα (152, 153). Τα συμπεράσματα της έρευνας αυτής επανεκτιμήθηκαν σε μια πρόσφατη οροεπιδημιολογική μελέτη που έγινε σε γενικό πληθυσμό ανθρώπων και ζώων, στο εργαστήριο μας, στην οποία χρησιμοποιήθηκαν σύγχρονες τεχνικές ανίχνευσης αντισωμάτων έναντι της *C. burnetii* (IFA, ELISA). Από τη μελέτη αυτή προσδιορίστηκε ο επιπολασμός IgG αντισωμάτων (>1/60) σε ανθρώπινο πληθυσμό, σε ποσοστό 52,7% και στο ζωικό πληθυσμό, σε ποσοστό 47%.

Οι παραπάνω μελέτες έδωσαν σημαντικές πληροφορίες για το βαθμό μόλυνσης του πληθυσμού από *C. burnetii* και τις κλινικές εκδηλώσεις της λοίμωξης του πυρετού Q (25, 152, 153, 168).

Για τα κυκλοφορούντα στελέχη *C. burnetii* σε Ελλάδα και Κύπρο δεν υπήρξαν στοιχεία στις προηγούμενες αυτές μελέτες. Στη παρούσα μελέτη έγινε, για πρώτη φορά στην Ελλάδα, προσπάθεια ταυτόχρονης ανίχνευσης, απομόνωσης και ταυτοποίησης στελεχών *C. burnetii* από ασθενείς με άτυπη πνευμονία και υψηλούς τίτλους αντισωμάτων έναντι της *C. burnetii*. Ταυτόχρονα, στις περιοχές όπου εντοπίστηκαν τα περιστατικά πυρετού Q, αναζητήθηκαν ζώα (αιγοπρόβατα) καθώς και τα εκτοπαράσιτα τους (κρότωνα) για την ανίχνευση και απομόνωση στελεχών *C. burnetii*. Παρόμοιες εργασίες ταυτόχρονης ανίχνευσης, απομόνωσης και ταυτοποίησης στελεχών *C. burnetii* από ανθρώπους, ζώα και κρότωνα δεν έχουν πραγματοποιηθεί μέχρι σήμερα.

Η απομόνωση της *C. burnetii* μπορεί να γίνει με ενοφθαλμισμό σε εμβρυοφόρα αυγά όρνιθας και ινδικά χοιρίδια ή με κυτταροκαλλιέργεια (1, 35, 141). Πρόκειται για μια επικίνδυνη, χρονοβόρα και δύσκολη διαδικασία, η οποία γίνεται από ειδικευμένα ερευνητικά εργαστήρια. Από τον Raoult και τους συνεργάτες του έχει προταθεί μια λιγότερο επικίνδυνη μέθοδος ταχείας καλλιέργειας της *C. burnetii* από αίμα και βαλβίδες ασθενών με πυρετό Q (130). Αρχικά η τεχνική αυτή, των shell vials, εφαρμόστηκε με επιτυχία στην απομόνωση ρικετσιών από αίμα ασθενών και κρότωνα. Η ελάττωση του κινδύνου της μόλυνσης του ερευνητή, η αύξηση της πιθανότητας απομόνωσης του μικροοργανισμού και η ελάττωση του χρόνου καλλιέργειας για την ανάπτυξη και τη μαζική παραγωγή της ρικετσιας αποτελούν τα βασικά πλεονεκτήματα της μεθόδου (52, 77, 91, 120, 149). Στη παρούσα μελέτη προσαρμόσαμε καλύτερα τη τεχνική των shell vials χρησιμοποιώντας Vero αντί HEL κύτταρα, μειώνοντας το χρόνο κυτταροκαλλιέργειας από τρεις σε μία ημέρα. Συνολικά απομονώθηκαν 14 στελέχη *C. burnetii*. Από αυτά 9 προέρχονται από ασθενείς με οξεία λοίμωξη πυρετού Q (9/24, 36%), 2 από αίμα αιγοπροβάτων (2/9, 22%), 1 από αιμόλεμφο κρότωνα (1/8, 12,5%) και 2 από ολικό σώμα κρότωνα (2/142, 1,4%) (154, 156).

Η μελέτη αυτή περιλαμβάνει τη πρώτη επιτυχημένη εφαρμογή της τεχνικής των shell vials σε φυσικά μολυσμένους, με *C. burnetii*, κρότωνα (156). Η τεχνική αυτή αποδείχθηκε ιδιαίτερα χρήσιμη και

αποτελεσματική στην απομόνωση στελεχών *C. burnetii*, τα οποία μπορούν περαιτέρω να μελετηθούν με τεχνικές μοριακής βιολογίας. Επίσης, από τα αποτελέσματα μας, προέκυψε η πληροφορία ότι προηγηθείσα θεραπεία με vibramycin και macrolides, σε ασθενείς με οξύ πυρετό Q, δεν μειώνει την πιθανότητα απομόνωσης της *C. burnetii* στις κυτταροκαλλιέργειες. Είναι γνωστό ότι τα παραπάνω αντιβιοτικά ασκούν βακτηριοστατική μόνο in vitro (και πιθανότατα in vivo) δράση ενάντια στην *C. burnetii*, γεγονός που θα μπορούσε να εξηγήσει το παραπάνω εύρημα. (54, 132, 135, 137, 140, 141, 163, 171).

Τα 14 απομονωθέντα στελέχη *C. burnetii* ταυτοποιήθηκαν εφαρμόζοντας τη τεχνική PCR σε συνδυασμό με τη μέθοδο sequencing και την τεχνική υδρόλυσης με περιοριστικά ένζυμα (RFLP) (89, 90, 154, 158, 159). Μετά από χρήση των παραπάνω τεχνικών βρέθηκε ότι όλα τα απομονωθέντα στελέχη είχαν το ίδιο προφίλ με τα στελέχη αναφοράς, Nine Mile (οξείας λοίμωξης) και Q212 (χρόνιας λοίμωξης), ανεξάρτητα από τη γεωγραφική προέλευση των δειγμάτων, τον ξενιστή και τη διαφορετική κλινική εικόνα των ασθενών με πυρετό Q (66 144, 156). Επομένως, δεν παρατηρήθηκε ετερογένεια των απομονωθέντων στελεχών *C. burnetii* ανεξάρτητα από την πηγή προέλευσης του στελέχους.

Η τεχνική της PCR που εφαρμόσαμε για την ανίχνευση *C. burnetii*, είχε ήδη εφαρμοστεί μόνο σε κυτταροκαλλιέργειες ή απ'ευθείας σε καρδιακές βαλβίδες ασθενών με πυρετό Q, χρησιμοποιώντας ειδικούς γενωμικούς, ριβοσωμικούς και πλασμιδιακούς εναρκτές (90, 146, 148, 158, 159, 165). Η ικανότητα της PCR να ανιχνεύει από 10 μικροοργανισμούς και πάνω, την καθιστά λιγότερο ευαίσθητη και αποτελεσματική στην ανίχνευση *C. burnetii* κατευθείαν σε κλινικά δείγματα (ολικό αίμα, λευκά αιμοσφαίρια) ασθενών με πυρετό Q, ή σε κρότνες κατά τις επιδημιολογικές μελέτες. Προκειμένου να αυξηθεί, ακόμη περισσότερο εφαρμόσαμε τη τεχνική της nested-PCR.

Η τεχνική της nested-PCR, που προσαρμόσαμε κατάλληλα ώστε μέσα σε 4 ώρες να έχουμε απάντηση, παρουσιάζει μεγάλη ευαισθησία και μπορεί να εφαρμοστεί κατευθείαν στο παθολογικό υλικό (ολικό αίμα ασθενή, buffy coat) ακόμη και μετά την χορήγηση αντιβιοτικών στον άρρωστο (154, 190, 195). Η ανίχνευση της *C. burnetii*, με την μέθοδο αυτή, έγινε δυνατή σε 4 από τα 9 εξεταζόμενα κλινικά δείγματα από ασθενή (44%), σε 5 από τα 9 δείγματα αίματος από αιγοπρόβατα (55,5%) και σε 11 από τους 142 κρότνες (7,7%). Τα παραπάνω δείγματα είχαν προηγουμένως εξετασθεί με την τεχνική της PCR και έδωσαν αρνητικά αποτελέσματα.

Η τεχνική της nested-PCR παρέχει την δυνατότητα ανίχνευσης ζωντανών ή νεκρών μικροοργανισμών τόσο σε κλινικά δείγματα ασθενών όσο και σε αφυδατωμένους ή διατηρημένους σε αλκοόλη κρότνες. Η ευχέρεια αυτή καθιστά την μέθοδο της nested PCR κατάλληλη για την εκτέλεση επιδημιολογικών ερευνών διότι είναι ευαίσθητη (ανιχνεύει από ένα μικροοργανισμό και πάνω), ειδική και μειώνει τους κινδύνους που προκύπτουν από την διαδικασία απομόνωσης, διατήρησης και μεταφοράς των μολυσμένων κλινικών υλικών και αρθρώπων από το φυσικό περιβάλλον στο εργαστήριο. Η παρούσα εργασία είναι η πρώτη επιτυχημένη εφαρμογή της nested-PCR σε μολυσμένους κρότνες του περιβάλλοντος.

Η τετρακυκλίνη και η χλωραμφενικόλη αποτελούν σήμερα τα αντιβιοτικά επιλογής για την οξεία λοίμωξη του πυρετού Q. Μελέτες έχουν αποδείξει ότι η ριφαμπικίνη είναι εξίσου δραστική ενώ οι μελέτες για τη δραστηριότητα των κινολονών, για την οξεία λοίμωξη πυρετού Q, είναι αντικρουόμενες (1, 132, 135, 141). Η θεραπεία της χρόνιας λοίμωξης από *C. burnetii* κλασικά στηρίζεται στον συνδυασμό τετρακυκλίνης και χλωραμφενικόλης, και χορηγείται για μεγάλα χρονικά διαστήματα. Παρόλο που τα παραπάνω αντιβιοτικά φαίνονται αποτελεσματικά στον έλεγχο της χρόνιας λοίμωξης, όπως αποδεικνύεται από την απομόνωση *C. burnetii* από ιστούς βαλβίδων ασθενών μετά από 4 χρόνια θεραπείας, δεν εξαλείφουν τον μικροοργανισμό αλλά απλώς

αναστέλλουν την ανάπτυξη του (54, 135, 141, 163, 171). Η θεραπεία επομένως της χρόνιας λοίμωξης εξακολουθεί να αποτελεί πρόβλημα και ο επιτυχής θεραπευτικός χειρισμός του πυρετού Q είναι θέμα ανοικτό.

Είναι γνωστό, από την βιβλιογραφία, ότι τα στελέχη που απομονώθηκαν από ασθενείς με χρόνια λοίμωξη πυρετού Q παρουσιάζουν μεγαλύτερη MIC από τα απομονωθέντα στελέχη από ασθενείς με οξεία λοίμωξη πυρετού Q, γεγονός που θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη στη θεραπεία και που θα μπορούσε να εξηγήσει τις θεραπευτικές αποτυχίες στη χρόνια νόσο (128, 129, 131). Οι μηχανισμοί δημιουργίας της αυξημένης MIC και συνεπώς αντοχής δεν έχει, από την υπάρχουσα βιβλιογραφία, διερευνηθεί.

Στη παρούσα εργασία μελετήσαμε την ευαισθησία των στελεχών που απομονώσαμε και τους μηχανισμούς που δυνητικά μπορεί, *in vitro*, να αναπτύξει η *C. burnetii* στις κινολόνες.

Σε πρώτη φάση διερευνήσαμε την ευαισθησία της *C. burnetii* στις γνωστές τετρακυκλίνες, κινολόνες και μακρολίδες. Επιπρόσθετα, εξετάστηκε για πρώτη φορά στη διεθνή βιβλιογραφία, η *in vitro* ευαισθησία της *C. burnetii* σε μια καινούργια κινολόνη, τη trovafloxacin, η οποία με βάση τις χημικές, φαρμακολογικές και φαρμακοδυναμικές ιδιότητες της θα μπορούσε να χορηγηθεί εναλλακτικά στη θεραπεία του πυρετού Q (57).

Η ευαισθησία των μικροοργανισμών στα αντιβιοτικά προσδιορίζεται με την εύρεση της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC). Οι κλασσικές τεχνικές που χρησιμοποιούνται στα εξωκυτάρια βακτήρια δεν μπορούν να εφαρμοστούν για τον υπολογισμό της MIC ενδοκυττάρων παθογόνων. Για τους ενδοκυττάρους μικροοργανισμούς έχουν χρησιμοποιηθεί παλαιότερα το ζωικό μοντέλο, το μοντέλο των γονιμοποιημένων αυγών και το μοντέλο των κυτταρικών καλλιιεργειών (45, 98, 141). Η χρήση των μεθόδων αυτών περιορίζεται μόνο σε εξειδικευμένα εργαστήρια και για ερευνητικούς κυρίως λόγους. Σήμερα χρησιμοποιείται πλέον το μοντέλο των shell vials και του άμεσου ανοσοφθορισμού, σε κύτταρα HEL. Το μοντέλο αυτό είναι το πιο γρήγορο και το λιγότερο επικίνδυνο για τον ερευνητή που το χρησιμοποιεί (57, 96, 128, 129, 133, 134, 176). Στη μελέτη μας, για τον υπολογισμό της MIC της *C. burnetii* στα αντιβιοτικά, προσαρμόσαμε τη τεχνική των shell vials και του άμεσου ανοσοφθορισμού σε Vero κύτταρα.

Ελέγχθηκε η ευαισθησία των 9 απομονωθέντων στελεχών από ασθενείς με οξεία λοίμωξη πυρετού Q και των στελεχών αναφοράς Nine Mile (οξείας λοίμωξης) και Q212 (χρόνιας λοίμωξης), σε 4 διαφορετικές κινολόνες (ofloxacin, trovafloxacin, pefloxacin, ciprofloxacin), στη doxycycline και στη clarithromycin. Για κάθε εξεταζόμενο αντιβιοτικό απαιτούνται τουλάχιστον 16 καλλιέργειες σε shell vials, Vero κυττάρων, μολυσμένες με την ίδια ποσότητα *C. burnetii*. Τα εξεταζόμενα αντιβιοτικά αραιώνονται ώστε η τελική τους συγκέντρωση σε κάθε shell vial να είναι από 0.25 μέχρι 16 μg/ml. Η MIC υπολογίζεται από την μικρότερη συγκέντρωση του αντιβιοτικού στην οποία δεν εμφανίζεται ανάπτυξη του βακτηρίου ή εμφανίζονται ελάχιστα ενδοκυττάρια βακτήρια.

Ο προσδιορισμός των MICs, των απομονωθέντων στελεχών *C. burnetii* και των στελεχών αναφοράς στα κλασσικά και στα υπό μελέτη αντιβιοτικά καθώς και η σύγκριση μεταξύ τους, απέδειξε ότι η ofloxacin και η trovafloxacin έχουν την ίδια MIC με τη doxycycline (από 1-2 μg/ml). Λιγότερο δραστικά *in vitro* αποδείχθηκαν η pefloxacin (από 1-4 μg/ml) και η clarithromycin (από 2-4 μg/ml). Η ciprofloxacin ήταν το αντιβιοτικό με την μικρότερη δραστικότητα (από 4-8 μg/ml). Κανένα από τα παραπάνω αντιβιοτικά δεν έδειξε *in vitro* βακτηριοκτονία κατά τη διάρκεια της μελέτης μας.

Μελέτη μηχανισμών αντοχής στις κινολόνες: Στα Gram αρνητικά βακτήρια η αντοχή στις κινολόνες οφείλεται σε: α) μεταλλάξεις στα γονίδια που κωδικοποιούν την υπομονάδα A ή την υπομονάδα B της DNA

γυράσης, β) σε ελάττωση της διαπερατότητας των πορινών και γ) σε αύξηση της ενεργού εκροής (efflux) (19, 29, 30, 56, 69, 86, 193).

Διερευνήσαμε την υπόθεση η αντοχή της *C. burnetii* να οφείλεται σε μηχανισμούς ανάλογους μ' εκείνους που συναντιούνται στα υπόλοιπα Gram αρνητικά βακτήρια.

Κατά τη διάρκεια της παρούσας μελέτης δεν βρέθηκαν φυσικά στελέχη *C. burnetii* με αντοχή στις κινολόνες. Προκειμένου να συνεχίσουμε τη μελέτη μας, επιχειρήθηκε για πρώτη φορά στη διεθνή βιβλιογραφία η μετατροπή *in vitro* δυο ευαίσθητων στις κινολόνες στελεχών *C. burnetii* (MIC 1-4 μg/ml) σε ανθεκτικά στη pefloxacin (MIC 32-64 μg/ml). Η μετατροπή έγινε μετά από καλλιέργεια των ευαίσθητων στελεχών σε διαδοχικά αυξανόμενες συγκεντρώσεις του αντιβιοτικού στο θρεπτικό υλικό. Τα στελέχη αυτά εμφάνισαν αντοχή σε όλες τις γνωστές κινολόνες και χρησιμοποιήθηκαν για την παραπέρα μελέτη μας.

Μελέτη της DNA γυράσης A: Μέχρι σήμερα η ανίχνευση μεταλλάξεων στην αλληλουχία των νουκλεοτιδίων ενός γονιδίου και κατά συνέπεια των αμινοξέων που εκφράζονται από το γονίδιο αυτό, γίνεται με τη μέθοδο του sequencing που χρησιμοποιήσαμε. Μετά από εφαρμογή της τεχνικής PCR, σε ευαίσθητα (MIC < 4 μg/ml) και ανθεκτικά στις κινολόνες στελέχη *C. burnetii* (MIC > 8 μg/ml), για τον πολλαπλασιασμό της περιοχής QRDR του γονιδίου *gyrA* της *C. burnetii*, προχωρήσαμε σε sequencing των προϊόντων της PCR. Βρέθηκε μια σημειακή μετάλλαξη στη θέση 87 των αμινοξέων της πρωτεΐνης GyrA στα στελέχη αντοχής. Στη θέση αυτή στα ανθεκτικά στελέχη υπάρχει Lys (AAG) αντί για Glu (GAG) των αντίστοιχων ευαίσθητων στελεχών (155). Στη παρούσα μελέτη παρατηρήθηκε ότι τα *in vitro* ανθεκτικά στη pefloxacin στελέχη *C. burnetii* (MIC από 32-64 μg/ml) παρουσιάζουν κατά 2 φορές αυξημένη την MIC στην ofloxacin και trovafloxacin, ενώ ιδιαίτερα αυξημένη MIC, κατά 8 φορές, παρατηρήθηκε στη ciprofloxacin. Σε μια μοναδική ανάλογη μελέτη που υπάρχει στη βιβλιογραφία, στην οποία όμως ελέγχθηκε η *in vitro* αντοχή στη ciprofloxacin της *C. burnetii*, αναφέρεται μια σημειακή μετάλλαξη στο ίδιο κωδικόνιο αλλά σε διαφορετική βάση (108). Τα αποτελέσματα των παραπάνω μελετών δείχνουν ότι η *in vitro* αντοχή της *C. burnetii* στις κινολόνες μπορεί να σχετίζεται με δύο διαφορετικές σημειακές μεταλλάξεις στη περιοχή QRDR της γυράσης A (108, 155).

Κατά την μελέτη μας αναζητήθηκαν πιο εύχρηστες από το sequencing εναλλακτικές τεχνικές μοριακής βιολογίας, που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ευρέως, για την ανίχνευση των μεταλλάξεων στα ανθεκτικά στις κινολόνες στελέχη *C. burnetii*. Η μέθοδος PCR-RFLP που εφαρμόσαμε κρίθηκε αποτελεσματική αφού είναι πιο γρήγορη και απλή, πιο οικονομική από το sequencing, δεν απαιτούνται εργαστήρια με εξοπλισμό και μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην διάγνωση και στην διαφοροποίηση ευαίσθητων και ανθεκτικών στις κινολόνες στελεχών *C. burnetii* (155). Αρχικά πολλαπλασιάζεται η περιοχή QRDR του γονιδίου *gyrA* της γυράσης A της *C. burnetii*, και στη συνέχεια ακολουθεί υδρόλυση των προϊόντων της PCR με το περιοριστικό ένζυμο MnlI. Μόνο τα ευαίσθητα στελέχη (MICs < 4 μg/ml) υδρολύονται με το ένζυμο MnlI (155). Τα γρήγορα και ακριβή αποτελέσματα της τεχνικής αυτής μπορούν να οδηγήσουν στην άμεση μελέτη και εντοπισμό των ανθεκτικών στις κινολόνες στελεχών *C. burnetii* και κατά συνέπεια στη καλύτερη θεραπευτική προσέγγιση του πυρετού Q.

Από τη μελέτη ευαισθησίας των *in vitro* ανθεκτικών στη pefloxacin στελεχών *C. burnetii*, προκύπτει ότι η MIC έχει αυξηθεί από 32-64 φορές. Παίρνοντας υπόψη την υπάρχουσα γνώση, για άλλα βακτήρια, οι υψηλές αυτές MICs δεν μπορούν να δικαιολογηθούν μόνο από μετάλλαξη στη γυράση A. Για παράδειγμα στην *P. aeruginosa*, μετάλλαξη στη γυράση A αυξάνει την MIC από 4-8 φορές όταν δεν υπερεκφράζονται οι αντλίες εκροής του αντιβιοτικού. Όταν συνυπάρχουν μεταλλάξεις στη γυράση και αντλίες εκροής, η MIC αυξάνει από 8-128 φορές, ενώ η γονιδιακή απαλοιφή (deletion), των γονιδίων που εκφράζουν τις

αντλίες, ελαττώνει την αντοχή στις κινολόνες από 16-64 φορές (86). Έτσι αναγκαστήκαμε να αναζητήσουμε παραπέρα και άλλους μηχανισμούς αντοχής.

Διερευνήθηκαν μηχανισμοί που επηρεάζουν την ενδοκυττάρια συγκέντρωση του αντιβιοτικού.

Η ενδοκυττάρια συγκέντρωση του αντιβιοτικού είναι αποτέλεσμα της ισορροπίας εισόδου και εξόδου του αντιβιοτικού και η ελάττωση της συγκέντρωσης του μέσα στα βακτήρια σχετίζεται με την μείωση της αντιμικροβιακής του δράσης. Την ενδοκυττάρια συγκέντρωση του αντιβιοτικού μπορεί να επηρεάσει η αντοχή από αδιαβατότητα που δημιουργείται μετά από μετάλλαξη των πορινών. Επίσης, αντοχή από ενεργό μηχανισμό εκροής του αντιβιοτικού, έχει αποδειχθεί σε πολλούς Gram αρνητικούς μικροοργανισμούς, οι οποίοι υπερεκφράζουν τις αντλίες και αποβάλλουν το αντιβιοτικό στο εξωτερικό περιβάλλον, χρησιμοποιώντας ενέργεια από τη μεταβολική δραστηριότητα τους (56, 86, 111, 194).

Υπολογισμός της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης της pefloxacin:

Προκειμένου να διερευνήσουμε το ρυθμό και τους μηχανισμούς πρόσληψης της pefloxacin, της *C. burnetii*, θέσαμε ευαίσθητα και ανθεκτικά βακτήρια στην ίδια συγκέντρωση αντιβιοτικού και μετρήσαμε την ενδοκυττάρια συγκέντρωσή του. Ταυτόχρονα θέσαμε στην ίδια συγκέντρωση αντιβιοτικού Vero κύτταρα, μολυσμένα με το ευαίσθητο ή το ανθεκτικό στέλεχος *C. burnetii*, προκειμένου να ελέγξουμε την επίδραση του κυττάρου ξενιστή στην δίοδο του αντιβιοτικού εντός του βακτηριδίου. Η μελέτη πρόσληψης της pefloxacin έγινε μετά από τροποποίηση της μεθόδου του Charman και Georgoparadaku, ώστε να μπορεί να εφαρμοστεί σε βακτηριακά κύτταρα *C. burnetii* αλλά και σε Vero κύτταρα μολυσμένα με *C. burnetii*. Η ενδοκυττάρια συγκέντρωση του αντιβιοτικού υπολογίστηκε μετρώντας το φθορισμό του, μετά από διάρρηξη των κυττάρων, σε τακτά χρονικά διαστήματα.

Από τα πειράματα αυτά προκύπτει ότι τα ευαίσθητα στελέχη *C. burnetii* συγκεντρώνουν μεγαλύτερη ενδοκυττάρια ποσότητα pefloxacin απ' ό,τι τα αντίστοιχα ανθεκτικά. Η διαφορά της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης του αντιβιοτικού μεταξύ ευαίσθητων και ανθεκτικών στελεχών είναι στατιστικά σημαντική ($P < 0.05$).

Μελέτη αδιαβατότητας των πορινών: Ελέγχθηκαν οι πρωτείνες της εξωτερικής μεμβράνης τόσο των ευαίσθητων όσο και των ανθεκτικών βακτηρίων *C. burnetii*. Τα ευαίσθητα (MICs $< 4 \mu\text{g/ml}$) και *in vitro* ανθεκτικά στελέχη *C. burnetii* (MICs $> 8 \mu\text{g/ml}$), διαχωρίστηκαν από το κύτταρο ξενιστή (Vero κύτταρα) χρησιμοποιώντας τη τεχνική Renographin Gradient Centrifugation. Απομονώθηκαν οι εξωτερικές μεμβράνες και αναλύθηκαν οι μεμβρανικές πρωτείνες με SDS-PAGE. Η πρωτεϊνική κατανομή ευαίσθητων και *in vitro* ανθεκτικών στελεχών *C. burnetii* βρέθηκε, μετά από SDS-PAGE, ίδια με αυτή των στελεχών αναφοράς (7, 24, 73, 151). Επομένως, δεν φαίνεται να υπάρχει αδιαβατότητα της pefloxacin λόγω μετάλλαξης των πορινών.

Μελέτη της ενεργού εκροής του αντιβιοτικού από το κύτταρο (efflux): Πειραματικές μελέτες πρόσληψης του αντιβιοτικού, σε άλλα Gram αρνητικά βακτήρια, έδειξαν ότι προσθήκη ενός αγωγού ή φορέα πρωτονίων, όπως για παράδειγμα η καρβονυλική κυανιδική-m-χλωρο-φενυλ-υδραζόνη (CCCP), αναστέλλει την ενεργό εκροή του αντιβιοτικού (29, 56, 122).

Προκειμένου να μελετήσουμε εάν υπάρχει αντίστοιχος μηχανισμός εκροής στη *C. burnetii*, μελετήθηκε η ενδοκυττάρια συγκέντρωση της pefloxacin σε βακτηριακά κύτταρα *C. burnetii* (ευαίσθητα-ανθεκτικά) και Vero κύτταρα μολυσμένα με το ευαίσθητο ή το ανθεκτικό στέλεχος, παρουσία της CCCP. Τα πειράματα έδειξαν ότι η ενδοκυττάρια συγκέντρωση της pefloxacin δεν μεταβάλλεται όταν η πρόσληψη του αντιβιοτικού γίνεται παρουσία της CCCP. Επομένως, η *C. burnetii* δεν αναπτύσσει μηχανισμό αντοχής λόγω έκκρισης του αντιβιοτικού από το κύτταρο (efflux).

Επομένως, η αυξημένη MIC των *in vitro* ανθεκτικών στη pefloxacin στελεχών *C. burnetii*, δεν δικαιολογείται ούτε από μηχανισμό ενεργού εκροής του αντιβιοτικού.

Στη συνέχεια μελετήθηκε το ενδεχόμενο η ελαττωμένη ενδοκυττάρια συγκέντρωση του αντιβιοτικού να οφείλεται σε μείωση της διαμέτρου των πορινών.

Το φαινόμενο αυτό έχει παρατηρηθεί στην *P. aeruginosa*, στην οποία η φυσική αντοχή οφείλεται στις μικρές διαστάσεις των πορινών (86, 118). Στη διεθνή βιβλιογραφία αναφέρεται ότι μικροοργανισμοί, όπως για παράδειγμα η *E. coli* και *S. typhimurium*, διαθέτουν το σύστημα *envZ/ompR* με το οποίο ρυθμίζουν τη διάμετρο των πορινών τους, *ompC* και *ompF*, και κατά συνέπεια την είσοδο του αντιβιοτικού ανάλογα με την οσμωτική πίεση και τη θερμοκρασία του περιβάλλοντος (103).

Μελέτες στην *C. burnetii*, έδειξαν ότι το όξινο περιβάλλον των φαгоλυσοσωμάτων παρεμποδίζει τη δράση των αντιβιοτικών (131).

Λαμβάνοντας υπ' όψιν τα παραπάνω δεδομένα διερευνήσαμε το ενδεχόμενο οι υψηλές τιμές MIC να οφείλονται σε ελάττωση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης του αντιβιοτικού, λόγω της μείωσης της διαμέτρου των πορινών της *C. burnetii*, στο όξινο περιβάλλον του φαгоλυσοσώματος.

Ελέγχθηκε η επίδραση του pH στην πρόσληψη της pefloxacin από βακτηριακά κύτταρα *C. burnetii* (ευαίσθητα, *in vitro* ανθεκτικά) και Vero κύτταρα μολυσμένα με το ευαίσθητο ή το ανθεκτικό στέλεχος *C. burnetii*. Τα πειράματά μας έδειξαν ότι η ενδοκυττάρια συγκέντρωση του αντιβιοτικού ελαττώνεται όταν η πρόσληψη του αντιβιοτικού γίνεται σε όξινο pH. Η διαφορά αυτή είναι στατιστικά σημαντική ($P < 0.05$).

Επίσης διερευνήθηκε η επίδραση της θερμοκρασίας στην πρόσληψη της pefloxacin από ευαίσθητα και ανθεκτικά στελέχη *C. burnetii*. Τα *in vitro* πειράματά μας, στους 25 και 37°C, έδειξαν ότι η θερμοκρασία δεν έχει καμία επίδραση στην πρόσληψη του αντιβιοτικού, στην *C. burnetii*, αφού η ενδοκυττάρια συγκέντρωση του δεν επηρεάστηκε από τις μεταβολές της θερμοκρασίας.

Επομένως, το τελικό συμπέρασμα που δικαιολογεί τις αυξημένες τιμές MIC των ανθεκτικών στελεχών σχετίζεται κατ' αρχήν με τη μετάλλαξη στη περιοχή QRDR του γονιδίου *gyrA* της *C. burnetii* και στην ελαττωμένη ενδοκυττάρια συγκέντρωση της pefloxacin, ενδεχομένως λόγω μείωσης της διαμέτρου των πορινών στο όξινο περιβάλλον του φαгоλυσοσώματος. Παραπέρα πειραματικές μελέτες είναι ωστόσο αναγκαίες για να επιβεβαιωθεί το παραπάνω συμπέρασμα.

Τα αποτελέσματά μας οδηγούν στο συμπέρασμα ότι παρόλο που η *C. burnetii* παρουσιάζει ευαισθησία στις κινολόνες, είναι προτιμότερο να μην χρησιμοποιούνται στην κλινική πράξη για τη θεραπεία του χρόνιου πυρετού Q, που απαιτεί παρατεταμένη θεραπευτική αγωγή, διότι ο μικροοργανισμός αυτός μπορεί να αναπτύξει εύκολα αντοχή. Το γεγονός ότι δεν βρέθηκαν κλινικά στελέχη με αντοχή στις κινολόνες, κατά τη διάρκεια της μελέτης μας, οφείλεται στο ότι οι κινολόνες δεν αποτελούν αντιβιοτικά πρώτης γραμμής για τη θεραπεία του πυρετού Q. Στα κριτήρια για την επιλογή του αντιβιοτικού θα πρέπει να λαμβάνεται υπ' όψιν η ικανότητα τους να εισέρχονται στο κύτταρο ξενιστή, καθώς επίσης και η ικανότητα δράσης τους σε όξινο pH.

Συμπέρασμα :

- Στη παρούσα μελέτη τροποποιήθηκαν και βελτιώθηκαν οι τεχνικές nested PCR και shell vials, ώστε να αυξηθεί η ευαισθησία στις τεχνικές ανίχνευσης και απομόνωσης *C. burnetii* σε αίμα ασθενών με πυρετό Q, αιγοπροβάτων και κρότωνες.

- Με την εφαρμογή των μεθόδων αυτών απομονώθηκαν, για πρώτη φορά στην Ελλάδα, 9 στελέχη *C. burnetii* από ασθενείς με οξεία λοίμωξη πυρετού Q, 2 στελέχη από αιγοπρόβατα και 3 στελέχη από κρότωνα.
- Αναπτύχθηκε η τεχνική PCR-RFLP για την ανίχνευση ανθεκτικών στις κινολόνες στελεχών *C. burnetii*.
- Η ταυτοποίηση των απομονωθέντων στελεχών, χρησιμοποιώντας τις τεχνικές PCR-RFLP και Sequencing, έδειξε ότι δεν διαφέρουν από τα στελέχη αναφοράς Nine Mile (οξείας λοίμωξης) και Q212 (χρόνιας λοίμωξης).
- Τα απομονωθέντα στελέχη *C. burnetii* δεν εμφανίζουν αντοχή στα αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία του πυρετού Q.
- Την μεγαλύτερη ευαισθησία έναντι της *C. burnetii* εμφανίζουν η ofloxacin, η trovafloxacin και η doxycycline (MICs 1-2μg/ml). Λιγότερο δραστικά *in vitro* αποδείχθηκαν η pefloxacin (MICs 1-4μg/ml) και η clarithromycin (MICs 2-4μg/ml). Η ciprofloxacin αποδείχτηκε το αντιβιοτικό με την μικρότερη δραστικότητα (MICs 4-8μg/ml).
- Η *C. burnetii* δεν αναπτύσει μηχανισμό αντοχής από αδιαβατότητα, λόγω μετάλλαξης των πορινών, ούτε από ενεργό εκροή του αντιβιοτικού.
- Η ελαττωμένη ενδοκυττάρια συγκέντρωση της pefloxacin πιθανόν να οφείλεται σε ελαττωμένη πρόσληψη του αντιβιοτικού στο όξινο περιβάλλον των φαγολυσσωμάτων, λόγω ελάττωσης της διαμέτρου των πορινών.
- Ανθεκτικά στελέχη *C. burnetii* μπορούν να δημιουργηθούν, έναντι των κινολονών, από μετάλλαξη στη περιοχή QRDR του γονιδίου *gyrA* της *C. burnetii*. Για τον λόγο αυτό οι κινολόνες δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται στη κλινική πράξη για τη θεραπεία του χρόνιου πυρετού Q.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα εργασία περιλαμβάνει δύο μέρη με επιμέρους ενότητες.

Μέρος πρώτο: Ανίχνευση, Απομόνωση και Ταυτοποίηση στελεχών *C. burnetii* σε Κρήτη και Κύπρο.

1) Ανίχνευση *C. burnetii* σε ασθενείς με οξεία λοίμωξη πυρετού Q και ξενιστές (αιγοπρόβατα, κρότωνες) που υπεισέρχονται στην επιδημιολογική αλυσίδα της *C. burnetii*.

Βελτιώθηκε η τεχνική της nested PCR ώστε μέσα σε 4 ώρες να έχουμε απάντηση. Η ανίχνευση της *C. burnetii* ήταν δυνατή σε 4 από τα 9 εξεταζόμενα δείγματα από ασθενείς, σε 5 από τα 9 δείγματα αίματος αιγοπροβάτων και σε 11 από τους 142 κρότωνες. Η μελέτη αυτή περιλαμβάνει τη πρώτη επιτυχημένη εφαρμογή της nested PCR σε φυσικά μολυσμένους κρότωνες. Η nested PCR, χρησιμοποιώντας ειδικούς για τη *C. burnetii* πλασμιδιακούς εναρκτές, κρίνεται αποτελεσματική τόσο στην εφαρμογή της στις επιδημιολογικές μελέτες για την αναζήτηση *C. burnetii* σε ξενιστές (ζώα, κρότωνες), όσο και στην εργαστηριακή διάγνωση του πυρετού Q σε ασθενείς.

2) Απομόνωση στελεχών *C. burnetii*.

Προσαρμόστηκε τεχνική των shell vials σε Vero κύτταρα αντί σε HEL. Συνολικά απομονώθηκαν 14 στελέχη *C. burnetii* από τα οποία 9 προέρχονται από ασθενείς με οξεία λοίμωξη πυρετού Q (9/25, 36%), 1 από αιμόλεμφο κρότωνος (1/8, 12,5%), 2 από ολικό σώμα κρότωνος (2/142, 1,4%) και 2 από αιγοπρόβατα (2/9, 22%). Τα στελέχη αυτά είναι τα πρώτα που απομονώθηκαν σε Ελλαδικό χώρο. Η παρούσα μελέτη περιλαμβάνει τη πρώτη επιτυχημένη εφαρμογή της τεχνικής των shell vials σε φυσικά μολυσμένους κρότωνες. Αποδείχτηκε ιδιαίτερα χρήσιμη και αποτελεσματική στην απομόνωση στελεχών *C. burnetii*, τα οποία μπορούν περαιτέρω να μελετηθούν γενετικά.

3) Ταυτοποίηση των απομονωθέντων στελεχών.

Η ταυτοποίηση των 14 συνολικά απομονωθέντων στελεχών *C. burnetii* έγινε με εφαρμογή των τεχνικών PCR-RFLP και Sequencing. Τα απομονωθέντα στελέχη *C. burnetii* βρέθηκαν ταυτόσημα με τα στελέχη αναφοράς Nine Mile (οξείας λοίμωξης) και Q212 (χρόνιας λοίμωξης), ανεξάρτητα από τη γεωγραφική προέλευση των δειγμάτων, τον ξενιστή και τη διαφορετική κλινική εικόνα των ασθενών με πυρετό Q.

Μέρος δεύτερο: Μελέτη της ευαισθησίας και των μηχανισμών αντοχής που δυνητικά μπορεί να αναπτύξει η *C. burnetii* στις κινολόνες.

1) Εύρεση της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC), των

απομονωθέντων στελεχών *C. burnetii*, στις τετρακυκλίνες, μακρολίδες και κινολόνες.

Προσαρμόσαμε τη τεχνική των shell vials και του άμεσου ανοσοφθορισμού σε Vero κύτταρα. Την μικρότερη MIC την παρουσίασαν στα αντιβιοτικά doxycycline, ofloxacin και trovafloxacin (από 1-2μg/ml). Λιγότερο δραστικά αποδείχθηκαν η pefloxacin (από 1-4μg/ml) και η clarithromycin (από 2-4μg/ml). Η ciprofloxacin ήταν το αντιβιοτικό με την μικρότερη δραστικότητα (από 4-8μg/ml). Η *in vitro* δράση της trovafloxacin, μια καινούργια κινολόνη, μελετήθηκε για πρώτη φορά. Τα αποτελέσματα της μελέτης μας, επαληθεύουν την βακτηριοστατική δράση των παραπάνω αντιβιοτικών, εξηγούν την θεραπευτική αποτυχία των χρόνιων λοιμώξεων πυρετού Q και προτείνουν τη χορήγηση της trovafloxacin εναλλακτικά στη θεραπεία του οξέος πυρετού Q.

2) Διερεύνηση μηχανισμών αντοχής που δυνητικά μπορεί να αναπτύξει η *C. burnetii* στις κινολόνες (*gyrA*, Uptake).

A) Παρασκευή ανθεκτικών στελεχών *C. burnetii* στη pefloxacin.

Κατά τη διάρκεια της παρούσας μελέτης δεν βρέθηκαν φυσικά στελέχη *C. burnetii* με αντοχή στις κινολόνες. Προκειμένου να μελετηθεί η αντοχή που δυνητικά μπορεί να αναπτύξει η *C. burnetii* στις κινολόνες, δύο από τα απομονωθέντα ευαίσθητα στελέχη (MICs 1-4μg/ml) μετατράπηκαν, *in vitro*, σε ανθεκτικά στη pefloxacin (MICs 32-64μg/ml). Η μετατροπή έγινε μετά από καλλιέργεια τους σε διαδοχικά αυξανόμενες συγκεντρώσεις του αντιβιοτικού στο θρεπτικό υλικό.

B). Μελέτη της περιοχής QRDR του γονιδίου *gyrA* της *C. burnetii*.

Χρησιμοποιώντας τη τεχνική PCR έγινε ανίχνευση της περιοχής QRDR του γονιδίου *gyrA* της *C. burnetii* στα ευαίσθητα (MIC </4 μg/ml) και στα *in vitro* ανθεκτικά στελέχη (MIC >\8 μg/ml). Μετά από εφαρμογή της μεθόδου sequencing στα προϊόντα της PCR, βρέθηκε μια σημειακή μετάλλαξη στα ανθεκτικά στελέχη, που αντιστοιχεί στη θέση 87 των αμινοξέων της πρωτεΐνης GyrA. Στην συνέχεια αναπτύχθηκαν οι τεχνικές PCR-RFLP για την ανίχνευση της μετάλλαξης αυτής, κατευθείαν σε κλινικά δείγματα, με απώτερο στόχο τον ορθότερο θεραπευτικό χειρισμό του πυρετού Q.

Γ). Μελέτη των πρωτεϊνών της εξωτερικής μεμβράνης. Χρησιμοποιώντας τη τεχνική Renographin Gradient Centrifugation έγινε καθαρισμός των βακτηρίων *C. burnetii* από το κύτταρο ξενιστή. Ακολούθησε απομόνωση της εξωτερικής μεμβράνης ευαίσθητων (MIC </4 μg/ml) και *in vitro* ανθεκτικών στελεχών *C. burnetii* (MIC >\8 μg/ml). Οι μεμβρανικές πρωτεΐνες εξετάστηκαν χρησιμοποιώντας τη τεχνική του SDS-PAGE. Δεν υπήρξαν διαφορές ανάμεσα στα ευαίσθητα και τα *in vitro* ανθεκτικά στελέχη *C. burnetii*.

Δ). Μελέτη πρόσληψης της pefloxacin (Uptake).

Μελετήθηκε η ενδοκυττάρια συγκέντρωση της pefloxacin τροποποιώντας τη μέθοδο του Charman και Georgoparakou, ώστε να μπορεί να εφαρμοστεί σε βακτηριακά κύτταρα αλλά και σε Vero κύτταρα μολυσμένα με *C. burnetii*. Τα πειράματα εφαρμόστηκαν σε ευαίσθητα (MIC </4 μg/ml) και *in vitro* ανθεκτικά στις κινολόνες στελέχη *C. burnetii* (MIC >\8 μg/ml) (βακτήρια, μολυσμένα κύτταρα). Μετρήθηκε ο ενδοκυττάριος φθορισμός της pefloxacin, μετά από διάρρηξη των κυττάρων, σε τακτά χρονικά διαστήματα. Τα ευαίσθητα στελέχη

συγκεντρώνουν μεγαλύτερη ενδοκυττάρια ποσότητα αντιβιοτικού απ'ότι τα ανθεκτικά. Η διαφορά αυτή είναι στατιστικά σημαντική ($P < 0.05$). Η πρόσληψη της refloxacin δεν μεταβάλλεται παρουσία της CCCP.

Ε). Μελέτη παραγόντων που πιθανόν να επηρεάζουν την ενδοκυττάρια συγκέντρωση της refloxacin.

1. **Θερμοκρασία.** Πειράματα πρόσληψης της refloxacin, στους 25 και 37°C έδειξαν ότι η θερμοκρασία δεν επηρεάζει την ενδοκυττάρια συγκέντρωση του αντιβιοτικού.
2. **pH.** Εξετάστηκε η πρόσληψη της refloxacin σε δύο διαφορετικά pH (4.5, 7.2). Βρέθηκε ότι το όξινο pH επηρεάζει αρνητικά την ενδοκυττάρια συγκέντρωση της refloxacin. Η διαφορά αυτή είναι στατιστικά σημαντική ($P < 0.05$).

Συμπέρασμα: Η *C. burnetii* δεν αναπτύσει μηχανισμό αντοχής από αδιαβατότητα, λόγω μετάλλαξης των πορινών, ούτε από ενεργό εκροή του αντιβιοτικού. Η ελαττωμένη ενδοκυττάρια συγκέντρωση της refloxacin, πιθανόν να οφείλεται σε ελαττωμένη πρόσληψη του αντιβιοτικού στο όξινο περιβάλλον των φαγολυσοσωμάτων, λόγω ελάττωσης της διαμέτρου των πορινών. Ανθεκτικά στελέχη *C. burnetii*, έναντι των κινολονών, μπορούν να δημιουργηθούν μετά από μετάλλαξη στη περιοχή QRDR του γονιδίου *gyrA* της *C. burnetii*. Για τον λόγο αυτό, οι κινολόνες δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται στη κλινική πράξη για τη θεραπεία του χρόνιου πυρετού Q.

**ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ
ΑΝΑΦΟΡΕΣ**

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. **Aitken, I .D., K. Bogel, E. Cracea, E. Edlinger, D. Houwers, H. Krauss, M. Rady, J. Rehacek, H. G. Schiefer, N. Schmeer, I. V. Tarasevich, and G. Tringali.** 1987. Q Fever in Europe: Curent Aspects of Aetiology, Epidemiology, Human Infection Diagnosis and Therapy. *Infection* **15**:323-327.
2. **Aitken, I. D.** Q fever in the United Kingdom and Ireland. 1987. *Zentralbl. Bacteriol. Mikrobiol. Hyg.* **267**: 37.
3. **Akporiaye, E. T., J. D. Rowatt, A. A. Aragon, and O. G. Baca.** 1983. Lysosomal response of a murine macrophage-like cell line persistently infected with *Coxiella burnetii*. *Infect. Immun.* **40**: 1155.
4. **Aldighieri, N. J., h. Torres, and D. Raoult.** 1992. Susceptibility of *Rickettsia conorii*, *R. rickettsii*, and *Coxiella burnetii* to PD127,391, PD131,628, Pefloxacin, Ofloxacin, and Ciprofloxacin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **36(11)**: 2529-2532.
5. **Alfonso, P., J.M. Aguado, J.A. Riancho, I. Sampedro, P. Matorras, and J. Gonzalez-Macias.** 1991. Erythromycin and the treatment of *Coxiella burnetii* pneumonia. *J. Antimicrob. Chemother.* **28**:455-459.
6. **Amano, K.-L., and J. C. Williams.** 1984. Chemical and immunological characterization of lipopolysaccharides from phase I and phase II *Coxiella burnetii*. *J. Bacteriol.* **160**: 994.
7. **Amano, K.-L., J. C. Williams, T. F. McCaul, and M. C. Peacock.** 1984. Biochemical and immunological properties of *Coxiella burnetii*

- cell wall and peptidoglycan-protein complexes. *J. Bacteriol.* **160**: 982.
8. **Applefeld, M. M., L. M. Billingsley, H. J. Tucker, and P. Fiset.** 1977. Q fever endocarditis a case occurring in the United States. *Am. Heart J.* **93**: 669-670.
 9. **Babudieri, B.** 1959. Q fever: a zoonosis. *Adv. Vet. Sci.* **5**: 81.
 10. **Baca, O. G., I. L. Martinez, A. S. Aragon, and D. Klassen.** 1980. Isolation and partial characterization of a lipopolysaccharide from phase II *Coxiella burnetii*. *Can. J. Microbiol.* **26**: 819.
 11. **Baca, O. G., E. T. Akporiaye, A. S. Aragon, I. L. Martinez, M. V. Robles, and N. L. Warner.** 1981. Fate of phase I and phase II *Coxiella burnetii* in several macrophage-like tumor cell lines. *Infect. Immun.* **33**: 258.
 12. **Baca, O. G., T. O. Skott, E. T. Akporiaye, R. DeBlassie, and H. A. Crissman.** 1985. Cell cycle distribution patterns and generation times of L929 fibroblast cells persistently infected with *Coxiella burnetii*. *Infect. Immun.* **47**: 366.
 13. **Beati, L., P-F Humair, A. Aeschlimann, and D. Raoult.** 1994. Identification of spotted fever group *Rickettsiae* isolated from *dermacentor marginatus* and *ixodes ricinus* ticks collected in Switzerland. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **51(2)**: 138-148.
 14. **Beati, L., V. Roux, A. Ortuno, J. Castella, F. Segura Porta, and D. Raoult.** 1996. Phenotypic and genotypic characterization of Spotted fever group *Rickettsiae* isolated from Catalan *Rhipicephalus sanguineus* ticks. *J. Clin. Microbiol.* **34(11)**: 2688-2694.
 15. **Bental, T., M. Fejgin, A. Keysary, S. Rzotkiewicz, C. Oron, R. Nachum, Y. Beyth, and R. Lang.** 1995. Chronic Q fever of pregnancy presenting as *Coxiella burnetii* placentitis: successful outcome following therapy with erythromycin and rifampin. *Clin. Inf. Dis.* **21**: 1318-1321.

16. **Bernard, K. W., G. L. Parham, W. G. Winkler, and C. G. Helmick.** 1982. Q fever recommendations for research facilities using sheep. *Infect. Control.* **3**: 461.
17. **Brenwald, N. P., M. J. Gill, and R. Wise.** 1998. Prevalence of a putative efflux mechanism among fluoroquinolone resistant clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Ant. Agents Chemot.* **42(8)**: 2032-2035.
18. **Brouqui, P., H. Tissot Dupont, M. Drancourt, Y. Berian, J. Etienne, C. Leport, F. Goldstein, P. Massip, M. Micoud, A. Bertrand, and D. Raoult.** 1993. Epidemiologic and clinical features of chronic Q fever: 92 cases from France (1982-1990). *Arch. Intern. Med.* **153**: 642-648.
19. **Bryan, L. E., J. Bedard.** 1991. Impermeability to quinolones in gram-positive and gram-negative bacteria. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **10(4)**: 232-239.
20. **Burgdorfer, W.** 1970. Hemolymph test. A technique for the detection of rickettsiae in ticks. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **19**: 1010-1014.
21. **Burnet, F. M., M. Freeman.** 1937. Experimental studies on the virus of Q fever. *Med. J. Aust.* **2**: 299-305.
22. **Burton, P. R., N. Korkova, and D. Paretsky.** 1971. Electron microscopic studies of the *Rickettsia Coxiella burnetii*: entry, lysosomal response, and fate of rickettsial DNA in L-cells. *Can. J. Microbiol.* **17**: 143.
23. **Burton, P. R., Stueckemann, J., Welsh, R. M., and Paretsky, D.** 1978. Some ultrastructural effects of persistent infections by the *Rickettsia Coxiella burnetii* in mouse L cells and green monkey kidney (Vero) cells. *Infect. Immun.* **21**: 556.
24. **Cai, J., and S. L. Zhang.** 1988. Analysis of proteins from cell envelopes of *Coxiella burnetii*. *Chin. J. Microbiol. Immunol.* **1**: 30.
25. **Caminopetros J.** 1948. La fièvre Q en Grèce. Le lait source de l'infection pour l'homme et les

- animaux. Ann de Parasitol Hum et Comp **23**:107-108.
26. **Canonico, P. G., M. J. Van Zwieten, and W. A. Christmas.** 1972. Purification of large quantities of *Coxiella burnetii* by density gradient centrifugation. Appl. Microbiol. **23**: 1015.
 27. **Cetinkaya, B., H. Kalender, H. B. Ertas, A. Muz, N. Arslan, and H. Ongor.** 2000. Seroprevalence of coxiellosis in cattle, sheep and people in the east Turkey. Vet. Rec. **146(5)**: 131-136.
 28. **Chapman, J. S., and N. H. Georgopapadakou.** 1988. Routes of quinolone permeation in *Escherichia coli*. Antimicrob. Agents Chemother. **32(4)**: 438-442.
 29. **Charvalos, E., Y. Tselentis, N. M. Hamzhepour, T. Koehler, J. C. Pechere.** 1995. Evidence for an efflux pump in multidrug resistant *Campylobacter jejuni*. Antimicrob. Agents Chemother **39**:2019-2022.
 30. **Charvalos, E., E. Peteinaki, I. Spyridaki, S. Manetas, and Y. Tselentis.** 1996. Detection of ciprofloxacin resistance mutations in *Campylobacter jejuni* gyrA by nonradioisotopic single-strand conformation polymorphism and direct DNA sequencing. J. Clin. Lab. Anal. **10**:129-133.
 31. **Cormican, M. G., and R. N. Jones.** 1995. Susceptibility to Levofloxacin Predicted from In Vitro Susceptibility Testing Results Obtained with Ciprofloxacin and with Ofloxacin. J. Clinical Microbiol. **33(1)**:215-216.
 32. **Coyle P. V., J. H. Connolly, and A. A. J. Adgey.** 1983. Q fever endocarditis in Northern Ireland. Lancet (letter).
 33. **D'Angelo, L.J., and R. Hetherington.** 1979. Q fever treated with erythromycin. Br. Med. J. **2**: 305.
 34. **Davis, G. E., and H. R. Cox.** 1938. A filter-passing infectious agent isolated from ticks. Isolation from *Dermacentor andersoni*, reactions

- in animals, and filtration experiments. Public Health Rep. **53**: 2259.
35. **David, W., and M. G. Peacock.** 1988. Laboratory diagnosis of rickettsial diseases. Biology of Rickettsial diseases volume II, chapter 4. CRC Press, Inc. 135-149.
 36. **Denis, A., and N. J. Moreau.** 1993. Mechanisms of quinolone resistance in clinical isolates: accumulation of sparfloxacin and of fluoroquinolones of various hydrophobicity, and analysis of membrane composition. J. Antim. Chem. **32**: 379-392.
 37. **Derrick, E. H.** 1937. Q fever, new fever entity: clinical features, diagnosis and laboratory investigation. Med. J. Aust. **2**: 281.
 38. **Derrick, E. H.** 1937. The course of infection with *Coxiella burnetii*. Med. J. Aust. **1**:1051-1057.
 39. **Derrick, E. H.** 1939. *Rickettsia burnetii*: the cause of Q fever. Med. J. Aust. **1**: 14.
 40. **Derlinger, R. B.** 1949. Clinical aspects of Q fever in southern California: a study of 80 hospitalized cases. Ann. Intern. Med. **30**: 510.
 41. **Dimri, G. P., and H. K. Das.** 1990. Cloning and sequence analysis of a gyrA gene of *Klebsiella pneumoniae*. Nucleic Acids Res. **18**:151-156.
 42. **Drancourt, M., and D. Raoult.** 1989. In vitro susceptibility of *Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia conorii* to roxithromycin and pristinamycin. Antimicrob. Agents Chemother. **33**: 2146.
 43. **Drancourt, M., D. Raoult, B. Xeridat, L. Milandre, M. Nesri, and P. Dano.** 1991. Q fever meningoencephalitis in five patients. Eur. J. Epidemiol. **7**: 134-138.
 44. **Drancourt, M., P. J. Kelly, R. Regnery, and D. Raoult.** 1992. Identification of Spotted fever group *Rickettsiae* using polymerase chain reaction and restriction endonuclease length polymorphism analysis. Acta virol. **36**: 1-6.

45. **Drancourt, M., and D. Raoult.** 1993. Methodology of antibiotics testing for intracellular pathogens. CRC Press, Inc. Chapter 5. 72-85.
46. **Dupont, H. T., R. B. Hornick, H. S. Levin, M. J. Rapaport, and T. E. Woodward.** 1971. Q fever hepatitis. *Ann. Intern. Med.* **74**: 198.
47. **Dupont, H. T., D. Raoult, P. Brouquil, F. Janbon, D. Peyramond, P. J. Weiller, C. Chicheportiche, M. Nezri, and R. Poirier.** 1992. Epidemiologic features and clinical presentation of acute Q fever in hospitalized patients: 323 French cases. *Am. J. Med.* **93**: 427-434.
48. **Dupont, H. T., J-P, Cornet, and D. Raoult.** 1994. Identification of *Rickettsiae* from ticks collected in the central African republic using the polymerase chain reaction. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **50(3)**: 373-380.
49. **Dupuis G., O. Peter, and D. Pedroni.** 1985. Aspects cliniques observes lors d'une epidemie de 415 cas de fièvre Q. *Schweiz Med Wochenschr.* **115**:814-8.
50. **Dyer, R. E.** 1939. Similarity of Australian Q fever and a disease caused by an infectious agent isolated from ticks in Montana. *Public Health Rep.* **54**: 1229.
51. **Ellis, M. E., C. C. Smith, and M. A. Moffat.** 1983. Chronic or fatal Q fever infection: a review of 16 patients seen in North East Scotland (1967-80). *Q. J. Med.* **52**: 54-66.
52. **Espejo-Arenas, E., and D. Raoult.** 1989. First isolates of *Rickettsia conorii* in Spain using a centrifugation-shell vial assay. *J. Infect. Dis.* **159**:1158-1159.
53. **Eremeeva, M. E., L. Beati, V. A. Makarova, N. E. Fetisova, I. V. Tarasevich, N. M. Balayeva, and D. Raoult.** 1994. Astrakhan fever rickettsiae: antigenic and genotypic analysis of isolates obtained from human and *Rhipicephalus pumilio* ticks. **51(5)**: 697-706.
54. **Fernandez, G., J. M. Muelas, J. M. Aguado, G. Renedo, J. Fraile, F. Soriano, and E. De Villalobos.** 1988. Q fever endocarditis on

- porcine bioprosthetic valves. Clinicopathologic features and microbiologic findings in three patients treated with doxycycline, cotrimoxazole, and valve replacement. *Ann. Intern. Med.* **108**: 209-213.
55. **Freeman, R., and M. E. Hodson.** 1972. Q fever endocarditis treated with trimethoprim and sulphamethoxazole. *Br. Med. J.* **1**: 419-420.
56. **Furet, Y. X., J. Deshusses, J. C. Pechere.** 1992. Transport of pefloxacin across the bacterial cytoplasmic membrane in quinolone-susceptible *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **36(11)**: 2506-2511.
57. **Gikas, A., I. Spyridaki, A. Psaroulaki, D. Kofterithis, and Y. Tselentis.** 1998. In vitro susceptibility of *Coxiella burnetii* to trovafloxacin in comparison with susceptibilities to pefloxacin, ciprofloxacin, ofloxacin, doxycycline, and clarithromycin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**:2747-2748.
58. **Gimenez, D. F.** 1964. Staining *Rickettsiae* in yolk-sac cultures. *Stain Technol.* **39**:135-140.
59. **Hackstadt, T. and Williams, J. C.** 1981. Biochemical stratagen for obligate parasitism of eukaryotic cells by *Coxiella burnetii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **78**: 3240.
60. **Hackstadt, T. and Williams, J. C.** 1983. pH dependence of the *Coxiella burnetii* glutamate transport system. *J. Bacteriol.* **154**: 598.
61. **Hackstadt, T., and J. C. Williams.** 1984. Metabolic adaptations of *Coxiella burnetii* to intraphagolysosomal growth, in *Microbiology*. American Society for Microbiology, Washington, D. C. 266.
62. **Hackstadt, T., M. G. Peacock, P. J. Hitchcock, and R. L. Cole.** 1985. Lipopolysaccharide variation in *Coxiella burnetii*: intrastrain heterogeneity in structure and antigenicity. *Infect. Immun.* **48 (2)**: 359-365.
63. **Hackstadt, T.** 1986. Antigenic variation in the phase I lipopolysaccharide of *Coxiella burnetii* isolates. *Infect. Immun.* **52 (1)**: 337-340.

64. **Haldane, E. V., T. J. Marrie, R. S. Faulkner, S. H. Lee, J. H. Cooper, D. D. MacPherson, and T. J. Montague.** 1983. Endocarditis due to Q fever in Nova Scotia: experience with five patients in 1981-1982. *J. Infect. Dis.* **148**: 978-985.
65. **Hand, W. L., and N. L. Thompson.** 1986. Contrast between phagocyte antibiotic uptake and subsequent intracellular bactericidal activity. *Antimicrob. Agents Chemother.* **29**: 135.
66. **Heinzen R. A., M. E. Frazier and L. P. Mallavia.** 1990. Nucleotide sequence of *Coxiella burnetii* superoxide dismutase. *Nucleic Acids Research.* **18(21)**: 6437.
67. **Hendrix, L., and Mallavia, L. P.** 1984. Active transport of proline by *Coxiella burnetii*. *J. Gen. Microbiol.* **130**: 2857-2863.
68. **Hendrix, L. R., L. P Mallavia, and J. E. Samuel.** 1993. Cloning and sequencing of *Coxiella burnetii* outer membrane protein gene com1. *Infection and Immunity.* **61(2)**: 470-477.
69. **Hooper D. C..** New quinolone antibacterial agents. *Clinical Microbiology.* 217-219.
70. **Hooper D. C., J. S. Wolfson, E. Y. Ng, and M. N. Swartz.** 1987. Mechanisms of action of and resistance to ciprofloxacin. *American J. Medicine.* Volume 82 (suppl 4A).12-20.
71. **Jabarit-Aldighieri, N., H. Torres, and D. Raoult.** 1992. Susceptibility of *Rickettsia conori*, *R. Rickettsii*, and *Coxiella burnetii* to PD 127,391, PD 131,628, Pefloxacin, Ofloxacin, and Ciprofloxacin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **36(11)**:2529-2532.
72. **Janbon, F., O. Jonquet, J. Reynes, and A. Bertrand.** 1989. Use of Pefloxacin in the Treatment of Rickettsiosis and Coxiellosis. *Reviews of Infectious Diseases.***11, Supplement 5.**
73. **Jerrells, T. R., D. J. Hinrichs, and L. P. Mallavia.** 1974. Cell envelope analysis of *Coxiella burnetii* phase I and phase II. *Can. J. Microbiol.* **20**: 1465.

74. **Kanematsu, E., T. Deguchi, M. Yasuda, T. Kawamura, Y. Nishino, and Y. Kawada.** 1998. Alteration in the gyrA subunit of DNA gyrase and the ParC subunit of DNA topoisomerase IV associated with quinolone resistance in *Enterococcus faecalis*. *Antim. Agents Chemother.* **42(2)**: 433-435.
75. **Kaplan, M. M., and P. Bertagna.** 1955. The geographical distribution of Q fever. *Bull. WHO.* **13**: 829.
76. **Kazar, J.** 1988. Immunity in Q fever. *Acta Virol.* **32**: 358.
77. **Kelly, P. J., D. Raoult, and P. R. Mason.** 1991. Isolation of spotted fever group rickettsias from triturated ticks using a modification of the centrifugation-shell vial technique. *Trop. Med. Hyg.* **85**:397-398.
78. **Ken-Ichi, A., and J. C. Williams.** 1984. Chemical and Immunological characterization of lipopolysaccharides from phase I and phase II *Coxiella burnetii*. *J. Bacter.* **160(3)**: 994-1002.
79. **Keren, G., A. Keysary, R. Goldwasser, and E. Rubinstein.** 1994. The inhibitory effect of fluoroquinolones on *Coxiella burnetii* growth in-vitro systems. *J. Antimicrob. Chemother.* **33**:1253-1255.
80. **Keysary, A., A. Itzhaki, E. Rubinstein, C. Oron, and G. Keren.** 1996. The in vitro anti-rickettsial activity of macrolides. **38**:727-731.
81. **Kimbrough, R. C. III, R. A. Ormsbee, M. Peacock W. R. Rogers, R. W. Bennetts, J. Raaf, A. Krause, and C. Gardner.** 1979. Q fever endocarditis in the United States. *Ann. Intern.Med.* 91:400-2.
82. **Kocagoz, T., C. J. Hackbarth, I. Unsal, E. Y. Rosenberg, H. Nikaido, and H. F. Chambers.** 1996. Gyrase mutations in laboratory-selected, fluoroquinolone-resistant mutants of *mycobacterium tuberculosis* H37Ra. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**:1768-1774.
83. **Krauss, H., H. Schiefer, and H-D, Schmatz.** 1977. Ultrastructural investigations on surface

structures involved in *Coxiella burnetii* phase variation. Infect. Immun. **15**: 890.

84. **Lennette, E. H., and H. H. Welsh.** 1951. Q fever in California. Recovery of *Coxiella burnetii* from the air of premises harboring infected goats. Am. J. Hyg. **54**: 44.
85. **Levy P. V., M. Drancourt, J. Etienne, J. C. Auvergnat, J. Beytout, J. M. Sainty, F. Goldstein, and D. Raoult.** 1991. Comparison of different antibiotic regimens for therapy of 32 cases of Q fever endocarditis. Antimicrob Agents Chemother **35**:533-537.
86. **Lomovskaya, O., A. Lee, K. Hoshino, I. Hiroko, A. Mistry, M. S. Warren, E. Boyer, S. Chamberland, and V. J. Lee.** 1999. Use of a genetic approach to evaluate the consequences of inhibition of efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother. **43(6)**: 1340-1346.
87. **McCaul, T. F., and J. C. Williams.** 1981. Developmental cycle of *Coxiella burnetii*: structure and morphogenesis of vegetative and sporogenic differentiations. J. Bacteriol. **147**: 1063-1076.
88. **Mallavia, L. P., J. E. Samuel, M. L. Kahn, L. S. Thomashow, and M. E. Frazier.** 1984. *Coxiella burnetii* plasmid DNA. (Lieve, L. and Schlessinger, D. Eds.), ASM, Washington, DC. 293-269.
89. **Mallavia, L. P., and E. J. Samuel.** 1989. Genetic diversity of *Coxiella burnetii* strains. Intracellular Parasitism, (Moulder, J. Ed.) CRC Press, Boston. 117-126.
90. **Mallavia L. P., L. L. Whiting, M. F. Minnick, R. Heinzen, D. Reschke, M. Foreman, O. G. Baca, M. E. Frazier.** 1990. Strategy for Detection and Differentiation of *Coxiella burnetii* Strains Using the Polymerase Chain Reaction. Ann N Y Acad Sci **590**:572-581.
91. **Marrero, M., and D. Raoult.** 1989. Centrifugation-shell vial technique for the rapid detection of Mediterranean Spotted fever

- rickettsia in blood culture. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **40**:197-199.
92. **Marrie T. J.**. 1988. Q fever, 1979-1987, Nova Scotia. *Can Dis Wkly Rep.* **14**:69-70.
93. **Marrie T. J.**. 1990. Epidemiology of Q fever. In: Marrie TJ, editor. Q fever. The disease. Boca Raton, FL, CRC Press:49-70.
94. **Marquis, R. E.** Permeability and transport. *Metabolism*. Chapter 24. 587-599.
95. **Maurin, M., A. M. Benoliel, P. Bongrand, and D. Raoult.** 1992. Phagolysosomal alkalization and the bactericidal effect of antibiotics: the *Coxiella burnetii* paradigm. *J. Infect. Dis.* **166**:1097-1102.
96. **Maurin, M., and D. Raoult.** 1993. In Vitro Susceptibilities of Spotted Fever Group *Rickettsiae* and *Coxiella burnetii* to Clarithromycin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37(12)**:2633-2637.
97. **Maurin M., and D. Raoult.** 1993. Current concepts and perspectives in Q fever treatment. CRC Press, Inc. 155-179.
98. **Maurin, M., and D. Raoult.** 1996. Optimum Treatment of Intracellular Infection. *Drugs.* **52(1)**:45-49.
99. **Maurin, M., and D. Raoult.** 1999. Q fever. *Clin. Microbiol. Rev.* **12(4)**: 518-553.
100. **Minnick, M. F., R. Heinzen, M. E. Frazier, and L. P. Mallavia.** 1990. Analysis of QpRS-specific sequences from *Coxiella burnetii*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **590**: 918.
101. **Minnick, M. F., R. Heinzen, M. E. Frazier, and L. P. Mallavia.** 1990. Characterization and expression of the cbbE' gene of *Coxiella burnetii*. *J. Gen. Microbiol.* **136**: 1099.
102. **Minnick, M. F., R. A. Heinzen, D. K. Reschke, M. E. Frazier, and L. P. Mallavia.** 1991. A plasmid encoded surface protein found in chronic disease isolates of *Coxiella burnetii*. *Inf. Immun.* **59(12)**: 4735-4739.

103. **Moenkemann, H., O. Labudova, K. Yeghiazarian, H. Rink, H. Hoeger, and G. Lubec.** 1999. Evidence that taurine modulates osmoregulation by modification of osmolarity sensor protein ENVZ-expression. *Amino Acids* **17(4)**: 347-355.
104. **Montejo Baranda, M, J. Corral Carranceja, and C. Aquirre Errasti.** 1985. Q fever in the Basque Country: 1981-1984. *Rev. Infect. Dis.* **7**:700-701.
105. **Mortimer, P. G. S., and L. J. V. Piddock.** 1991. A comparison of methods used for measuring the accumulation of quinolone by Enterobacteriaceae, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *J. Antim. Chem.* **28**: 639-653.
106. **Muhlemann, K., L. Matter, B. Meyer, and K. Schopfer.** 1995. Isolation of *Coxiella burnetii* from heart valves of patients treated for Q fever endocarditis. *J. Clin. Microbiol.* **33** :428-431.
107. **Musso, D., and D. Raoult.** 1995. *Coxiella burnetii* blood cultures from acute and chronic Q fever patients. *J. Clin. Microbiol.* **33**:3129-3132.
108. **Musso, D., M. Drancourt, S. Osscini, and D. Raoult.** 1996. Sequence of quinolone resistance-determining region of *gyrA* gene for clinical isolates and for an in vitro-selected quinolone-resistant strain of *Coxiella burnetii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**:870-873.
109. **Myers, W. F., O. G. Baca, and C. L. Wisseman.** 1980. Genome size of the Rickettsia *Coxiella burnetii*. *J. of Bacter.* **144(1)**: 460-461.
110. **Nermut, M. V., S. Schramek, and R. Brezina.** 1968. Electron microscopy of *Coxiella burnetii* phase I and II. *Acta Virol.* **12**: 446.
111. **Nikaido, H.** 1996. Multidrug efflux pumps of Gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* **178(20)**: 5853-5859.
112. **O'Rourke, A., M. Peacock, J. Samuel, M. Frazier, D. Natvig, L. Mallavia, and O. Baca.** 1985. Genomic analysis of phase I and phase II

Coxiella burnetii with restriction endonucleases. J. Gen. Microbiol. **131**: 1543.

113. **Ormsbee, R. A., Parker, H., and Pickens, E. G.** 1955. The comparative effectiveness of aureomycin, terramycin, chloramphenicol, erythromycin, and thiomycetin in suppressing experimental rickettsial infections in chick embryos. J. Infect. Dis. **96**: 162.
114. **Ormsbee, R. A.** 1964. An agglutination-resuspension test for Q fever antibodies. J. Immunol. **92**: 159.
115. **Ormsbee, R. A., and M. G. Peacock.** 1964. Metabolic activity of *Coxiella burnetii*. J. Bacteriol. **88**: 1205.
116. **Ormsbee, R. A., E. J. Bell, D. B. Lackman, and G. Tallent.** 1964. The influence of phase on the protective potency of Q fever vaccine. J. Immunol. **92**: 404.
117. **Palmer, S. R. and Young, S. E.** 1982. Q fever endocarditis in England and Wales, 1975-81. Lancet. **2**: 1448.
118. **Pechere, J. C., and T. Kohler.** 1999. Patterns and modes of β -lactam resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. Clin. Microbiol. Infect. **5**: S15-S18.
119. **Perez-del-Molino, A., Aguado, J. M., Riancho, J. A., Sampredo, I., Matorras, P., and Gonzales-Macias, J.** 1991. Erythromycin and the treatment of *Coxiella burnetii* pneumonia. J. Antimicrob. Chemother. **28**: 455.
120. **Peter, O., D. Raoult, and B. Gilot.** 1990. 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**: 1597-1599.
121. **Piddock, L. J. V.** 1991. Mechanism of quinolone uptake into bacterial cells. J. Antimicrob. Chemother. **27**: 399.
122. **Piddock, L. J., Y. F. Jin, V. Ricci, and A. E. Asuquo.** 1999. Quinolone accumulation by *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*

- and *Escherichia coli*. J. Antimicrob. Chemother. **43(1)**: 61-70.
123. **Pospisil, V. F.** 1966. Persistent infection of cell cultures with *Coxiella burnetii*. Acta Virol. **10**: 542.
124. **Powell, O. W., K. P. Kennedy, M. McIver, and H. Silverstone.** 1962. Tetracycline in the treatment of Q fever. Aust. Ann. Med. **11**: 184-188.
125. **Rahman, M., G. Mauff, J. Levy, M. Couturier, G. Pulverer, N. Glasdorf, and J. P. Butzler.** 1994. Detection of 4-quinolone resistance mutations in *gyrA* gene of *Shigella dysenteriae* type I by PCR. Antimicrob. Agents Chemother. **38**:2488-2491.
126. **Raoult, D.** 1988. La fièvre Q: infection a *Coxiella burnetii*. Encycl. Medico-Chir. (Paris) **8077**:1-10.
127. **Raoult, D., J. Urvolgi, J. Etienne, M. Roturier, J. Puel, and H. Chaudet.** 1988. Diagnosis of endocarditis in acute Q fever by immunofluorescence serology. Acta Virol. **32**: 70-74.
128. **Raoult, D., M. R. Yeaman, and O. G. Baca.** 1989. Susceptibility of *Coxiella burnetii* to pefloxacin and ofloxacin in ovo and in persistently infected L929 cells. Antimicrob. Agents Chemother. **33(5)**: 621-623.
129. **Raoult, D., M. R. Yeaman, and O. G. Baca.** 1989. Susceptibility of *Rickettsia* and *Coxiella burnetii* to quinolones. Reviews of Infectious Diseases. **11(5)**: S986.
130. **Raoult, D., G. Vestris, M. Enea.** 1990. Isolation of 16 strains of *Coxiella burnetii* from patients by using a sensitive centrifugation cell culture system and establishment of the strains in HEL cells. J. Clin. Microb. **28**:2482-2484.
131. **Raoult, D., M. Drancourt, and G. Vestris.** 1990. Bactericidal effect of Doxycycline associated with lysosomotropic agents on *Coxiella burnetii* in P388D1 cells. Antimicrob. Agents Chemother. **34(8)**: 1512-1514.

132. **Raoult, D.** 1991. Antibiotic Treatment of *Rickettsiosis*, recent advances and current concepts. *Eur. J. Epidemiol.* **7(3)**:276-281.
133. **Raoult, D., P. Bres, M. Drancourt, and G. Vestris.** 1991. In Vitro Susceptibilities of *Coxiella burnetii*, *Rickettsia rickettsii*, and *Rickettsia conori* to the Fluoroquinolone Sparfoxacin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **35(1)**:88-91.
134. **Raoult, D., H. Torres, and M. Drancourt.** 1991. Shell-vial assay: evaluation of a new technique for determining antibiotic susceptibility tested in 13 isolates of *C. burnetii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **35**:2070-2077.
135. **Raoult, D..** 1993. Treatment of Q fever. . *Antimicrob. Agents Chemother.* **37(9)**: 1733-1736.
136. **Raoult, D., A. Stein.** 1994. Q fever during pregnancy-a risk for women, fetuses, and obstetricians. *N. Engl. J. Med.* **330**:371.
137. **Raoult, D., T. Marrie.** 1995. Q Fever. *Clin. Inf. Dis.* **20**:489-496.
138. **Raoult, D.** 1996. Q fever: still a query after all these years. *J. Med. Microb.* **44**:77-78.
139. **Raoult, D., T. Dupont, C. Foucault, J. Gouvernet, P. E. Fournier, E. Bernit, A. Stein, M. Nesri, J. R. Harle, and P. J. Weiller.** 2000. Q fever 1985-1998. Clinical and epidemiologic features of 1383 infections. *Medicine (Baltimore).* **79(2)**: 109-123.
140. **Reimer, L.G..** 1993. Q fever. *Clin. Microbiol. Reviews.* **6(3)**:193-198.
141. **Rehacek, J., and I. V. Tarasevich.** Q fever. Acari-borne *Rickettsiae* and *Rickettsioses* in Eurasia. 204-343.
142. **Robson, A. O., and C. D. G. Shimmin.** 1959. Chronic Q fever. Clinical aspects of a patient with endocarditis. *Br. Med. J.* **2**: 980-983.
143. **Roman, M. J., Coriz, P. D., and Baca, O. G.** 1986. A proposed model to explain persistent

- infection of host cells with *Coxiella burnetii*. J. Gen. Microbiol. **132**: 1415.
144. **Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis.** 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.
145. **Samuel, J. E., M. E. Frazier, M. L. Kahn, L. S. Thomashow, and L. P. Mallavia.** 1983. Isolation and characterization of a plasmid from phase I *Coxiella burnetii*. Infect. Immun. **41**: 488-493.
146. **Samuel, J. E., M. E. Frazier, and L. P. Mallavia.** 1985. Correlation of plasmid type and disease caused by *Coxiella burnetii*. Infect. Immun. **49**:775-779.
147. **Samuel, J. E., M. E. Frazier, and L. P. Mallavia.** 1988. Stability of plasmid sequences in an acute Q fever strain of *Coxiella burnetii*. J. Gen. Microbiol. **134**: 1795.
148. **Savinelli, E. A., and L. P. Mallavia.** 1990. Comparison of *Coxiella burnetii* plasmids to homologous chromosomal sequences present in a plasmidless endocarditis-causing isolate. Ann. N. Y. Acad. Sci. **590**: 935.
149. **Scola, B., and D. Raoult.** 1996. Diagnosis of mediterranean spotted fever by cultivation of *Rickettsia conorii* from blood and skin samples using the centrifugation shell vial technique and by detection of *R. conorii* in circulating endothelial cells: a 6-year follow-up. J. Clin. Microbiol. **34(11)**: 2722-2727.
150. **Schramek, S., and H. Mayer.** 1982. Different sugar compositions of lipopolysaccharides isolated from phase I and pure phase II cells of *Coxiella burnetii*. Infect. Immun. **38(1)**: 53-57.
151. **Snyder, C. E., and J. C. Williams.** 1986. Purification and chemical characterization of a major membrane protein from *Coxiella burnetii*. In Proceeding of the Annual Meeting of the American Dsociety for Microbiology.
152. **Spicer, A. J., R. W. Crowther, E. E. Vella, E. Bengtsson, R. Miles, and G. Pitzolis.** 1977. Q

- fever and animal abortion in Cyprus. *Transact. Royal Society Trop. Med. Hyg.* **71**:16-20.
153. **Spicer, A. J.** 1979. Investigation of *Coxiella burnetii* infection as a possible cause of chronic liver disease in man. *Transact. Royal Society Trop. Med. Hyg.* **73**:415-417.
154. **Spyridaki, I., A. Gikas, D. Kofteridis, A. Psaroulaki, and Y. Tselentis.** 1998. Q fever in the greek island of Crete: detection, isolation, and molecular identification of eight strains of *Coxiella burnetii* from clinical samples. *J. Clin. Microbiol.* **36**:2063-2067.
155. **Spyridaki, I., A. Psaroulaki, A. Aransay, E. Scoulica, and Y. Tselentis.** 2000. Diagnosis of quinolone-resistant *Coxiella burnetii* strains by PCR-RFLP. *J. Clin. Lab. Anal.* **14**:59-63.
156. **Spyridaki, I., A. Psaroulaki, F. Loukaidis, M. Antonioy, C. Hadjichristodoulou, Y. Tselentis.** 2000. Isolation of *Coxiella burnetii* by a centrifugation shell vial assay from ticks collected in Cyprus: Detection by nested PCR and identification by PCR-RFLP. (in press).
157. **Stein, A., D. Raoult.** 1992. Phenotypic and genotypic heterogeneity of 8 new human *Coxiella burnetii* isolates. *Acta virol.* **36**:7-12.
158. **Stein A., D. Raoult.** 1992. Detection of *Coxiella burnetii* by DNA Amplification Using Polymerase Chain Reaction. *J Clin Microb* **30(9)**:2462-2466.
159. **Stein A, D. Raoult.** 1993. Lack of pathotype specific gene in human *Coxiella burnetii* isolates. *Microbial Pathogenesis* **15**: 177-185.
160. **Stoker, M. G. P., Z. Page, and B. P. Marmion.** 1955. Problems in the diagnosis of Q fever by complement fixation tests. *Bull. WHO.* **13**: 807.
161. **Stocker, M. G., and P. Fiset.** 1956. Phase variation of the nine mile and other strains of *Coxiella burnetii*. *Can. J. Microbiol.* **2**: 310-321.
162. **Streedharan, S., I. R. Peterson, and L. M. Fisher.** 1990. DNA gyrase *gyrA* mutations in

- ciprofloxacin resistant strains of *Staphylococcus aureus*: close similarity with quinolone resistance mutations in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **172**:7260-7262.
163. **Subramanya, N. I., J. S. Wright, and M. A. R. Khan.** 1982. Failure of rifampicin and cotrimoxazole in Q fever endocarditis. Br. Med. J. Clin. **203**: 342.
164. **Syrucek, L., O. Sobeslavsky, and I. Gutvirth.** 1958. Isolation of *Coxiella* from human placentas. J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol. **2**: 29.
165. **Thiele, D, H. Willems.** 1994. Is plasmid based differentiation of *Coxiella burnetii* in 'acute' and 'chronic' isolates still valid? Eur. J. Epidemiol. **10**:427-434.
166. **Thompson, H. A.** 1988. Relationship of the physiology and composition of *Coxiella burnetii* to the *Coxiella*-Host cell interaction. Biology of Rickettsial diseases volume II, chapter 4. CRC Press, Inc. 51-74.
167. **Torres, H., and D. Raoult.** 1993. In vitro activities of ceftriaxone and fusidic acid against 13 isolates of *Coxiella burnetii*, determined using the shell vial assay. Antimicrob. Agents Chemother. **37(3)**:491-494.
168. **Tselentis, Y., A. Gikas, D. Kodteridis, E. Kyriakakis, N. Lydataki, D. Bouros, and N. Tsaparas.** 1995. Q Fever in the Greek Island of Crete: Epidemiologic, Clinical, and Therapeutic Data from 98 Cases. Clinical Infectious Diseases. **20**:1311-1316.
169. **Tselentis, Y., A. Psaroulaki, J. Maniatis, I. Spyridaki, and T. Babalis.** 1996. Genotypic identification of murine typhus *Rickettsia* in rats and their fleas in an endemic area of Greece by the polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism. Am. J. Trop. Med. Hyg. **54(4)**: 413-417.
170. **Tulkens P. M.** 1991. Intracellular distribution and activity of antibiotics. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. **10(2)**: 100-106.

171. **Tunstall, P.** 1970. Apparent recurrence of Q fever endocarditis following homograft replacement of aortic valve. *Br. Heart J.* **23**: 568-570.
172. **Turck, W. P., G. Howitt, L. A. Turnberg, H. Fox, M. Longson, M. B. Matthews, and R. Das Gupta.** 1976. Chronic Q fever. *Q. J. Med.* **45**:193-217.
173. **Yeaman, M. R., L. A. Mitscher, and O. G. Baca.** 1987. In Vitro Susceptibility of *Coxiella burnetii* to Antibiotics, Including Several Quinolones. *Antimicrob. Agents Chemother.* **31(7)**:1079-1084.
174. **Yeaman, M. R., M. J. Roman, and O. G. Baca.** 1989. Antibiotic Susceptibilities of Two *Coxiella burnetii* Isolates Implicated in Distinct Clinical Syndromes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **33(7)**:1052-1057.
175. **Yeaman, M. R., and O. G. Baca.** 1990. Unexpected antibiotic susceptibility of a chronic isolate of *Coxiella burnetii*. *Annals N. Y. Academy of Sciences.* 297-305.
176. **Yeaman, M. R., and O. G. Baca.** 1991. Mechanisms That May Account for Differential Antibiotic Susceptibilities among *Coxiella burnetii* Isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* **35(5)**:948-954.
177. **Valkova, D., and J. Kazar.** 1995. A new plasmid (QpDV) common to *Coxiella burnetii* isolates associated with acute and chronic Q fever. *FEMS Microbiol. Letters.* **125**: 275-280.
178. **Van den Broek, P. J.** Antimicrobial Drugs, Microorganisms, and Phagocytes. *Infect. Dis.* **11(2)**: 213-245.
179. **Varma, M. P., A. A. Adgey, and J. H. Connolly.** 1980. Chronic Q fever endocarditis. *Br. Heart J.* **43**:695-699.
180. **Vavrekova, M., J. Urvolgyi, J. Rehacek, E. Kocianova, and Z. Sekeyova.** 1990. Comparison of proteins and lopolysaccharides profiles of *Coxiella burnetii* isolates from ticks collected in slovakia. *Infect. Dis.* **3**: 257.

181. **Vellend H., I. E. Salit, and L. Spence.** 1982. Q fever-Ontario. *Can Dis Wkly Rep* **8**: 171.
182. **Vodkin, M. H., Williams, J. C., and Stephenson, E. H.** 1986. Genetic heterogeneity among isolates of *Coxiella burnetii*. *J. Gen. Microbiol.* **132**: 455.
183. **Walker, D. H., and M. G. Peacock.** 1988. Laboratory diagnosis of Rickettsial diseases. *Biology of Rickettsial diseases volume II*, chapter 9. CRC Press, Inc.136-149.
184. **Walsh, M., Kappus, E. W., and Quinn, J. C.** 1987. In vitro evaluation of CP-62,993, erythromycin, clindamycin and tetracycline against *Clamidia trachomatis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **31**: 811.
185. **Webb, L., M. Carl, D. C. Malloy, G. A. Dasch, and A. F. Azad.** 1990. Detection of murine typhus infection in fleas by using the polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* **28(3)**: 530-534.
186. **Weiss, E.** 1986. History of rickettsiology. In: Walker DH. ed. *Biology of rickettsial diseases*. Vol. I. Boca Raton, Florida: CRC Press. 15-32.
187. **Wells, H. H., E. H. Lennette, F. R. Abinanti, J. F. Winn, and W. Kaplan.** 1959. Q fever studies. The recovery of *Coxiella burnetii* from the soil and surface water of premises harboring infected sheep. *Am. J. Hyg.* **70**: 14.
188. **Wiebe, M. E., P. R. Burton, and D. M. Shankel.** 1972. Isolation and characterization of 2 cell types of *Coxiella burnetii* phase I. *J. Bacteriol.* **110**: 368.
189. **Williams, J. C., T. A. Hoover, D. M. Waag, N. Banerjee-Bhatnagar, C. R. Bolt, and G. H. Scott.** 1990. Antigenic structure of *Coxiella burnetii*. A comparison of lipopolysaccharide and protein antigens as vaccines against Q fever. *Annals N. Y. Academy of Sciences.* 370-379.
190. **Willems T., H. Krauss.** 1993. Plasmid based differentiation and detection of *Coxiella burnetii* in clinical samples. *Eur J Epidemiol* **9(4)**:411- 418.

191. **Wilson, H. G., G. H. Neilson, E. G. Galea, G. Stafford, and M. F. O'Brien.** 1976. Q fever endocarditis in Queensland. *Circulation* **53**: 680-684.
192. **Wisseman, C. L., A. D. Waddell, and W. T. Walsh.** 1974. In vitro studies of the action of antibiotics on *Rickettsia prowazeki* by two basic methods of cell culture. *J. Infect. Dis.* **130**: 564.
193. **Wolfson, J. S. and Hooper, D. C.** 1985. The fluoroquinolones: structure, mechanisms of action and resistance, and spectra of activity in vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.* **28**: 581.
194. **Zeller, V., C. Janoir, M. D. Kitzis, L. Gutmann, and N. J. Moreau.** 1997. Active efflux as a mechanism of resistance to ciprofloxacin in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41(9)**: 1973-1978.
195. **Zhang, G. Q., A. Hotta, M. Mizutani, T. Ho, T. Yamaguchi, H. Fukushi, and K. Hirai.** 1998. Direct identification of *Coxiella burnetii* plasmids in human sera by nested PCR. *J. Clin. Microbiol.* **36(8)**: 2210-2213.