

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ
ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΒΑΚΤΗΡΙΟΛΟΓΙΑΣ ΠΑΡΑΣΙΤΟΛΟΓΙΑΣ ΖΩΟΝΟΣΩΝ
ΚΑΙ ΓΕΩΓΡΑΦΙΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ ΤΩΝ ΜΠΑΡΤΟΝΕΛΛΩΝ
ΣΤΙΣ ΚΙΝΟΛΟΝΕΣ

ΑΓΓΕΛΑΚΗΣ ΕΜΜΑΝΟΥΗΛ
Διδακτορική διατριβή
ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2008

37

38

39

40

41 **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

42

43 **ΤΣΕΛΕΝΤΗΣ Ι.** Ομ. καθηγητής

44 **ΓΚΙΚΑΣ Α.** Αναπλ. καθηγητής

45 **ΑΝΤΩΝΙΟΥ Μ.** Επίκ. καθηγήτρια

46

47 **ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

48

49 **ΤΣΕΛΕΝΤΗΣ Ι.** Ομ. καθηγητής

50 **ΚΑΛΜΑΝΤΗ Μ.** Καθηγήτρια

51 **ΣΑΜΩΝΗΣ Γ.** Καθηγητής

52 **ΓΚΙΚΑΣ Α.** Αναπλ. καθηγητής

53 **ΑΝΤΩΝΙΟΥ Μ.** Επίκ. καθηγήτρια

54 **ΣΚΟΥΛΙΚΑ Ε.** Επίκ. καθηγήτρια

55 **ΨΑΡΟΥΛΑΚΗ Α.** Λέκτορας

56

57

58

59

60

61

62

63

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

64

65

66

ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΤΑΥΤΟΤΗΤΑΣ

68

69 ΟΝΟΜΑ

: Μανόλης

70 ΕΠΩΝΥΜΟ

: Αγγελάκης

71 ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΓΕΝΝΗΣΗΣ

: 13 Αυγούστου 1981

72 ΤΟΠΟΣ ΓΕΝΝΗΣΗΣ

: Ηράκλειο Κρήτης

73

74

75

ΣΠΟΥΔΕΣ

77

78 1999 : Αποφοίτηση από το Παγκρήτιο Εκπαιδευτήριο Ηρακλείου (βαθμός 19,4)

79 1999 : Εισαγωγή στο Τμήμα Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου
80 Κρήτης μετά από πανελλήνιες εξετάσεις (υποτροφία από το ΙΚΥ)

81

82 2005 Αποφοίτηση από το Τμήμα Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας του
83 Πανεπιστημίου Κρήτης (Βαθμός 7,3)

84

85 2007-2008

86 Master pathologie humaine στο πανεπιστήμιο “Université de la Méditerranée Aix –
87 Marseille II“ με ειδίκευση “Maladies Tropicales et Pathologies Infectieuses“.

88

89 2005-2008

90 ΕΚΠΟΝΗΣΗ ΔΔ στο Τμήμα Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου
91 Κρήτης σε συνεργασία με το Université de la Méditerranée Aix – Marseille II“

92

93 2008- σήμερα

94 ΕΚΠΟΝΗΣΗ ΕΚΠΟΝΗΣΗ ΔΔ στο Université de la Méditerranée Aix – Marseille II, με
95 θέμα « Προβιοτικά» (σε εξέλιξη)

96

97

ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΑΠΑΣΧΟΛΗΣΗ

99

100 2005-2006

101 Εργαστήριο Βακτηριολογίας-Παρασιτολογίας Ζωονόσων και Γεωγραφικής Ιατρικής του
102 Ιατρικού Τμήματος του Πανεπιστημίου Κρήτης

103 2006- σήμερα
104 Ειδικευόμενος ιατρός στο νοσοκομείο “Ia Timone“ στην Μασσαλία.

105
106

107 **ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΕΣ ΕΡΓΑΣΙΕΣ**

- 108 1. Angelakis E, Biswas S, Taylor C, Raoult D, Rolain JM: Heterogeneity of
109 susceptibility to fluoroquinolones in *Bartonella* isolates from Australia reveals a
110 natural mutation in *gyrA*. J Antimicrob Chemother 61:1252-1255 (2008)
- 111 2. Angelakis E, *et al.*: Human case of *Bartonella alsatica* lymphadenitis. Emerg
112 Infect Dis. 2008 Dec; 14(12):1951-3
- 113 3. Angelakis E, *et al.*: *Sphingomonas mucosissima* bacteremia in a patient with
114 Sick Cell Disease. Emerg Infect Dis. Accepted.
- 115 4. Angelakis E. *et al.* *Atopobium rimae* bacteremia in human. Emerg Infect Dis.
116 Accepted.
- 117 5. Angelakis E. *et al.* Molecular detection of *Bartonella* species in rodents from the
118 Lao PDR. Clin Microb Infect Diseases. Accepted.
- 119 6. Angelakis E., Raoult D. *et al.* Bartonellas. In Oxford University Press. Accepted.
- 120 7. Angelakis E and Raoult D. Epidemic and Murine Typhus. In Oxford University
121 Press. Accepted.
- 122 8. Angelakis E and Raoult D. Flea borne rickettsial diseases. In Oxford University
123 Press. Accepted.
- 124 9. Angelakis E and Raoult D. Scrub typhus. In Oxford University Press. Accepted.
- 125 10. Angelakis E and Raoult D. Tick borne Rickettsial diseases. In Oxford University
126 Press. Accepted.
- 127 11. Kelly P., Angelakis E. and Raoult D. Rickettsia and Rickettsia-like Organisms. In
128 Clinical Infectious Diseases. Accepted.
- 129 12. Angelakis E. and Raoult D. Q Fever. In Veterinary Microbiology intend.
130 Accepted.
- 131 13. Angelakis E. Is there tick-borne Bartonellosis? Emerg Infect Dis. In press.

132
133

133 **ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΑ ΣΥΝΕΔΡΙΑ**

- 134 1. Ερευνητικό πόστερ με θέμα “Identification of *Bartonella* sp. in Laos” στο 5^ο
135 Παγκόσμιο συνέδριο “*Rickettsiae* and *Rickettsial Diseases*”, Marseille, France
136 2008.
- 137 2. Ερευνητικό πόστερ με θέμα “ Strategy for the molecular detection of *B. Henselae*
138 in lymph nodes from patients with CSD by the use of quantitative real time PCR”
139 στο 5^ο Παγκόσμιο συνέδριο “*Rickettsiae* and *Rickettsial Diseases*”, Marseille,
140 France 2008

141

142

143

144

145

146 **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

147

148 Η μελέτη αυτή εκπονήθηκε στη Μονάδα Ρικετσιασικών Νοσημάτων του
149 Εργαστηρίου Βακτηριολογίας-Παρασιτολογίας Ζωονόσων και Γεωγραφικής Ιατρικής
150 του Ιατρικού Τμήματος του Πανεπιστημίου Κρήτης (WHO C.C), σε συνεργασία με τη
151 Μονάδα Ρικετσιών “Unité des Rickettsies” του Πανεπιστημίου “Université de la
152 Méditerranée” της Μασσαλίας, υπό την καθοδήγηση των καθηγητών κ. Τσελέντη
153 Ιωάννη και Didier Raoult.

154 Θα επιθυμούσα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου σε όσους συνέβαλαν στην εκπόνηση της
155 διατριβής.

156 Αρχικά, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον Καθηγητή κ. Ιωάννη
157 Τσελέντη, για την ερευνητική και επιστημονική καθοδήγησή του, τη συνεχή
158 παρακολούθηση και επίβλεψη της προσπάθειάς μου, τις πολύτιμες συμβουλές του και το
159 ενδιαφέρον του, την αμέριστη υποστήριξη, και την πολύπλευρη βοήθεια του. Είμαι
160 βαθύτατα ευγνώμων για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε.

161 Πολλές ευχαριστίες οφείλω επίσης στον Καθηγητή κ. Didier Raoult, για την
162 ερευνητική και επιστημονική καθοδήγησή του, και για τη δυνατότητα και τα μέσα που
163 μου παρείχε για να εκπονήσω την παρούσα εργασία.

164 Ευχαριστώ τα μέλη της 3μελούς επιτροπής, τον αναπληρωτή καθηγητή κ Γκίκα
165 Αχιλλέα, και την επίκουρη καθηγήτρια κ. Αντωνίου Μαρία, καθώς και τα μέλη της
166 7μελούς επιτροπής, τον καθηγητή κ. Σαμώνη Γεώργιο, την καθηγήτρια κ. Καλμαντή
167 Μαρία, την επίκουρη καθηγήτρια Σκούλικα Έφη και τη λέκτορα Ψαρουλάκη Άννα.

168 Ιδιαίτερα θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στη Λέκτορα της Ιατρικής

169 Σχολής κ. Ψαρουλάκη Άννα, για την καθοριστική συμβολή της στο σχεδιασμό, την
170 οργάνωση, και επίβλεψη της μελέτης, καθώς και για την ουσιαστική υποστήριξη και την
171 ανεκτίμητη βοήθεια που μου παρείχε κατά την εκπόνηση της διατριβής.

172

173 Θερμότατα ευχαριστώ τους μεταπτυχιακούς του Εργαστηρίου Κλινικής
174 Βακτηριολογίας, Παρασιτολογίας, Ζωονόσων και Γεωγραφικής Ιατρικής, Χοχλάκη
175 Δημοσθένη, Βρανάκη Σήφη, Σανδαλάκη Βασίλη για την πολύτιμη βοήθεια και
176 υποστήριξη τους στο εργαστηριακό μέρος της μελέτης ιδιαίτερα στην ανάπτυξη και
177 εφαρμογή των μοριακών τεχνικών, καθώς και για τη σημαντική προσφορά τους, τα
178 πολύτιμα σχόλια και τις χρήσιμες συμβουλές τους στη διόρθωση των δοκιμίων.

179 Τέλος πρέπει να ευχαριστήσω την οικογένεια μου για την αμέριστη συμπαράσταση και
180 την κατανόηση που έδειξαν καθ' όλη τη διάρκεια αυτής της μελέτης.

181

182

183

184

185

186

187

188

189

190

191

192 **ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ**

193 **A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

194 **1. ΜΠΑΡΤΟΝΕΛΛΕΣ-ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

195 **1.1. ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ**

196 **1.2 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ**

197 **1.3 ΒΑΚΤΗΡΙΟΛΟΓΙΑ**

198 **1.4 ΓΟΝΙΔΙΩΜΑ**

199 **1.5 ΦΥΛΟΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗ**

200 **1.6 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ**

201 **1.7 ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΚΔΗΛΩΣΕΙΣ ΤΩΝ ΜΠΑΡΤΟΝΕΛΛΩΣΕΩΝ**

202 1.7.1 Carrion's disease

203 1.7.2 Πυρετός των χαρακωμάτων

204 1.7.3 Ενδοκαρδίτιδα

205 1.7.4 Νόσος εξ' ονύχων γαλής

206 1.7.6 Βακτηριακή αγγειομάτωση

207 1.7.7 Βακτηριακή Περίωση

208 **1.8 ΔΙΑΓΝΩΣΗ**

209 1.8.1 Δείγματα

210 1.8.2 Άμεση Διάγνωση

211 1.8.2.1 Καλλιέργεια

212 1.8.2.2 Ανοσοδιάγνωση

213 1.8.2.3 Μοριακή βιολογία

214 1.8.3 Έμμεση διάγνωση

215	1.9 ΘΕΡΑΠΕΙΑ
216	1.9.1 In vitro ευαισθησία στα αντιβιοτικά
217	1.9.2 In vivo
218	1.9.2.1 Πυρετός των χαρακωμάτων
219	1.9.2.2 ΝΕΟΓ
220	1.9.2.3 Ενδοκαρδίτιδα
221	1.9.2.4 Βακτηριακή αγγειομάτωση και Ηπατική πελίωση
222	1.10. ΚΙΝΟΛΟΝΕΣ
223	B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ
224	2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ
225	2.1 ΣΤΟΧΟΙ
226	2.2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ
227	2.2.1 ΠΡΩΤΗ ΥΠΟΜΕΛΕΤΗ
228	A) Μελέτη της ευαισθησίας στελεχών Μπαρτονέλλας
229	2.2.1.1 Στελέχη
230	2.2.1.2 Αντιβιοτικά
231	2.2.1.3 Καλλιέργεια-προσδιορισμός της ευαισθησίας
232	B) Διερεύνηση της αιτίας που οδηγεί σε ποικιλόμορφη συμπεριφορά των
233	μπαρτονελλών στις κινολόνες
234	i) Προσδιορισμός της γονιδιακής αλληλουχίας της QRDR της γυράσης
235	2.2.1.4 Εξαγωγή του DNA
236	2.2.1.5 PCR –sequencing
237	2.2.1.6 Στατιστική ανάλυση
238	ii) Δημιουργία ανθεκτικών στελεχών
239	2.2.1.7 Στελέχη

240	2.2.1.8 Καλλιέργεια-δημιουργία ανθεκτικών στελεχών
241	2.2.1.9 Προσδιορισμός της ευαισθησίας
242	2.2.1.10 Εξαγωγή του DNA
243	2.2.1.11 DNA amplification και sequencing
244	2.2.2 ΔΕΥΤΕΡΗ ΥΠΟΜΕΛΕΤΗ
245	2.2.2.1 Δειγματοληψία
246	2.2.2.2 Εξαγωγή του DNA
247	2.2.2.3 Εφαρμογή της Real-time (RT) quantitative PCR
248	2.2.2.4 DNA amplification και sequencing
249	3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ
250	3.1 ΠΡΩΤΗ ΥΠΟΜΕΛΕΤΗ
251	A) Μελέτη της ευαισθησίας
252	3.1.1 Στελέχη μπαρτονέλλας
253	3.1.2 MICs
254	B) Διερεύνηση της αιτίας που οδηγεί σε ποικιλόμορφη συμπεριφορά των
255	Μπαρτονελλών στις κινολόνες
256	3.1.3 Προσδιορισμός της γονιδιακής αλληλουχίας της QRDR της γυράσης
257	3.1.4 Ανθεκτικά στις κινολόνες στελέχη Μπαρτονέλλας
258	3.2 ΔΕΥΤΕΡΗ ΥΠΟΜΕΛΕΤΗ
259	3.2.1 Ανίχνευση και ταυτοποίηση Bartonella sp σε φυσικούς ξενιστές.
260	4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ
261	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ
262	
263	
264	

265

266

267

268

269

270

271

272

273

A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

274

275

276

277

278

279

280

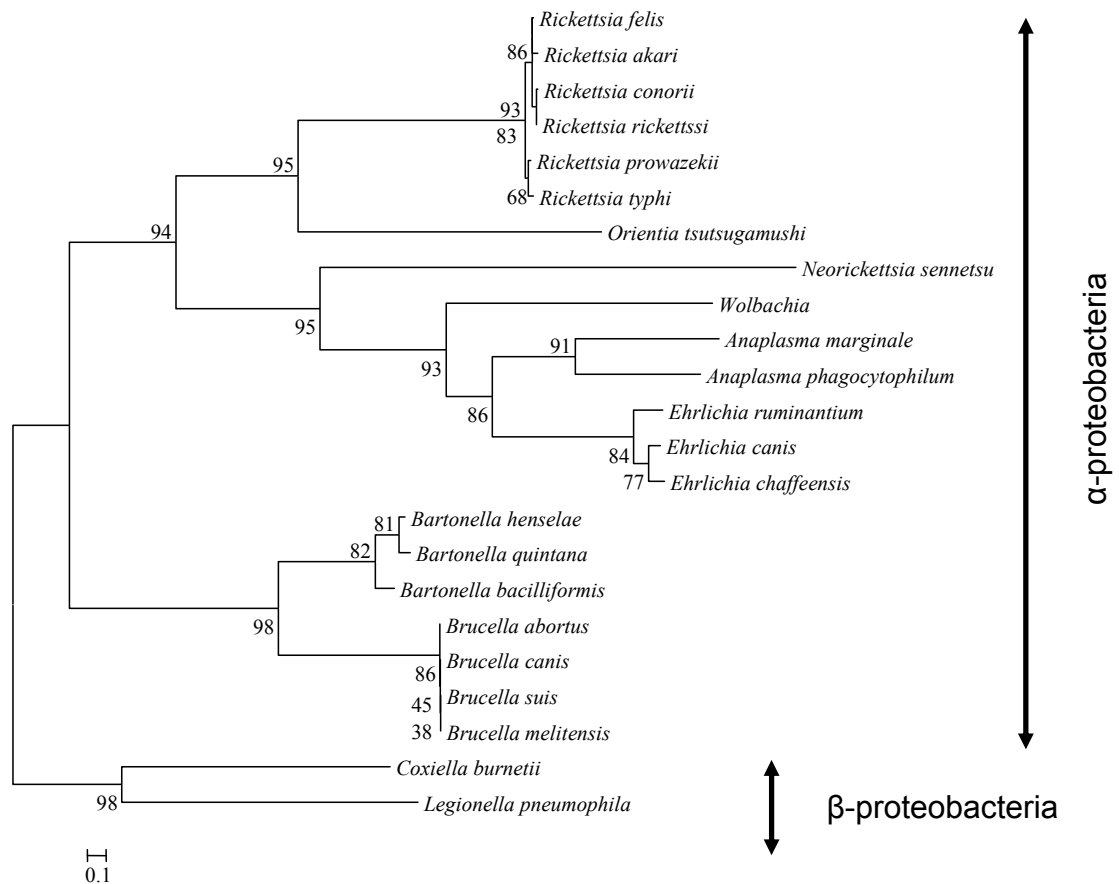
281

282 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

283 Οι μπαρτονέλλες (*Bartonella* sp.) είναι gram αρνητικοί βάκιλλοι ή κοκκοβάκιλλοι που
284 κατατάσσονται στα α2-Προτεοβακτήρια και συγγενεύουν με τα βακτήρια του γένους
285 *Brucella* και *Agrobacterium* (Rolain *et al.*, 2004) (Εικόνα 1). Μετά το 1992
286 τροποποιήθηκε η φυλογενετική τους κατάταξη και τα γένη *Rochalimaea* και *Grahamella*
287 μεταφέρθηκαν στην οικογένεια *Bartonellaceae*. Την τελευταία δεκαετία το ενδιαφέρον
288 για τις μπαρτονέλλες αυξήθηκε. Για την αύξηση του ενδιαφέροντος συνετέλεσαν η
289 βελτίωση των τεχνικών διάγνωσης με την ανάπτυξη της μοριακής τεχνολογίας τα
290 τελευταία χρόνια και κυρίως της μεθόδου της PCR, σε συνδυασμό με την αυξανόμενη
291 επαφή των ανθρώπων με ζώα κατά την διάρκεια υπαίθριων δραστηριοτήτων. Σαν
292 αποτέλεσμα του αυξανόμενου ενδιαφέροντος και έρευνας, ο αριθμός των μπαρτονελλών
293 έχει αυξηθεί κατά πολύ τα τελευταία χρόνια με αποτέλεσμα σήμερα η οικογένεια
294 *Bartonellaceae* να αποτελείται από 22 είδη και 3 υποείδη. Από αυτές τις 22
295 μπαρτονέλλες, οι 11 συσχετίζονται με ένα συνεχώς αυξανόμενο αριθμό ασθενειών στον
296 άνθρωπο. Σε αυτές τις ασθένειες συμπεριλαμβάνονται: η Νόσο εξ'ονόχων γαλής (NEOG)
297 (*B. henselae*), η βακτηριακή αγγειομάτωση και η ηπατική πελίωση (*B. henselae*,
298 *Bartonella quintana*), η βακτηριακία-ενδοκαρδίτιδα (*B. henselae*, *B. quintana*,
299 *Bartonella vinsonii* subsp. *arupensis*, *Bartonella alsatica* και *Bartonella rochalimae*), η
300 Carrions disease (*Bartonella bacilliformis*), ο πυρετός των χαρακωμάτων (*B. quintana*), η
301 μυοκαρδίτιδα (*Bartonella washoensis*) και η σπληνομεγαλία (*B. rochalimae*) (Rolain *et*
302 *al.*, 2004).

303

304



305
306

307 **Εικόνα 1.**

308 Φυλογενετικό δέντρο στο οποίο απεικονίζονται οι φυλογενετικές ομοιότητες ανάμεσα
309 στα άλφα και βήτα Πρωτεοβακτήρια, με βάση τις αλληλουχίες του *groB* γονιδίου
310 (Πηγή: Angelakis et al., 2008c).

311

312 **1.1 ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ**

313 Ο πυρετός των χαρακωμάτων ή πυρετός των 5 ημερών (Trench fever) ήταν η πρώτη
314 ασθένεια που βρέθηκε ότι προκαλείται λόγω της λοίμωξης με μπαρτονέλλα. Το όνομα
315 «πυρετός των χαρακωμάτων» δόθηκε κατά τον Α' Παγκόσμιο Πόλεμο καθώς η ασθένεια
316 ταλαιπωρούσε τα στρατεύματα τόσο των Συμμάχων όσο και των Γερμανών. Εκείνη την

317 εποχή η ασθένεια χαρακτηριζόταν από πυρετό που διαρκούσε 5 μέρες σε συνδυασμό με
318 έντονο πόνο στις αρθρώσεις. Αν και σπάνια αναφέρονταν θάνατοι λόγω της ασθένειας,
319 τα έντονα συμπτώματα της, είχαν ως αποτέλεσμα ένας μεγάλος αριθμός στρατιωτών να
320 μην είναι σε θέση να πολεμήσει. Η ασθένεια υπολογίζεται ότι κατά την διάρκεια των δυο
321 Παγκοσμίων Πολέμων επηρέασε περισσότερα από 1,000,000 άτομα (Hurst, 1942). Η
322 ασθένεια ενδεχομένως να ήταν γνωστή ήδη από τον Μεσαίωνα (Kostrzewski, 1949) και
323 μέχρι τον 20^ο αιώνα υπάρχουν αναφορές για ασθένειες με παρόμοια συμπτώματα στην
324 Βόρεια Ιρλανδία (Logan, 1989) και στην Ρωσία (Swift, 1920) τον 19^ο αιώνα. Παρόλα
325 αυτά, η επιδημία που ξέσπασε κατά την διάρκεια του Α' Παγκοσμίου Πολέμου οδήγησε
326 στο να αναθεωρηθούν οι απόψεις για τη σοβαρότητα της νόσου. Αμέσως μετά το τέλος
327 του πολέμου μειώθηκαν δραματικά οι περιπτώσεις πυρετού των χαρακωμάτων με
328 αποτέλεσμα το ενδιαφέρον για την ασθένεια να εξασθενήσει. Κατά τη διάρκεια του Β'
329 Παγκοσμίου Πολέμου, όταν η νόσος επανεμφανίστηκε, η πρόοδος της ιατρικής τότε
330 βοήθησε ώστε να γίνουν αναλυτικές επιδημιολογικές έρευνες, κυρίως μεταξύ των
331 Γερμανικών στρατευμάτων (Kostrzewski, 1949). Τότε διατυπώθηκε η άποψη ότι η νόσος
332 προκαλείται από Ρικέτσιες (Maurin and Raoult, 1996), και ονόμασαν το υπεύθυνο
333 βακτήριο για τον πυρετό των χαρακωμάτων *Rickettsia quintana* (Koehler and Tappero,
334 1993). Το 1961, οι Vinson και Fuller (Vinson and Fuller, 1961) κατάφεραν να
335 καλλιεργήσουν το βακτήριο, το οποίο και κατάταξαν στο γένος *Rochalimaea*, οπότε και
336 ονομάστηκε *Rochalimaea quintana*. Το ενδιαφέρον πάντως από τότε και μέχρι το 1983,
337 άρχισε να εξασθενεί για την *R. quintana* καθώς δεν υπήρχαν πολλές αναφορές για
338 πυρετό των χαρακωμάτων. Το 1983 η εμφάνιση του AIDS πυροδότησε για μια ακόμα

339 φορά το ενδιαφέρον για την *R. quintana*, καθώς προκαλούσε ιδιαίτερα κλινικά
340 συμπτώματα στους ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς (Stoler *et al.*, 1983).

341 Η *B. bacilliformis* ήταν το πρώτο βακτήριο του γένους Μπαρτονέλλα το οποίο
342 αναγνωρίστηκε σαν είδος. Αναφορές για τη νόσο υπάρχουν ήδη από το 1764 όπου
343 αναφέρεται ότι οι σκνίπες προκαλούσαν μια παράξενη ασθένεια με συμπτώματα
344 ανάλογα με αυτά που προκαλεί η *B. bacilliformis* (Bass *et al.*, 1997b). Κατά τα τέλη του
345 19^{ου} και αρχές του 20^{ου} αιώνα η νόσος υπήρξε το επίκεντρο του ενδιαφέροντος για
346 Ευρωπαίους και Αμερικάνους μικροβιολόγους, καθώς το 1871 σε μια επιδημία που
347 ξέσπασε στις Άνδεις, χιλιάδες άτομα μολύνθηκαν και πολλά από αυτά πέθαναν (Ihler,
348 1996). Παρόλα αυτά, μέχρι το 1885 οι γνώσεις για την ασθένεια ήταν περιορισμένες. Το
349 ίδιο έτος (27 Αυγούστου, 1885) ο Ντάνιελ Κάριον, 26χρονος φοιτητής στην Λίμα,
350 αυτομολύνθηκε με αίμα μολυσμένου ασθενούς (RICKETTS, 1949; Bass *et al.*, 1997b).
351 21 μέρες μετά ανάπτυξε ανθεκτικό πυρετό, πόνους και γενικευμένη αρθραλγία και
352 μυαλγία. Παράλληλα εμφάνισε πονοκεφάλους και αμνησία ενώ στις 5 του Οκτώβρη -39
353 μέρες μετά την μόλυνση- κατάληξε. Το 1910 οι Zadasson και Seifert (Bass *et al.*, 1997b)
354 κατάφεραν να μεταδώσουν και κατ' επέκταση να μελετήσουν την ασθένεια σε πιθήκους,
355 ενώ το 1925 έγινε δυνατή η καλλιέργεια του μικροβίου από το αίμα μολυσμένων
356 ασθενών (Noguchi, 1926).

357 Το 1931, ο Debré περιέγραψε για πρώτη φορά ασθενείς στο Παρίσι που έπασχαν από
358 Νόσο Εξ' Ονόχων Γαλής (NEOG) (Carithers, 1970). Παρόλο που η έρευνα για την
359 ασθένεια συνεχίστηκε για πολλά χρόνια, μόνο μετά από περίπου 20 χρόνια (το 1950)
360 βρέθηκε ασθενής με ενεργή NEOG (Debré *et al.*, 1950). Παράλληλα ανεξάρτητα,
361 αμερικάνοι επιστήμονες περιέγραψαν μια ασθένεια ανάλογη της NEOG το 1932, ενώ

362 παρασκεύασαν το 1947 και ένα αντιγόνο από τους λεμφαδένες ασθενών. Το αντιγόνο
363 αυτό κατόπιν το χορηγούσαν υποδερματικά σε άλλους ασθενείς, για να διαπιστώσουν αν
364 έχουν μολυνθεί (Carithers, 1970). Παρόλα αυτά, η πρώτη δημοσίευση για ενεργή ΝΕΟΓ
365 έγινε το 1951 (GREER and KEEFER, 1951).

366

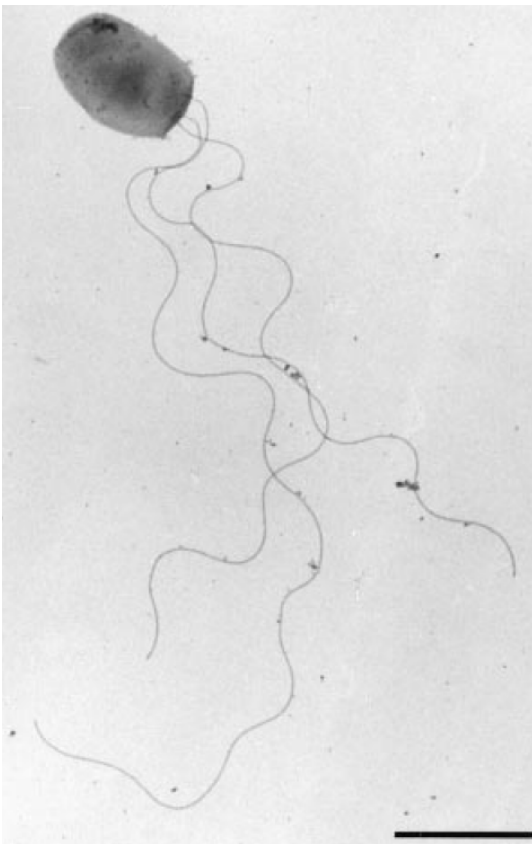
367 1.2 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ

368 Το 1915 το βακτήριο που θεωρήθηκε υπεύθυνο για τον πυρετό των χαρακωμάτων,
369 ονομάστηκε *R. quintana* ή *R. volhynica* (Koehler and Tappero, 1993). Στο ‘Bergey’s
370 Manual of Systematic Bacteriology’ του 1984 οι οικογένειες *Rickettsiaceae*,
371 *Bartonellaceae* και *Anaplasmataceae* κατατάχθηκαν στην τάξη *Rickettsiales* (Weiss and
372 Moulder, 1984). Μέχρι το 1990 το γένος ***Bartonella*** περιλάμβανε μόνο δυο είδη, την ***B.***
373 ***bacilliformis*** και την ***B. quintana***. Το 1993 ο Brenner και οι συνεργάτες του (Brenner *et*
374 *al.*, 1993) πρότειναν την ένωση των ειδών των *Rochalimaea* με τα είδη που
375 κατατάσσονταν στις μπαρτονέλλες, με αποτέλεσμα όλες οι *Rochalimaea* να
376 μετονομαστούν σε *Bartonella*. Αυτή η ανακατάταξη οδήγησε την μεταφορά των
377 μπαρτονελλών από την οικογένεια *Rickettsiaceae* στην οικογένεια *Bartonellaceae*. Το
378 1995, ο Birtles και οι συνεργάτες του (Birtles *et al.*, 1995) πρότειναν την ένωση του
379 γένους *Grahamella* με το γένος *Bartonella*, με αποτέλεσμα την ανακατανομή και
380 μετονομασία σε «*Bartonella*» (Μπαρτονελλες), 5 ακόμα βακτηρίων. Όλες αυτές οι
381 ανακατανομές είχαν ως αποτέλεσμα τα γένη *Rochalimaea* και *Grahamella* να εκλείψουν.

382

383 **1.3 ΒΑΚΤΗΡΙΟΛΟΓΙΑ**

384 Μικροσκοπικά όλες οι Μπαρτονέλλες είναι Gram αρνητικοί βάκιλλοι ή κοκκοβάκιλλοι,
385 0.3 με 0.5 μm πλάτος και 1.0 έως 1.7 μm μήκος. Η *B. Bacilliformis*, η *B. clarridgeiae*
386 και η *B. schoenbuchii* (Εικόνα 2) έχουν μαστίγιο, το οποίο στην περίπτωση της *B.*
387 *bacilliformis* βοηθά στην είσοδο του βακτηρίου στα ερυθροκύτταρα (Dehio *et al.*, 2001).
388 Πολικές δομές που μοιάζουν με φίμπριες έχουν επίσης παρατηρηθεί και στην *B.*
389 *tribocorum*. Οι υπόλοιπες μπαρτονέλλες δεν εμφανίζουν μαστίγια (Breitschwerdt and
390 Kordick, 2000).

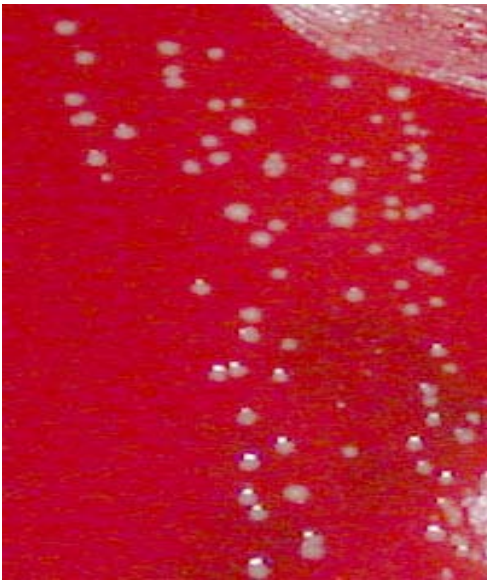


391

392 **Εικόνα 2.** Φωτογραφία από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο της *B. schoenbuchii*. (Πηγή. Dehio
393 *et al.* 2001)

394

395 Οι μπαρτονέλλες μπορούν να αναπτυχθούν σε ελεύθερο μέσο, σε άγαρ εμπλουτισμένο με
396 αίμα και σε ζωμό εμπλουτισμένο με αμινοξέα (Weiss, 1981). Σαν πηγή ενέργειας
397 μπορούν να χρησιμοποιήσουν σουκινικό ή πυροσταφυλικό οξύ, και γλουταμίνη ή
398 γλουταμινικό, αλλά όχι γλυκόζη (Maurin and Raoult, 1996). Η ανάπτυξη των
399 μπαρτονελλών επιταχύνεται σε περιβάλλον CO₂ (Mason, 1970) και παρουσία αιμίνης
400 (Myers *et al.*, 1969; Myers *et al.*, 1972). Όταν αναπτύσσονται σε αιματούχο άγαρ, οι
401 μπαρτονέλλες εμφανίζουν μικρές σε μέγεθος αποικίες, βαθιά προσφύμενες μέσα στο
402 άγαρ (Εικόνα 3). Για την ανάπτυξη της μπαρτονέλλας στην πρωτοκαλλιέργεια σε
403 αιματούχο άγαρ, απαιτείται αρκετό διάστημα το οποίο μπορεί να φτάσει μέχρι και τις 45
404 μέρες (Maurin *et al.*, 1994). Παρόλα αυτά ο χρόνος αυτός μειώνεται σε 3 έως 5 μέρες
405 όταν πρόκειται για ανακαλλιέργεια.



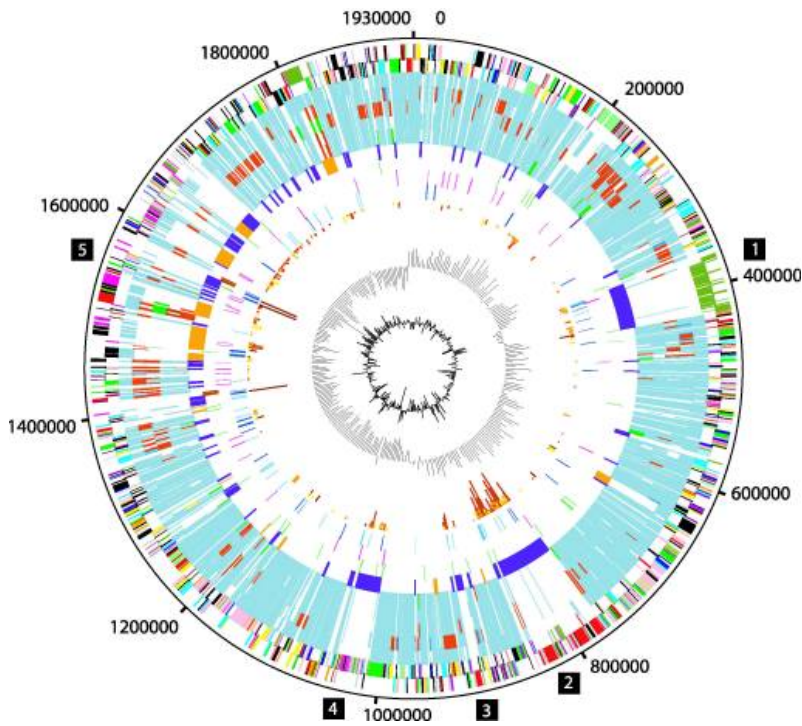
406

407 **Εικόνα 3.** Αποικίες *B. henselae* σε αιματούχο 5% Columbia άγαρ. Πηγή (Angelakis et
408 al., 2008c)

410 Οι μπαρτονέλλες είναι καταλάση, οξειδάση και ουρεάση αρνητικές. Τα μέλη των
411 μπαρτονελλών που στο παρελθόν κατατάσσονταν στο γένος *Grahamella* καθώς και η *B.*
412 *quintana* έχουν θετικό το τεστ Voges-Proskauer. Το βιοχημικό προφίλ των
413 μπαρτονελλών είναι λίγο πολύ το ίδιο, με εξαίρεση την παραγωγή πεπτιδάσης που
414 διαφέρει (Breitschwerdt and Kordick, 2000).

415 **1.4 ΓΟΝΙΔΙΩΜΑ**

416 Η *B. quintana* περιλαμβάνει ένα μοναδικό χρωμόσωμα, το οποίο αποτελείται από
417 1.581.384 βάσεις, ενώ το γονιδίωμα της *B. henselae* είναι μεγαλύτερο και αποτελείται
418 από 1.931.047 βάσεις (Alsmark *et al.*, 2004) (Εικόνα 4). 1,116 πρωτείνες έχει βρεθεί ότι
419 εκφράζονται από τα 1.143 και 1.491 γονίδια που υπάρχουν στην *B. quintana* και στην *B.*
420 *henselae*, αντίστοιχα (Alsmark *et al.*, 2004). Οι υπεύθυνες για την κωδικοποίηση
421 πρωτεϊνών περιοχές υπολογίζεται ότι καταλαμβάνουν το 72.7% και το 72.3% του
422 γονιδιώματος της *B. quintana* και της *B. henselae* αντίστοιχα (Alsmark *et al.*, 2004).



423

424 **Εικόνα 4.**

425 Ο γονιδιακός χάρτης της *B. quintana* και της *B. henselae*. (Πηγή Alsmark et al. 2004).

426

427 1.5 ΦΥΛΟΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗ

428 Οι μπαρτονέλλες δεν παρουσιάζουν ιδιαίτερα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά στα οποία θα

429 μπορούσε να στηριχθεί ο διαχωρισμός τους, με αποτέλεσμα η πιστοποίηση της

430 ταυτότητας τους να βασίζεται κυρίως σε φυλογενετικές διαφορές. Πολλά γονίδια έχουν

431 χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίηση των μπαρτονελλών, συμπεριλαμβανομένων του

432 γονιδίου 16S rDNA, της “16S–23S rRNA intergenic spacer region” (ITS), του γονιδίου

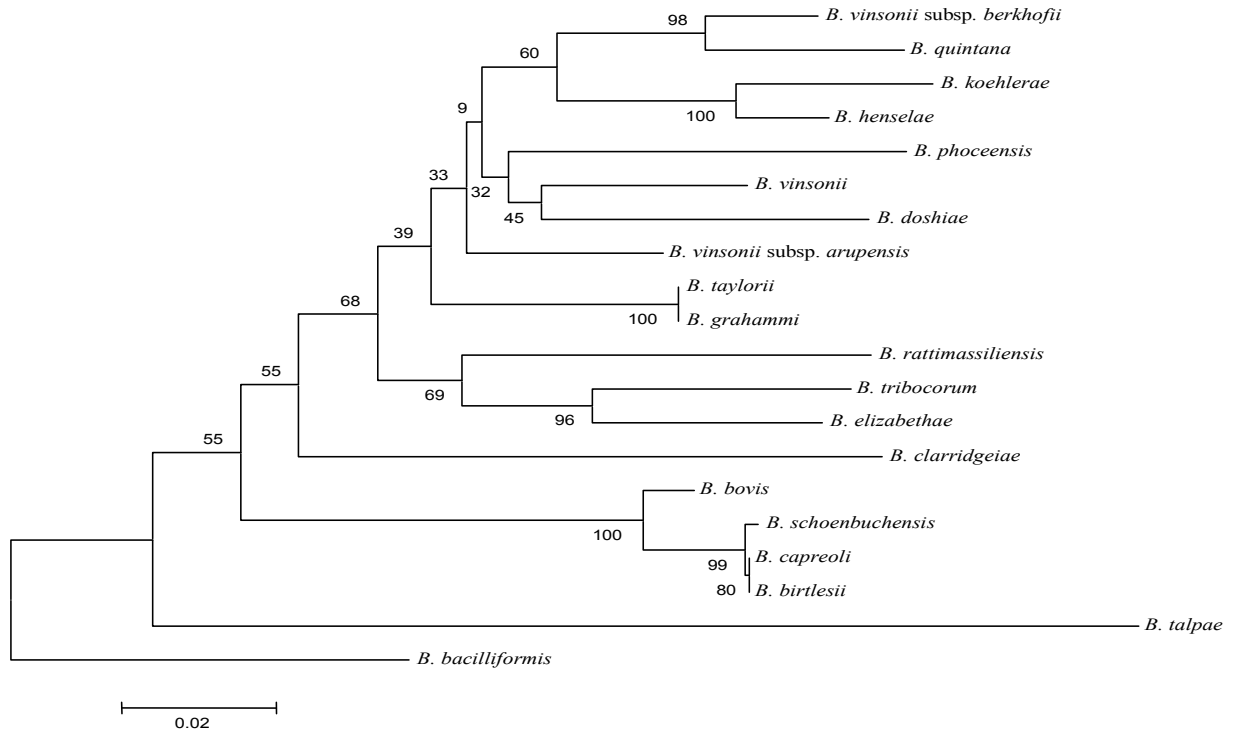
433 της “citrate synthase gene” (*gltA*), της “heat shock protein” (*groEL*), των γονιδίων που

434 κωδικοποιούν τις PAP31 και 35-kDa πρωτείνες και του “cell division protein gene”

435 (*ftsZ*). Το γονίδιο 16S rDNA, με “διαχωριστική δύναμη” (DP) 99.7% και “ελάχιστη

436 ομοιότητα” (MS) 99.7%, είναι το λιγότερο διαχωριστικό γονίδιο για τις μπαρτονέλλες
437 (La Scola *et al.*, 2003). Παρόλα αυτά, παρέχει καλό διαχωρισμό από την *Brucella*
438 *abortus* (με ομοιότητα 94%), η οποία είναι το πιο κοντινό γένος στο γένος *Bartonella*.
439 Τα γονίδια *gltA*, *groEL*, *rpoB* και *ftsZ*, καθώς και το ITS έχουν πολλή καλή
440 “διαχωριστική δύναμη” που κυμαίνεται από 92.6% μέχρι 94.4% (La Scola *et al.*, 2003).
441 Πάντως μια μικρή “διαχωριστική δύναμη” δεν εγγυάται ότι δυο κοντινά είδη
442 μπαρτονέλλας μπορούν να διαχωριστούν, μιας και οι ομοιότητες για τα γονίδια *groEL*,
443 *ftsZ*, *ribC* και ITS, για τις *B. schoenbuchensis*, *B. bovis*, *B. grahamii* και *B. taylorii*
444 κυμαίνονται από 97.9% μέχρι 99.8% (La Scola *et al.*, 2003). Μόνο δυο γονίδια το *rpoB*
445 και το *gltA* έχουν “ελάχιστη ομοιότητα” (<96%) (La Scola *et al.*, 2003). Η “διαχωριστική
446 δύναμη” του γονιδίου *gltA* συσχετίζεται με το μικρό μέγεθος των νουκλεοτιδικών
447 αλληλουχιών (μόνο 327 βάσεις) που υπάρχουν στην Genbank
448 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Όσον αφορά το γονίδιο *rpoB*, η “διαχωριστική δύναμη”
449 του έχει περιγραφεί για διάφορα γένη, συμπεριλαμβανομένων των Σπειροχαιτών,
450 Λεγεωνελλών, Σταφυλοκόκκων, Μυκοβακτηριδίων και Εντεροβακτηριακών (Renesto *et*
451 *al.*, 2000; Renesto *et al.*, 2001; Drancourt and Raoult, 2002). Σαν αποτέλεσμα όλων
452 αυτών ο La Scola πρότεινε ότι για να χαρακτηριστεί μια Μπαρτονέλλα ως νέο είδος θα
453 πρέπει μια γονιδιακή αλληλουχία 327 βάσεων από το γονίδιο *gltA* καθώς και μια
454 γονιδιακή αλληλουχία 825 βάσεων από το γονίδιο *rpoB* να έχουν λιγότερο από 96.0%
455 και 95.4% ομοιότητα από τα υπάρχοντα είδη Μπαρτονέλλας (La Scola *et al.*, 2003).
456 Παρόλα αυτά για το χαρακτηρισμό ενός υποείδους δεν υπάρχει ξεκάθαρη προϋπόθεση
457 μέχρι σήμερα. Ένα φυλογενετικό δέντρο βασισμένο στις αλληλουχίες του *groEL*

458 γονιδίου για τα περισσότερα είδη Μπαρτονέλλας που έχουν ανακαλυφθεί μέχρι σήμερα
459 απεικονίζεται στην εικόνα 5.



460
461

462 **Εικόνα 5.**

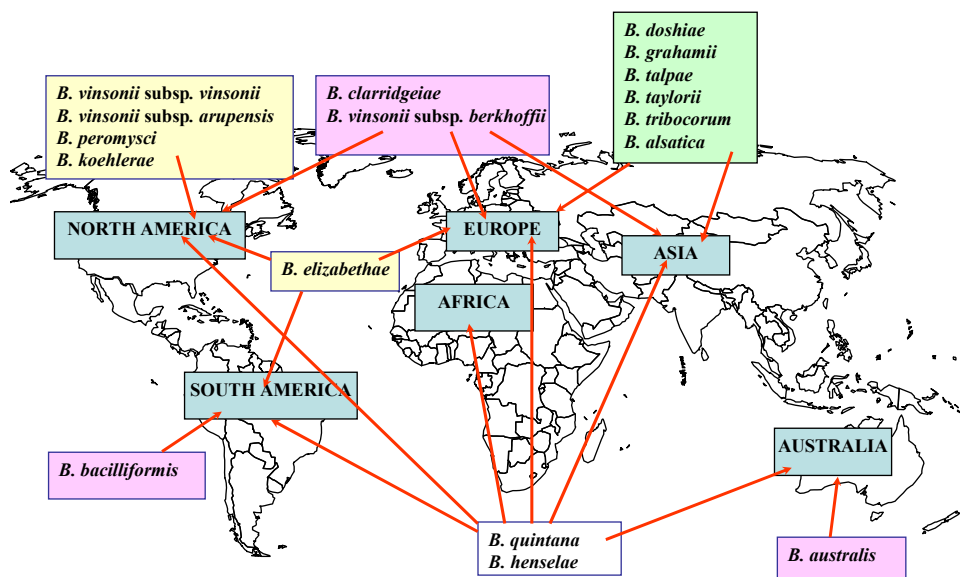
463 Φυλογενετικό δέντρο βασισμένο στις αλληλουχίες του groEL γονιδίου για τα
464 περισσότερα είδη Μπαρτονέλλας που έχουν ανακαλυφθεί μέχρι σήμερα. Πηγή
465 (Angelakis et al., 2008c)

466

467 **1.6 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ**

468 Όπως συμβαίνει και με άλλα μικρόβια- αίτια ζωνόσων που χρησιμοποιούν ένα φυσικό
469 ξενιστή, για τη διατήρηση του κύκλου ζωής τους, έτσι και οι μπαρτονέλλες έχουν ένα
470 φυσικό κύκλο που περιλαμβάνει φυσικούς ξενιστές και υπόδοχα. Στους φυσικούς
471 ξενιστές οι μπαρτονέλλες προκαλούν χρόνια ενδοερυθροκυττάρια βακτηριαμία

472 (Breitschwerdt and Kordick, 2000). Για την μετάδοση, είναι απαραίτητος ένας
473 μεταβιβαστής. Συνήθως όσον αφορά τις μπαρτονέλλες, υπάρχει στενή σχέση ανάμεσα
474 στο είδος της μπαρτονέλλας, τον ξενιστή και τον μεταβιβαστή, σχέση η οποία πολλές
475 φορές περιορίζεται σε συγκεκριμένα γεωγραφικά όρια (Σχήμα 1).



476

477 **Σχήμα 1.** Η γεωγραφική κατανομή των σημαντικότερων ειδών Μπαρτονέλλας.

478

479 Η *B. bacilliformis* ήταν η πρώτη μπαρτονέλλα που αναγνωρίστηκε. Το μικρόβιο έχει
480 περιορισμένη γεωγραφική κατανομή, καθώς οι πιο πολλές περιπτώσεις αναφέρονται σε
481 περιοχές με υψόμετρο 500-3000 μέτρα στις Περουβιανές Άνδεις, ανάμεσα στην
482 νοτιοδυτική Κολομβία και στο κεντρικό Περού (Bass *et al.*, 1997b). Υπεύθυνη για τη
483 μετάδοση της νόσου είναι η σκνίπα *Phlebotomus verrucarum*, η οποία τρέφεται μόνο
484 κατά τις νυχτερινές ώρες. Μέχρι σήμερα δεν έχουν αναφερθεί περιπτώσεις λοίμωξης από
485 *B. bacilliformis* σε άλλα θηλαστικά εκτός από τον άνθρωπο.

486 Η ΝΕΟΓ είναι η πιο διαδεδομένη μπαρτονέλλα παγκοσμίως. Περιστατικά αναφέρονται
487 από όλες τις ηπείρους, περιλαμβανομένων Νότιας και Βόρειας Αμερικής, Ευρώπης,
488 Αφρικής, Ασίας και Αυστραλίας. Ο αιτιολογικός παράγοντας της ΝΕΟΓ είναι κυρίως η
489 *B.henselae*. Ξενιστές του βακτηρίου κατά κύριο λόγο είναι οι γάτες, και η μετάδοση
490 στον άνθρωπο γίνεται είτε κατευθείαν μέσω του δαγκώματος ή του γρατζουνίσματος της
491 γάτας, είτε έμμεσα μέσω των ψύλλων της γάτας *Ctenocephalides felis* (Bass *et al.*,
492 1997a). Με τους ψύλλους της γάτας σχετίζονται επίσης και άλλα είδη μπαρτονελλών
493 συμπεριλαμβανομένων της *B. clarridgeiae*, της *B. koehlerae*, και της *B. quintana*.

494 Η *B. quintana* μεταδίδεται με την ψείρα του ανθρώπινου σώματος *Pediculus humanus*.
495 Επιδημίες πυρετού των χαρακωμάτων αναφέρονται σε καταστάσεις που ευνοούν τον
496 πολλαπλασιασμό της ψείρας του ανθρώπινου σώματος, όπως σε κακές υγειονομικές
497 συνθήκες και συνδέονται με αλκοολικούς και άστεγους (Bass *et al.*, 1997b). Επιδημίες
498 αναφέρονται κατά τη διάρκεια πολέμων, με χαρακτηριστικά παραδείγματα τον Α' και Β'
499 Παγκόσμιο Πόλεμο. Αν και γνωρίζουμε ότι οι υπόλοιπες μπαρτονέλλες μπορούν να
500 προκαλέσουν ασυμπτωματική βακτηριαμία στους φυσικούς ξενιστές τους, όπως π.χ η
501 *B. henselae* και *B. clarridgeiae* σε γάτες, η *B. alsatica* σε κουνέλια, η *B. vinsonii* subsp
502 *berkhoffii* σε κογιότ και σκυλιά και η *B. tribocorum* σε ποντίκια, η επιδημιολογία τους
503 δεν είναι αρκετά γνωστή μέχρι σήμερα (Πίνακας 1).

Bartonella species	Reservoir host	Vector-detection in arthropods	Disease in humans	First cultivation	Detection in erythrocytes
<i>B. bacilliformis</i>	Human	Sand fly (<i>Lutzomia</i> spp.)	CD,END	1919	+
<i>B. talpae</i>	Mole	Unknown	Unknown	1911	
<i>B. peromysci</i>	Unknown	Unknown	Unknown	1942	
<i>B. vinsonii</i> subsp. <i>vinsonii</i>	Rodents	Unknown	Unknown	1946	
<i>B. quintana</i>	Human, cats	Human body lice-fleas	TF, BA, BAC, END	1961	+
<i>B. henselae</i>	Cats, rats, dogs	Ctenocephalides felis	CSD, BA, BAC, LMF, END, PH, RET	1990	+
<i>B. elizabethae</i>	Rodents, dogs	Fleas	END (1 case)	1993	
<i>B. grahamii</i>	Voles, rodents	Fleas?	RET (1 case)	1995	
<i>B. taylorii</i>	Rats	Fleas?	Unknown	1995	
<i>B. doshiae</i>	Voles	Fleas?	Unknown	1995	
<i>B. clarridgeiae</i>	Cats, dogs	Ctenocephalides felis	Unknown	1995	+
<i>B. vinsonii</i> subsp. <i>berkhoffii</i>	Dogs, coyotes	Fleas and ticks	END	1995	
<i>B. vinsonii</i> subsp. <i>arupensis</i>	Rodents, cattle	Deer ticks	BAC (1 case)	1999	
<i>B. tribocorum</i>	Rats	Unknown	Unknown	1998	
<i>B. koehlerae</i>	Cats	Fleas	END(1case)	1999	+
<i>B. alsatica</i>	Rabbit	Fleas or ticks	END(1case)	1999	
<i>B. bovis</i> (<i>weissii</i>)	Cows, cats	Unknown	Unknown	1999	
<i>B. washoensis</i>	Rodents, dogs	Unknown	MYOC (1 case)	2000	
<i>B. birtlesii</i>	Rats	Unknown	Unknown	2000	
<i>B. schoenbuchensis</i>	Wild roe deer	Unknown	Unknown	2001	
<i>B. capreoli</i>	Wild roe deer	Unknown	Unknown	2002	
<i>B. chomeli</i>	Cows	Unknown	Unknown	2004	
<i>B. rattimasilliensis</i>	Rats	Unknown	Unknown	2004	
<i>B. phoceensis</i>	Rats	Unknown	Unknown	2004	

BA, bacillary angiomatosis; BAC, bacteremia; CSD, cat-scratch disease; END, endocarditis; LMF : lymphadenopathy ; MYOC, myocarditis; PH : peliosis hepatitis ; RET, retinitis; TF,trench fever

504

505 Πίνακας 1.

506 Επιδημιολογικά και κλινικά στοιχεία για όλα τα μέχρι σήμερα γνωστά είδη
507 μπαρτονελλών. Πηγή (*Angelakis et al., 2008c*)

508

509 1.7 ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΚΔΗΛΩΣΕΙΣ

510 Χαρακτηριστικό γνώρισμα των μπαρτονελλών είναι η ικανότητα τους να προκαλούν
511 οξείες ή χρόνιες λοιμώξεις που επηρεάζουν το αγγειακό-κυκλοφορικό σύστημα. Τα
512 κλινικά συμπτώματα εξαρτώνται τόσο από το είδος της Μπαρτονέλλας όσο και από την
513 ανοσοεπάρκεια του ασθενή. Πάντως αξίζει να αναφερθεί ότι υπάρχουν λίγες
514 δημοσιευμένες αναφορές λοίμωξης από μπαρτονέλλα, με αποτέλεσμα οι γνώσεις μας για
515 τα κλινικά συμπτώματα που αυτές προκαλούν να είναι περιορισμένος (*Rolain et al.,*

516 2004). Οι πιο συχνές κλινικές εκδηλώσεις που προκαλούν οι μπαρτονέλλες φαίνονται
517 στον Πίνακα 2.

518

Disease in humans	Commonly isolated	Rarely isolated
CSD	<i>B. henselae</i>	<i>B. quintana</i> , <i>B. clarridgeae</i>
END	<i>B. henselae</i> , <i>B. quintana</i>	<i>B. elizabethae</i> , <i>B. koehlerae</i> , <i>B. vinsonii</i> subsp <i>berkhoffii</i> , <i>B. alsatica</i>
RET	<i>B. henselae</i>	<i>B. grahamii</i>
BA	<i>B. henselae</i> , <i>B. quintana</i>	
BAC	<i>B. quintana</i>	<i>B. henselae</i> , <i>B. vinsonii</i> subsp. <i>apurensis</i>
Peliosis hepatitis	<i>B. henselae</i>	
Osteomyelitis	<i>B. henselae</i>	
TF	<i>B. quintana</i>	

BA, bacillary angiomatosis; BAC, bacteremia; CSD, cat-scratch disease; END, endocarditis; RET, retinitis; TF, trench fever;

519 LMF, lymphadenopathy

520 **Πίνακας 2.**

521 Οι πιο συχνές κλινικές εκδηλώσεις των μπαρτονελλώσεων Πηγή (Angelakis et al.,
522 2008c)

523

524 **1.7.1 Carrion's disease**

525 Η νόσος του Carrion's προκαλείται από την *B. bacilliformis* (Bass et al., 1997b). Η
526 ασθένεια ξεκινά όταν οι μολυσμένες σκνίπες *L. verrucarum* μέσω του τσιμπήματος τους,

527 μεταδώσουν την *B. bacilliformis* στον άνθρωπο. Τα βακτήρια αμέσως μετά
528 συγκεντρώνονται στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Η φάση αυτή συνήθως είναι
529 ασυμπτωματική. Ο πυρετός Oroya εμφανίζεται όταν το μικρόβιο εισέλθει στα ερυθρά
530 αιμοσφαίρια και προκαλέσει αιμόλυση λόγω της ερυθρο-φαγοκυττάρωσης που συμβαίνει
531 από τα ιστιοκύτταρα και τα μακροφάγα. Σ' αυτήν την οξεία φάση, η *B. bacilliformis*
532 μπορεί να παρατηρηθεί στα ερυθρά αιμοσφαίρια, καθώς ο παρασιτισμός των ερυθρών
533 από το βακτήριο μπορεί να αγγίξει το 100%. Θάνατος μπορεί να προκύψει λόγω της
534 μόλυνσης των ερυθρών αιμοσφαιρίων καθώς και λόγω ευκαιριακών λοιμώξεων (πιο
535 συχνά σαλμονέλλωση). Η θνησιμότητα χωρίς αντιβιοτική αγωγή μπορεί να φτάσει μέχρι
536 και το 40% (Bass *et al.*, 1997b). Επιδημιολογικές μελέτες στις περιοχές που ενδημεί η *B.*
537 *bacilliformis*, έχουν δείξει ότι ο μισός πληθυσμός που είναι μολυσμένος με το βακτήριο
538 παραμένει ασυμπτωματικός, μιας και η *B. bacilliformis* μπορεί να προκαλέσει
539 ασυμπτωματική βακτηριαιμία, η οποία μπορεί να διαρκέσει μέχρι και 15 μήνες. Οι
540 περισσότεροι ασθενείς είναι παιδιά και νέοι ενήλικες. Στην περίπτωση της verruga
541 peruana, η οποία είναι η χρόνια μορφή της ασθένειας, οι ασθενείς εμφανίζουν δερματικές
542 βλάβες (Jacomio *et al.*, 2002). Τα άτομα που εμφανίζουν την χρόνια μορφή της ασθένειας
543 δρουν και σαν φορείς που μεταδίδουν τη νόσο.

544

545 **1.7.2 Πυρετός των χαρακωμάτων**

546 Ο πυρετός των χαρακωμάτων προκαλείται από την *B. quintana*, η οποία όπως
547 προαναφέρθηκε μεταδίδεται με την ψείρα του ανθρώπινου σώματος *Pediculus humanus*
548 (Εικόνα 6). Η ψείρα, μέσω του δήγματος μεταφέρει το μικρόβιο στον άνθρωπο, ο οποίος
549 πιθανόν να είναι και ο μόνος (τελικός ξενιστής) φυσικός ξενιστής (Brouqui and Raoult,

550 2006a). Η έναρξη της νόσου συνοδεύεται από οξεία κεφαλαλγία και πόνο στις
551 αρθρώσεις. Συνήθως το βακτήριο εισέρχεται στην κυκλοφορία και κατά συνέπεια
552 προκαλεί βακτηριαμία και πυρετό, ο οποίος διαρκεί 5 μέρες. Υπάρχουν αναφορές για
553 περιπτώσεις που η διάρκεια της νόσου ήταν μεγαλύτερη των 5 ημερών, όπως και
554 αναφορές για περιπτώσεις επανεμφάνισης της νόσου μετά από μια λανθάνουσα περίοδο
555 (Brouqui *et al.*, 1999b). Η βακτηριαμία που προκαλεί η *B. quintana* σχετίζεται επίσης με
556 την εκδήλωση ενδοκαρδίτιδας και με βακτηριακή αγγειομάτωση κυρίως σε
557 ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς.



558
559

560 **Εικόνα 6.** Η ψείρα του ανθρώπινου σώματος *Pediculus humanus* και κρότωνες κατά τη
561 διάρκεια γεύματος αίματος σε κουνέλι.

562

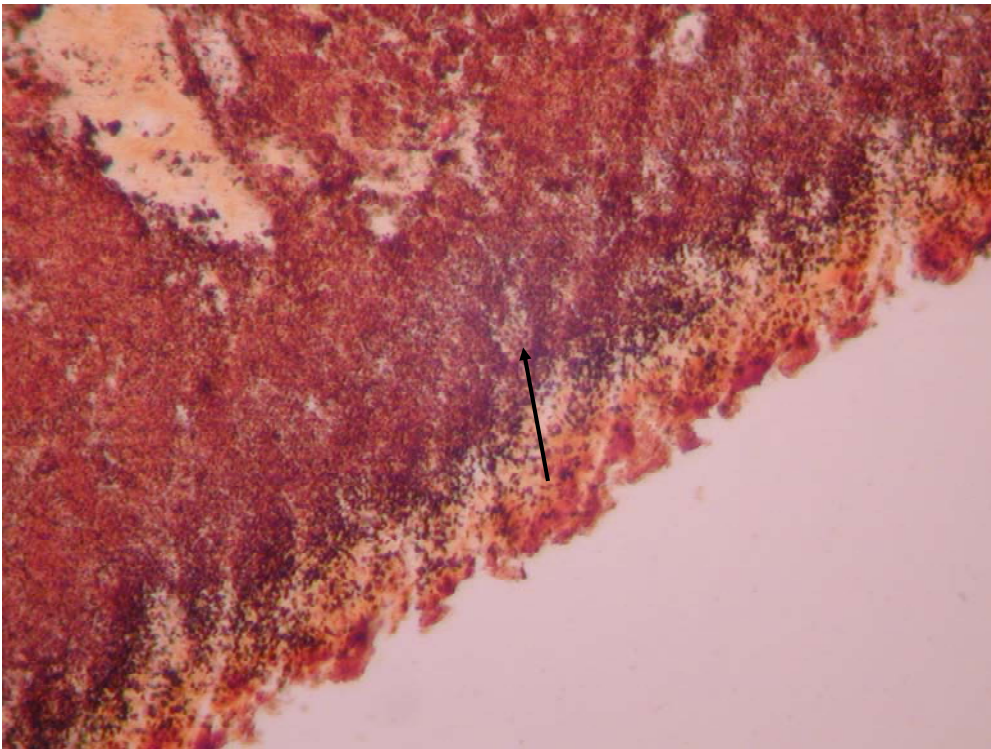
563 Οι περισσότερες αναφορές για τη νόσο καταγράφονται απο τις αρχές του προηγούμενου
564 αιώνα, πριν την εμφάνιση των αντιβιοτικών. Όπως προαναφέρθηκε χιλιάδες στρατιώτες
565 νόσησαν κατά την διάρκεια των δυο παγκοσμίων πολέμων. Το ενδιαφέρον για τον
566 πυρετό των χαρακωμάτων έκτοτε μειώθηκε, μέχρι το 1994, όταν ξέσπασε μια επιδημία
567 βακτηριακών λόγω *B. quintana* στο Σιατλ της Ουάσιγκτον (Sprach *et al.*, 1995). Τα
568 περιστατικά χαρακτηριζόταν από ανθεκτικό πυρετό και παρουσιάζονταν κυρίως σε
569 αλκοολικούς και άστεγους ασθενείς. Έκτοτε, έχουν αναφερθεί και περιπτώσεις
570 ανοσοκατεσταλμένων λόγω HIV ασθενών, οι οποίοι εμφάνισαν ενδοκαρδίτιδα και
571 βακτηριακή αγγειομάτωση (Jacomino *et al.*, 2002). Από επιδημιολογικές έρευνες έχει
572 βρεθεί ότι αντισώματα για την *B. quintana* εμφανίζονται συχνά στους άστεγους
573 πληθυσμούς τόσο της Ευρώπης όσο και της Αμερικής. Σε μια τέτοια έρευνα στην
574 Μασσαλία, το 30% των άστεγων που μελετήθηκαν είχαν αντισώματα για *B. quintana*, το
575 14% είχαν καλλιέργειες θετικές για *B. quintana* και οι μισοί από αυτούς είχαν
576 βακτηριαμία αλλά χωρίς πυρετό (Brouqui *et al.*, 1999a).

577

578 **1.7.3 Ενδοκαρδίτιδα**

579 Η πιθανότητα λοίμωξης από *B. quintana* (Εικόνα 7) πρέπει να λαμβάνεται υπόψιν από
580 τον κλινικό ιατρό σε περιπτώσεις ενδοκαρδίτιδας σε άστεγους και αλκοολικούς ασθενείς
581 με αρνητικές αιμοκαλλιέργειες (Brouqui and Raoult, 2006b). Βακτηριαμία οφειλόμενη
582 στη *B. quintana* έχει επίσης αναφερθεί και σε ασθενείς με ενδοκαρδίτιδα. Αξίζει να
583 αναφερθεί ότι ένα ποσοστό 0,5 μέχρι 12% του συνόλου των περιστατικών

584 ενδοκαρδίτιδας οφείλεται σε μπαρτονέλλες. Από τα περιστατικά ενδοκαρδίτιδας που
585 οφείλονται σε μπαρτονέλλες στην Ευρώπη, το 75% σχετίζεται με *B. quintana* και το 25%
586 με *B. henselae*, ενώ στην Αμερική η *B. quintana* ευθύνεται για την πλειοψηφία των
587 περιστατικών (Brouqui and Raoult, 2006b). Ενδοκαρδίτιδα που οφείλεται σε *B. quintana*
588 απαντάται όπως προαναφέρθηκε κυρίως σε άστεγους και αλκοολικούς ασθενείς, ενώ η
589 ενδοκαρδίτιδα λόγω *B. henselae* απαντάται κυρίως σε ασθενείς που έρχονται σε επαφή
590 με γάτες και έχουν βαλβιδοπάθεια. Ενδοκαρδίτιδα και/ή βακτηριαιμία μπορούν να
591 προκαλέσουν σε σπάνιες περιπτώσεις και άλλες μπαρτονέλλες.



592

593 **Εικόνα 7.** Χρώση Whartin-Starry από βαλβίδα ασθενούς με ενδοκαρδίτιδα που
594 οφείλεται στην *B. quintana*. Το βέλος δείχνει το βακτήριο. Πηγή (Angelakis *et al.*,
595 2008c)

596

597 Μέχρι σήμερα η *B. elizabethae*, η *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii*, η *B. vinsonii* subsp.
598 *vinsonii*, η *B. koehlerae* και η *B. alsatica* έχουν απομονωθεί από ασθενείς που έπασχαν
599 από ενδοκαρδίτιδα (Raoult *et al.*, 2006).

600

601 **1.7.4 Νόσος εξ'ονύχων γαλής (NEOG)**

602 Η NEOG προκαλείται από την *B. henselae*. Οι γάτες είναι ο κύριος ξενιστής της *B.*
603 *henselae* και το βακτήριο μεταδίδεται με τον ψύλλο της γάτας *Ctenocephalides felis*
604 (Bass *et al.*, 1997a). Οι περισσότεροι ασθενείς αναφέρουν στο ιστορικό τους επαφή ή
605 γρατζούνισμα από γάτα. Η NEOG εμφανίζεται συνήθως ως αυτοιάσιμη τοπική
606 λεμφαδενίτιδα. Οι διογκωμένοι λεμφαδένες μπορεί να είναι επώδυνοι, ενώ είναι πιθανόν
607 να υπάρχει ερύθημα στην περιοχή του γρατζουνίσματος (Εικόνα 8). Η λεμφαδενοπάθεια
608 συνήθως εμφανίζεται στους επιχώριους λεμφαδένες στην περιοχή που έγινε το
609 γρατζούνισμα της γάτας. Η ασθένεια είναι αυτοιάσιμη και διαρκεί κατά μέσο όρο 2-3
610 μήνες. Οι περισσότεροι ασθενείς δεν εμφανίζουν πυρετό και γενικά δεν χαρακτηρίζονται
611 ως “άρρωστοι”. Επιπλοκές εμφανίζονται σπάνια, σε ποσοστό 5 -14% των περιπτώσεων
612 και συνήθως περιλαμβάνουν πυρετό (>2 βδομάδες), μυαλγίες, κακουχία, αρθραλγία,
613 απώλεια βάρους, σπληνομεγαλία και σύνδρομο Parinaud’s στους οφθαλμούς (Bass *et al.*,
614 1997a). Πιθανές οφθαλμικές επιπλοκές είναι η επιπεφυκίτιδα, η
615 χοροαμφιβληστροειδίτιδα που εκδηλώνεται με οξεία ελάττωση της όρασης μετά από
616 οίδημα του οπτικού νεύρου και κηλιδώδη εξιδρώματα στο βυθό, η οπτική νευρίτιδα και η
617 οπτική θηλίτιδα. Η πιο συχνή όμως οφθαλμική εκδήλωση είναι γνωστή σαν οφθαλμο-
618 αδενικό σύνδρομο (σύνδρομο Parinaud) και εμφανίζεται σε ποσοστό 2 -17% των

619 ασθενών ως επιπεφυκίτιδα με οίδημα των παρωτίδων και κοκκίωμα του επιπεφυκότα
620 (Jacomo *et al.*, 2002). Νευρολογικά η εγκεφαλοπάθεια είναι η πιο συχνή νευρολογική
621 επιπλοκή (1-7%) με ξαφνική εισβολή με πυρετό, σπασμούς από μέσης βαρύτητας μέχρι
622 status epilepticus και ανάρρωση σε 2 με 14 μέρες (περιπτώσεις μέχρι 1 χρόνο) , ενώ
623 έχουν επίσης σημειωθεί μυελίτιδα, ριζίτιδα και εγκεφαλική αταξία (Jacomo *et al.*, 2002).



624

625 **Εικόνα 8.** NEOG λεμφαδενοπάθεια. Πηγή (Angelakis *et al.*, 2008c)

626

627 Τα τελευταία 15 χρόνια η NEOG με αιτιολογικό παράγοντα τη *B. henselae*
628 χαρακτηρίζεται ως η πιο συχνή αιτία τοπικής λεμφαδενίτιδας (Rolain *et al.*, 2006). Αν
629 και κατά κύριο λόγο η NEOG προκαλείται από την *B. henselae*, υπάρχουν σπάνιες
630 αναφορές για NEOG που προκλήθηκε από μόλυνση με *B. quintana* (Rolain *et al.*, 2006).
631 Πρόσφατα, στην λίστα αυτή έχουν προστεθεί και άλλες Μπαρτονέλλες όπως η *B. tamiae*
632 και η *B. alsatica* (Angelakis *et al.*, 2008b) .

633

634 **1.7.6 Βακτηριακή αγγειομάτωση (BA)**

635 Η BA, η οποία αναφέρεται και ως «επιθηλιακή αγγειομάτωση» είναι μια αγγειακή
636 νόσος που προσβάλλει το δέρμα συνήθως ανοσοκατεσταλμένων ασθενών και κυρίως
637 ασθενών με HIV (Εικόνα 9) (Jacomino *et al.*, 2002). Χωρίς την κατάλληλη θεραπεία, η
638 ασθένεια μπορεί να εξαπλωθεί σε όλα τα όργανα και να οδηγήσει στην κατάληξη του
639 ασθενούς. Κακώσεις BA έχουν αναφερθεί στον μυελό των οστών, στο ήπαρ, στην
640 σπλήνα και στους λεμφαδένες. Σε σπάνιες περιπτώσεις έχει αναφερθεί ότι προσβάλλει και
641 ανοσο-ικανούς ασθενείς (Jacomino *et al.*, 2002). Τόσο η *B. henselae* όσο και η *B. quintana*
642 έχουν αναφερθεί σαν αιτιολογικοί παράγοντες, με την *B. quintana* να σχετίζεται με
643 υποδερματικές και οστικές κακώσεις ενώ η *B. henselae* με Ηπατική Περίπτωση (ΗΠ).
644 Στην BA εμφανίζονται πολυάριθμοι καφέ, βιολετί ή ακόμα και άχρωμοι δερματικοί και
645 υποδερματικοί όγκοι, οι οποίοι να κυμαίνονται από ελάχιστους μέχρι εκατοντάδες, με
646 μέγεθος από λίγα χιλιοστά μέχρι αρκετά εκατοστά. Η κλινική διαφοροδιάγνωση γίνεται
647 από κοκκιοματώματα, αιμαγγειώματα, υποδερματικούς όγκους και σαρκώματα Kaposi.
648 Αξίζει να αναφερθεί ότι η δερματικές βλάβες μοιάζουν με τις αντίστοιχες της verruga
649 peruana.



650

651 **Εικόνα 9.** Βακτηριακή Αγγειομάτωση λόγω λοίμωξης από *B. quintana*.

652

653 **1.7.7 Βακτηριακή Περίωση (ΒΠ)**

654 Η ΒΠ προσβάλλει εσωτερικά όργανα με κυριότερο το ήπαρ στο οποίο προσβάλλει τα
655 ηπατικά σωμάτια (Ηπατική Περίωση). Η ασθένεια προσβάλλει και το σπλήνα, τους
656 λεμφαδένες και τον μυελό των οστών. Η ασθένεια περιγράφηκε πρώτα σε ασθενείς που
657 έπασχαν από φυματίωση και προχωρημένο στάδιο καρκίνου. Έχει αναφερθεί και σε
658 λήπτες μοσχευμάτων και σε ασθενείς με HIV και παράλληλη μόλυνση από *B. henselae*
659 (Bass *et al.*, 1997a).

660

661

662 **1.8 ΔΙΑΓΝΩΣΗ**

663 Η διάγνωση της λοίμωξης από Μπαρτονέλλα είναι δύσκολο να γίνει α) λόγω της
664 δυσκολίας στην καλλιέργεια των βακτηρίων (απαιτητικά βακτήρια) και β) των μη
665 ειδικών κλινικών εκδηλώσεων τους. Οι διαγνωστικές τεχνικές που χρησιμοποιούνται
666 σήμερα περιλαμβάνουν την άμεση διάγνωση (καλλιέργεια του βακτηρίου,
667 ανοσοδιάγνωση, μοριακές τεχνικές) και την έμμεση διάγνωση που είναι κυρίως
668 ορολογική (Πίνακας 3).

Clinical feature	Specimen	Best techniques
Trench fever	Blood, serum	PCR
CSD	lymph nodes	PCR, serology
Endocarditis	Blood, serum, valves	PCR, serology
Bacteremia	Blood, serum	PCR, serology
BA	Blood, serum	PCR
BP	Blood, serum	PCR

669

670 **Πίνακας 3.** Οι πιο συχνές κλινικές εικόνες των Μπαρτονελλώσεων και οι καλύτερες
671 τεχνικές για την διάγνωση τους. Πηγή.(Angelakis *et al.*, 2008c)

672

673 **1.8.1 Δείγματα**

674 Για την διάγνωση μπορούν να χρησιμοποιηθούν διάφορα δείγματα και κυρίως δείγματα
675 ορού, ολικού αίματος, υλικό βιοψίας και αρθρώποδα. Τα δείγματα πρέπει να συλλέγονται
676 όσο το δυνατό πιο σύντομα μετά την έναρξη των συμπτωμάτων της νόσου. Δείγματα
677 ορού πρέπει να λαμβάνονται όσο το δυνατόν στα πρώτα στάδια της ασθένειας καθώς και
678 μετά από 2-3 βδομάδες, προκειμένου να γίνει επιβεβαίωση του αποτελέσματος. Σε
679 περίπτωση μη άμεσης εξέτασης του δείγματος, ο ορός μπορεί να αποθηκευτεί στους -
680 20°C η σε χαμηλότερες θερμοκρασίες χωρίς να καταστραφούν τα αντισώματα. Δείγματα
681 αίματος που προορίζονται είτε για καλλιέργεια είτε για PCR, πρέπει να λαμβάνονται πριν
682 την έναρξη της αντιβιοτικής αγωγής. Δείγματα βιοψίας όπως λεμφαδένες, ανευρύσματα
683 και καρδιακές βαλβίδες πρέπει να χωρίζονται σε δυο κομμάτια. Το ένα κομμάτι πρέπει
684 να τοποθετείται σε απόλυτη αιθανόλη προκειμένου να χρησιμοποιηθεί για
685 παθολογοανατομική εξέταση και ανοσοδιάγνωση και το δεύτερο να τοποθετείται άμεσα
686 σε στείρες συνθήκες στους -70°C προκειμένου να χρησιμοποιηθεί για καλλιέργεια και
687 ανάλυση με τη μέθοδο της PCR. Επίσης, αξίζει να αναφερθεί πως στις μεθόδους που
688 χρησιμοποιούνται για την διάγνωση των μπαρτονελλώσεων μπορεί να προστεθεί και η
689 ανίχνευση μπαρτονέλλων σε αρθρώποδα (Ξενοδιάγνωση) (xenodiagnosis)
690 συμπεριλαμβανομένων τσιμπουριών, ψειρών και ψύλλων (Sanogo *et al.*, 2003). Τα
691 αρθρώποδα, προκειμένου να χρησιμοποιηθούν για την καλλιέργεια του μικροβίου σε
692 shell vial ή για μοριακές τεχνικές, πρέπει να απολυμαίνονται με ιώδιο.

693

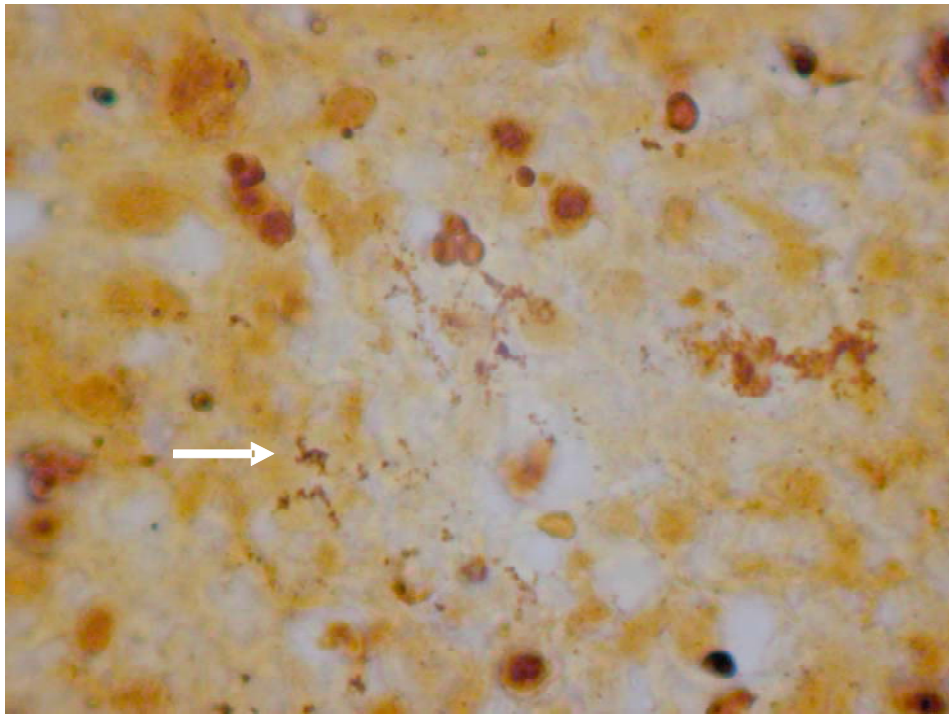
694

695 **1.8.2 Άμεση Διάγνωση**

696 **1.8.2.1 Καλλιέργεια.** Οι πιο διαδεδομένες μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την
697 καλλιέργεια και απομόνωση του μικροβίου είναι η καλλιέργεια σε αιματούχο άγαρ ή σε
698 αιματούχο ζωμό καθώς και η καλλιέργεια σε κυτταρικές σειρές. Οι μπαρτονέλλες
699 αναπτύσσονται σε αιματούχο άγαρ στους 37°C και σε ατμόσφαιρα 5% CO₂. Εξαιρέση
700 αποτελεί η *B. bacilliformis* που απαιτεί θερμοκρασία 30°C προκειμένου να αναπτυχθεί.
701 Όπως προαναφέρθηκε, οι πρωτοκαλλιέργειες Μπαρτονέλλας χρειάζονται αρκετό
702 διάστημα το οποίο μπορεί να φτάσει μέχρι και τις 45 μέρες (Maurin *et al.*, 1994), όμως,
703 ο χρόνος αυτός μειώνεται σε 3 έως 5 μέρες όταν πρόκειται για ανακαλλιέργεια. Η
704 ανακαλλιέργεια από αιμοκαλλιέργεια σε shell vials είναι η πιο αποτελεσματική μέθοδος
705 για καλλιέργεια του μικροβίου σε ασθενείς με ενδοκαρδίτιδα. Η μέθοδος αυτή
706 χρησιμοποιείται επίσης και για καλλιέργεια λεμφαδένων και βιοψιών δέρματος.
707 Πρόσφατα προτάθηκε ένα νέο μέσο για την καλλιέργεια των Μπαρτονελλών, που
708 λέγεται *Bartonella*-Alphaproteobacteria growth medium [BAPGM], το οποίο υπόσχεται
709 πιο εύκολη καλλιέργεια του μικροβίου (Maggi *et al.*, 2005). Αξίζει να αναφερθεί ότι αν
710 και έχει σημειωθεί σημαντική πρόοδος πάνω στην καλλιέργεια των μπαρτονελλών, οι
711 καλλιέργειες αποβαίνουν αρνητικές σε περιπτώσεις που τα δείγματα δεν ληφθούν κατά
712 τα πρώιμα στάδια της νόσου, καθώς και σε περιπτώσεις που ο ασθενής έχει λάβει πριν
713 αντιβιοτική θεραπεία.

714 **1.8.2.2 Ανοσοδιάγνωση.** Ανίχνευση Μπαρτονέλλας μπορεί να γίνει σε ιστούς με την
715 χρήση κατάλληλων αντισωμάτων. Η χρώση Whartin-Starry είναι η πιο διαδεδομένη

716 μέθοδος ανοσοδιάγνωσης και αποτελεί βασικό κριτήριο για την διάγνωση της
717 ενδοκαρδίτιδας. Η χρώση Whartin-Starry χρησιμοποιείται επίσης και για την ανίχνευση
718 των μπαρτονελλών σε λεμφαδένες σε ασθενείς με ΝΕΟΓ (Εικόνα 10) καθώς και στα
719 ερυθρά αιμοσφαίρια ασθενών με βακτηριαμία (Rolain *et al.*, 2001).



720

721 **Εικόνα 10.** Χρώση Whartin-Starry σε ασθενή με ΝΕΟΓ από *B. alsatica*.

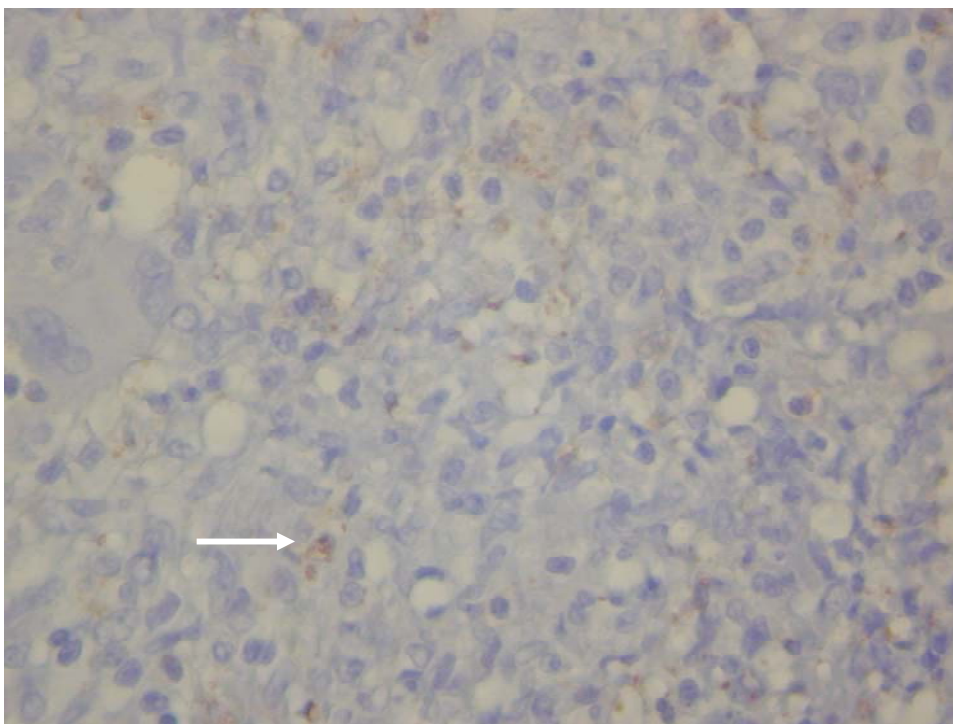
722 **1.8.2.3 Μοριακή βιολογία.** Η PCR είναι η πιο ασφαλής μέθοδος για την ανίχνευση των
723 μπαρτονελλών τόσο σε φρέσκους όσο και σε εγκλεισμένους σε παραφίνη ιστούς. Τα
724 κύρια γονίδια που χρησιμοποιούνται είναι το γονίδιο *gltA*, το γονίδιο 16S RNA, το *ITS*,
725 το *groEL* και το *rap31* (La Scola *et al.*, 2003). Η στρατηγική που ακολουθείται
726 περιλαμβάνει τη στόχευση δυο γονιδίων (συχνότερα το *ITS* και το *rap31*) και ενός
727 τρίτου γονιδίου (*groEL*), στην περίπτωση που δεν υπάρχει αποτέλεσμα ή το αποτέλεσμα
728 είναι ανακριβές από τη χρήση των δυο πρώτων γονιδίων. Ένα δείγμα θεωρείται θετικό

729 όταν τουλάχιστον δυο γονίδια βρεθούν θετικά καθώς και όταν οι γονιδιακές αλληλουχίες
730 που προκύπτουν από τη sequencing analysis των προϊόντων του γονιδιακού
731 πολλαπλασιασμού αντιστοιχούν στο ίδιο είδος Μπαρτονέλλας. Η πρόοδος των
732 μοριακών τεχνικών αυξάνει και την ευαισθησία στην διάγνωση των μπαρτονελλώσεων.
733 Η χρήση της real-time PCR με Taqman probes που στοχεύουν τα γονίδια ITS και *pap31*
734 έχει ελαχιστοποιήσει το χρόνο που απαιτείται για την διάγνωση της NEOΓ, και έχει
735 συμβάλλει σημαντικά στην αύξηση τόσο της ευαισθησίας όσο και της ειδικότητας στη
736 διάγνωση (Raoult *et al.*, 2006).

737 **1.8.3 Έμμεση διάγνωση**

738 Η ορολογική διάγνωση είναι η πιο διαδεδομένη μέθοδος για την διάγνωση
739 μπαρτονελλώσεων και ειδικότερα για την διάγνωση της NEOΓ, της βακτηριαμίας και
740 της ενδοκαρδίτιδας. Η ευαισθησία της μεθόδου κυμαίνεται απο σχεδόν 100% μέχρι κάτω
741 από 30%, καθώς διαφέρει απο εργαστήριο σε εργαστήριο και εξαρτάται από την μέθοδο
742 που χρησιμοποιείται, καθώς και από τον τρόπο προπαρασκευής των αντιγόνων (Jacomio
743 *et al.*, 2002). Η πιο εύχρηστη δοκιμασία για την διάγνωση της *B. henselae* είναι η
744 μέθοδος του έμμεσου ανοσοφθορισμού (indirect fluorescence assay). Θετική NEOΓ από
745 *B. henselae* θεωρείται η περίπτωση που οι τίτλοι των IgG αντισωμάτων είναι
746 μεγαλύτεροι απο 1:64. Οι περιπτώσεις ενδοκαρδίτιδας χαρακτηρίζονται από
747 υψηλότερους τίτλους IFA αντισωμάτων (> 1:800). Ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα
748 υπάρχουν σε περιπτώσεις λοίμωξης από Μυκοβακτηρίδια, σε περίπτωση λεμφώματος
749 και σαρκώματος Kaposi. Διασταυρούμενες αντιδράσεις (Cross-reactions) αναφέρονται
750 μεταξύ διαφορετικών ειδών Μπαρτονέλλας, καθώς και μεταξύ *Bartonella* sp. και της

751 *Coxiella burnetii* ή *Bartonella* sp. και Χλαμυδίων (Kelly *et al.*, 2008). Ο Lepidi και οι
752 συνεργάτες του εφάρμοσε μια νέα μέθοδο που ονομάζεται αυτοανοσοιστοχημεία, η
753 οποία χρησιμοποιεί τον ορό του ασθενούς ως την πηγή των αντισωμάτων ενάντια στο
754 βακτήριο (Lepidi *et al.*, 2006) (Εικόνα 11)

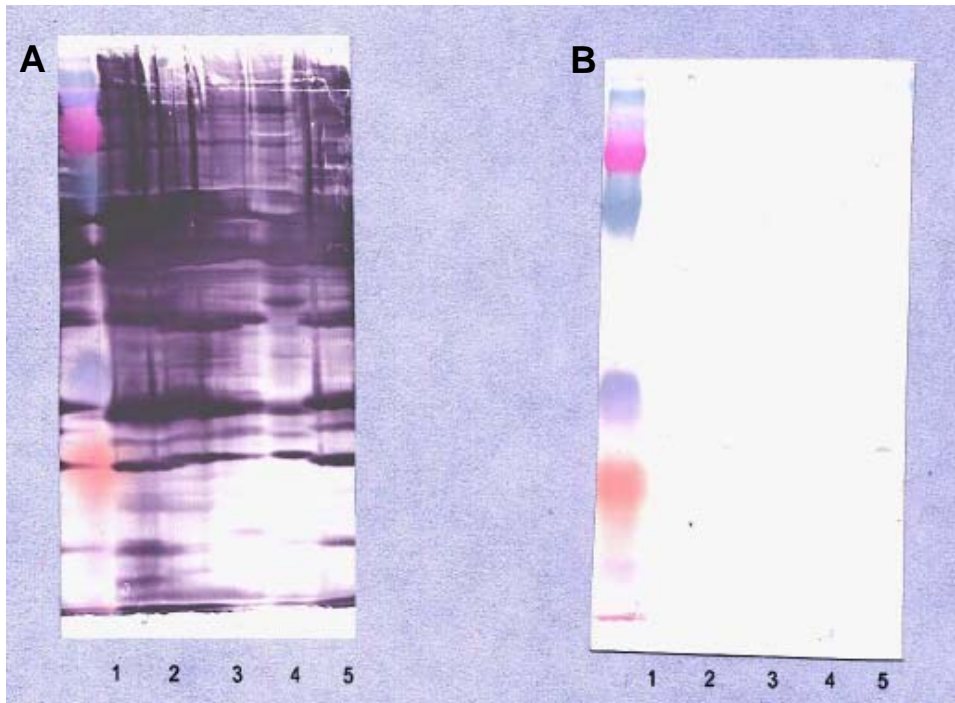


755

756 **Εικόνα 11.** Αυτοανοσοιστοχημεία ασθενούς με ΝΕΟΓ. Το βέλος απεικονίζει τον
757 βάκιλλο της Μπαρτονέλλας.

758

759 Η αυτοανοσοιστοχημεία έχει πολύ μεγαλύτερη ευαισθησία από τις καλλιέργειες και είναι
760 αντίστοιχη της ευαισθησίας που επιτυγχάνεται με την PCR. Τελευταία, στην έμμεση
761 διάγνωση των μπαρτονελλών έχουν εισαχθεί πιο εξελιγμένες τεχνικές όπως αυτή της
762 ανοσοαποτύπωσης (Western blot), η οποία αποδεικνύεται πολύ χρήσιμη σε περιπτώσεις
763 ενδοκαρδίτιδας οφειλόμενης σε μπαρτονέλλα (Hourikian and Raoult, 2003) (Εικόνα 12).



764

765 **Εικόνα 12.** Western blot ασθενούς με ενδοκαρδίτιδα οφειλόμενης σε *B. quintana*

766 (A) πριν την προσρρόφηση (B) μετά την προσρρόφηση

767 Γραμμή 1. *B. quintana*; γραμμή 2 *B. henselae*; γραμμή 3. *B. elizabethae*; γραμμή 4. *B.*
 768 *vinsonii* subsp. *berkhoffii*; γραμμή 5: *B. alsatica*.

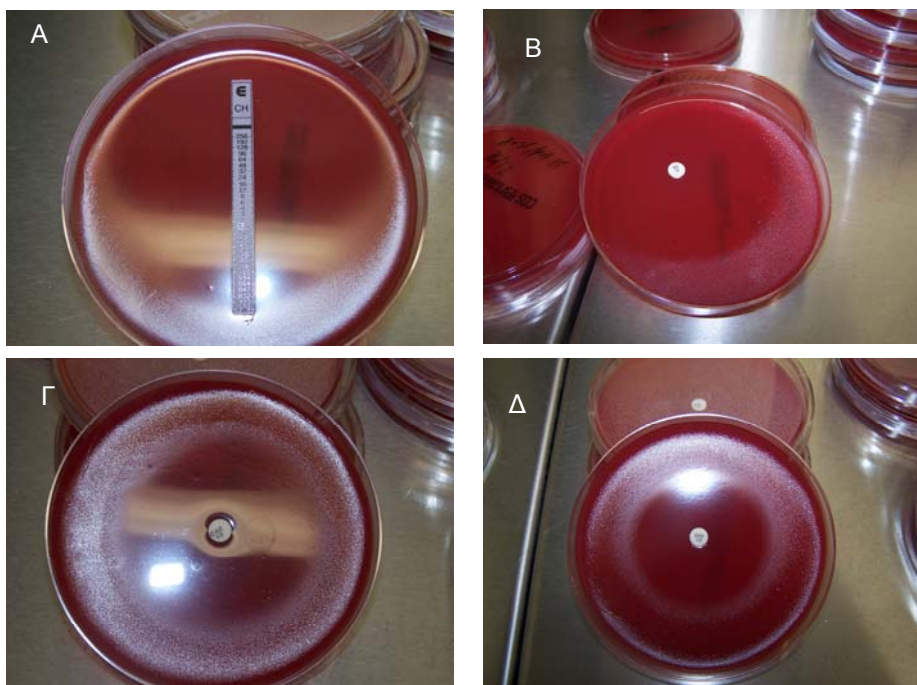
769

770 1.9 ΘΕΡΑΠΕΙΑ

771 1.9.1 In vitro ευαισθησία στα αντιβιοτικά

772 Ο προσδιορισμός της ευαισθησίας των μπαρτονελλών στα αντιβιοτικά έχει γίνει σε
 773 ευκαρυωτικά κύτταρα και σε αξενικά μέσα (Rolain *et al.*, 2004). Οι μπαρτονέλλες, όταν
 774 αναπτύσσονται αξενικά, είναι ευαίσθητες σε πολλά αντιβιοτικά συμπεριλαμβανομένων
 775 της πενικιλίνης, των κεφαλοσπορινών, των αμινιγλυκοσιδών, της χλωραμφενικόλης, των

776 τετρακυκλινών, των μακρολίδων, της ριφαμπικίνης, της κοτριμοξαζόλης και των
777 κινολονών (Εικόνα 13). Παρόλα αυτά, το αποτέλεσμα ανταποκρίνεται ελάχιστα στην in
778 vivo αποτελεσματικότητα των αντιβιοτικών, όπου μόνο οι αμινογλυκοσίδες διατηρούν
779 την βακτηριοκτόνο δραστηριότητα τους. Η βακτηριοστατική δράση των περισσότερων
780 αντιβιοτικών και η βακτηριοκτόνος δράση των αμινογλυκοσιδών έχουν μελετηθεί και σε
781 κυτταρικές καλλιέργειες μακροφάγων (murine macrophage-like cells) για την *B.*
782 *henselae* και ερυθρών αιμοσφαιρίων για την *B. quintana* (Rolain *et al.*, 2004).
783 Πρόσφατες έρευνες in vivo, έχουν δείξει ότι ο συνδυασμός αντιβιοτικών και κυρίως
784 δοξυκυκλίνης με γενταμυκίνη, μπορεί να αποβεί χρήσιμος στη θεραπεία ενδοκαρδίτιδας
785 και βακτηραιμίας που οφείλονται σε *Bartonella* sp. (Rolain *et al.*, 2004).



786

787 **Εικόνα 13.** Καλλιέργεια *B. henselae* σε αιματούχο 5% Columbia άγαρ παρουσία Α.
788 κλαριθρομυκίνης; Β.χλωραμφενικόλης; Γ. κεφταζιδίμης; Δ. γενταμυκίνης.

789

790 **1.9.2 In vivo ευαισθησία στα αντιβιοτικά**

791 **1.9.2.1 Πυρετός των χαρακωμάτων.** Οι περισσότερες αναφορές που υπάρχουν για τον
792 πυρετό των χαρακωμάτων αφορούν τα χρόνια πριν την ανακάλυψη των αντιβιοτικών.
793 Σύμφωνα με πρόσφατη έρευνα, οι ασθενείς που πάσχουν από χρόνια βακτηριαμία από
794 *B. quintana* πρέπει να θεραπεύονται με γενταμυκίνη (3mg/kg ενδοφλέβια μια φορά
795 ημερισίως) για 14 μέρες, σε συνδυασμό με δοξυκυκλίνη (200mg/day p.o μια φορά
796 ημερησίως) για 28 μέρες (Rolain *et al.*, 2004). Οι ασθενείς με χρόνια βακτηριαμία
797 πρέπει να εξετάζονται προσεκτικά για την ύπαρξη ενδοκαρδίτιδας. Στους ασθενείς που
798 λαμβάνουν γενταμυκίνη είναι απαραίτητη η ημερήσια εξέταση της νεφρικής λειτουργίας
799 και ο ακριβής υπολογισμός της ποσότητας του χορηγούμενου αντιβιοτικού προκειμένου
800 να αποφευχθούν οι επιπλοκές από τη χορήγηση της γενταμυκίνης (Rolain *et al.*, 2004).

801 **1.9.2.2 NEOF.** Η NEOF συνήθως δεν χρειάζεται αντιβιοτική θεραπεία. Η αντιμετώπιση
802 της βασίζεται κυρίως στην χορήγηση αναλγητικών για τον πόνο και προσεκτική
803 παρακολούθηση του ασθενούς για τυχόν εμφάνιση επιπλοκών. Πρόσφατες έρευνες
804 δείχνουν ότι στους ασθενείς που δεν παρουσιάζουν κλινική βελτίωση, η αφαίρεση των
805 μολυσμένων λεμφαδένων μπορεί να αποβεί ευεργετική. Μέχρι σήμερα υπάρχει μόνο μια
806 έρευνα για την θεραπεία της NEOF, η οποία έδειξε ότι οι ασθενείς στους οποίους
807 χορηγήθηκε αζυθρομυκίνη παρουσίασαν ελάχιστη αύξηση της ταχύτητας αποθεραπείας
808 απο την NEOF, σε σχέση με αυτούς που δεν έλαβαν καθόλου θεραπεία (Rolain *et al.*,
809 2004). Συμπερασματικά ισχύει ότι για την θεραπεία της NEOF, σε ασθενείς με ήπια

810 συμπτώματα δεν συστήνεται θεραπεία, ενώ σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς με
811 επιπλοκές, η χορήγηση αζυθρομυκίνης μπορεί να αποβεί χρήσιμη (Kelly *et al.*, 2008).

812 **1.9.2.3 Ενδοκαρδίτιδα.** Η θεραπεία στους ασθενείς με υποψία ενδοκαρδίτιδας από
813 Μπαρτονέλλα πρέπει να περιλαμβάνει μια αμινογλυκοσίδη (κατ' επιλογή γενταμυκίνη)
814 για τουλάχιστον 14 μέρες, σε συνδυασμό με κεφτριαξόνη με ή χωρίς δοξυκυκλίνη για 6
815 βδομάδες προκειμένου να εξαλειφθεί το μικρόβιο (Rolain *et al.*, 2004). Οι Μπαρτονέλλες
816 προκαλούν εκτενή βλάβη στις βαλβίδες και για τον λόγο αυτό στις περισσότερες
817 περιπτώσεις ενδοκαρδίτιδας από Μπαρτονέλλα κρίνεται αναγκαία η αντικατάσταση της
818 προσβεβλημένης βαλβίδας.

819 **1.9.2.4 Βακτηριακή αγγειομάτωση και Ηπατική πελίωση.** Η αντιβιοτική θεραπεία
820 για την ΒΑ και την ΗΠ έχει μελετηθεί συστηματικά, με την ερυθρομυκίνη να αποτελεί
821 το αντιβιοτικό πρώτης επιλογής. Η θεραπεία πρέπει να διαρκεί για τουλάχιστον 3 μήνες
822 σε περίπτωση ΒΑ και για 4 μήνες για ΗΠ. Θεραπεία ακόμα μεγαλύτερης διάρκειας
823 επιβάλλεται σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς και σε ασθενείς με HIV (Rolain *et al.*,
824 2004). Πρόσφατες μελέτες, που έγιναν σε *in vitro* μοντέλα καλλιέργειών *B. quintana* σε
825 ενδοθηλιακά κύτταρα, έδειξαν ότι η ερυθρομυκίνη παρουσιάζει μια αντι-αγγειογενετική
826 ιδιότητα, η οποία είναι και η κατ'εξοχήν ευεργετική δράση της για την θεραπεία της ΒΑ
827 και της ΗΠ (Rolain *et al.*, 2004). Περιπτώσεις επανεμφάνισης της ΗΠ και της ΒΑ στο
828 δέρμα και στα οστά αναφέρονται συχνά και κυρίως σε ασθενείς με HIV και σε
829 ανοσοκατεσταλμένους. Σε τέτοιες περιπτώσεις οι ασθενείς πρέπει να λαμβάνουν
830 προφυλακτική αντιβιο-προστασία με ερυθρομυκίνη ή δοξυκυκλίνη για όσο διάστημα
831 παραμένουν ανοσοκατεσταλμένοι (Rolain *et al.*, 2004).

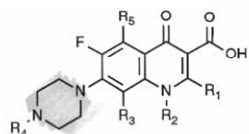
832

833 1.10. ΚΙΝΟΛΟΝΕΣ

834 1.10.1 Δομή

835 Οι κινολόνες αποτελούν μια από τις βασικές ομάδες αντιβιοτικών που ξεκίνησαν στην
836 δεκαετία το 1970 σαν αντιβιοτικά για την θεραπεία των ουρολοιμώξεων (Van *et al.*,
837 2005). Τα αντιβιοτικά αυτά ενώ στην αρχή θεωρήθηκαν «πανάκεια» για τον αγώνα κατά
838 των μικροβίων, στις μέρες μας ο ρόλος τους τείνει να αναθεωρηθεί αφού έχουν αρχίσει
839 ήδη να εμφανίζονται ανθεκτικά στελέχη. Οι κινολόνες που είναι διαθέσιμες για κλινική
840 χρήση, κατατάσσονται σε 4 γενεές, οι οποίες βασίζονται στην σπεκτρομετρική τους
841 δραστηριότητα. Η πρώτη γενεά κινολονών αποτελείται από το ναλιδικό οξύ, το οποίο
842 ανακαλύφθηκε το 1962 και καταρχήν χρησιμοποιήθηκε ως ανθελονοσιακό αντιβιοτικό.
843 Η δεύτερη γενεά κινολονών, έχει ένα άτομο φθορίου (F) στη θέση 6 (για αυτό και
844 ονομάζονται φλουοροκινολόνες). Η ομάδα αυτή είναι η πιο δραστική έναντι των Gram
845 αρνητικών βακτηρίων, με την σιπροφλοξασίνη και την οφλοξασίνη να αποτελούν τα πιο
846 συχνά χρησιμοποιούμενα αντιβιοτικά. Αξίζει να σημειωθεί ότι η σιπροφλοξασίνη
847 χρησιμοποιείται και για την θεραπεία της *P. aeruginosa*. Η τρίτη γενεά των κινολονών
848 έχει μια πυριδοξίνη στην θέση 7 και μια βάση μεθοξέος (methoxy) στην θέση 8. Η γενιά
849 αυτή είναι πιο δραστική ενάντια έναντι των Gram θετικών και των αναεροβίων
850 βακτηρίων. Η τροβαφλοξασίνη για αρκετό χρονικό διάστημα αποτέλεσε το πιο δραστικό
851 αντιβιοτικό αυτής της κατηγορίας, αλλά σύντομα ο ρόλος της αναθεωρήθηκε καθώς
852 βρέθηκε ότι σχετίζεται με ηπατοτοξικότητα. Το πιο νέο μέλος είναι η γεμιφλοξασίνη, η
853 οποία έχει καλή δράση ενάντια σε μεγάλο εύρος μικροβίων, συμπεριλαμβανομένων και

854 αναεροβίων. Τέλος, η τέταρτη γενεά αποτελείται από τις μη φθοριωμένες κινολόνες, με
 855 κύριο εκπρόσωπο την γαρενοξασίνη. Στον πίνακα απεικονίζεται η μοριακή δομή των
 856 κινολονών.



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
Ciprofloxacin	H		H		H
Enrofloxacin	H		H		H
AT-4140	H		F		NH ₂
Enoxacin	H	Et	H		H
Amifloxacin	H	NH-Me	H		H
Norfloxacin	H	Et	H		H
Lomefloxacin	H	Et	F		H
Fleroxacin	H	F-Et	F		H
Perfloxacin	H	Et	H		H
Temafloxacin	H		H		H
Difloxacin	H		H		H
Ofoxacin	H		H		H
Rufloxacin	H		H		H
(-)-Ofloxacin	H		H		H
MF-961	H		H		H
KB-5246	H		H		H
NAD-441A	H		H		H
Danofloxacin	H		H		H
BMV-40062	H	-C(CH ₃) ₃	H		H

857

858 **Πίνακας 4.** Οι σημαντικότερες κινολόνες και η μοριακή δομή τους.

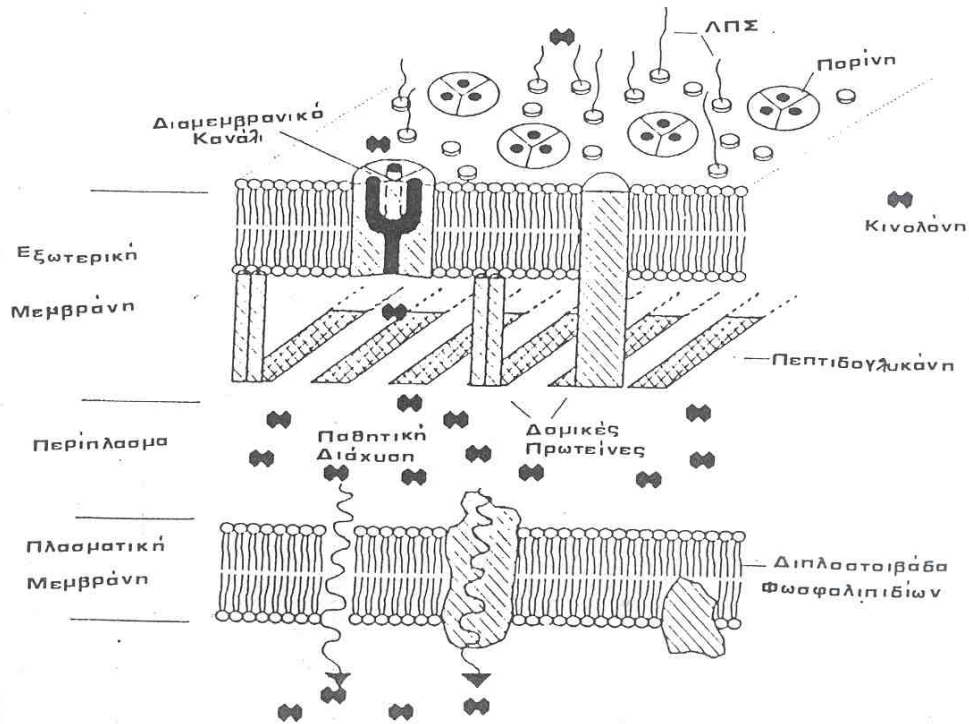
859 **1.10.2 Μηχανισμός δράσης των κινολονών**

860 Ο στόχος των κινολονών είναι η DNA γυράση και η DNA τοποισομεράση IV. Και τα
861 δυο ένζυμα αποτελούνται από 2 υπομονάδες. Οι υπομονάδες της DNA γυράσης είναι η
862 GyrA, μια 97-kDa πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το γονίδιο *gyrA*, και η GyrB, μια
863 90-kDa πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το γονίδιο *gyrB*. Οι αντίστοιχες υπομονάδες
864 της τοποισομεράσης IV είναι η ParC (75 kDa) και η ParE (70 kDa) (Van *et al.*, 2005).
865 Τόσο η γυράση όσο και η τοποισομεράση IV, χρησιμοποιούνται από το βακτηριακό
866 κύτταρο στην διόρθωση του DNA: εισάγουν θετικές ή αρνητικές υπερέλικες μέσα στο
867 DNA, με αποτέλεσμα σταδιακά να μετατρέπουν το χαλαρωμένο DNA σε ισχυρά
868 αρνητικά υπερελικωμένο DNA. Η καταλυτική αυτή δράση απαιτεί την υδρόλυση ενός
869 μορίου ATP. Οι γυράσες στα βακτήρια συμμετέχουν στη μετακίνηση της διχάλας
870 αντιγραφής και παρέχουν στα κύτταρα ζωτικές λειτουργίες (αντιγραφή, μεταγραφή κτλ).
871 Αυτό τεκμηριώνεται και από το γεγονός ότι μεταλλάγματα με ελαττωματικές
872 τοποισομεράσες συνήθως δυσκολεύονται να επιβιώσουν. Το υπερελικωμένο DNA έχει
873 πιο συμπαγή διαμόρφωση από την αντίστοιχη του μη υπερελικωμένου και με αυτόν τον
874 τρόπο επιτυγχάνεται ευκολότερα το πακετάρισμα του DNA στο κύτταρο. Αν και λίγα
875 βακτήρια μπορούν να λειτουργήσουν μόνο με την χρήση της DNA γυράσης, τα
876 περισσότερα χρησιμοποιούν και τα δυο ένζυμα. Οι κινολόνες μπλοκάρουν την δράση της
877 DNA γυράσης και της DNA τοποισομεράσης IV, με αποτέλεσμα το DNA του βακτηρίου
878 να σπάει και να μην μπορεί να συντεθεί (Drlica and Malik, 2003). Στα Gram αρνητικά
879 βακτήρια, η DNA γυράση είναι ο κύριος στόχος των κινολονών ενώ στα Gram θετικά η
880 τοποισομεράση IV αποτελεί τον βασικό στόχο. Σαν αποτέλεσμα, οι μεταλλάξεις στα
881 Gram αρνητικά βακτήρια εμφανίζονται κυρίως στο γονίδιο *gyrA*, ενώ στα Gram θετικά
882 στο γονίδιο *parC* (Drlica and Malik, 2003). Οι μεταλλάξεις εμφανίζονται κυρίως σε μια

883 περιοχή της υπομονάδας GyrA ή της ParC που λέγεται “quinolone-resistance-
884 determining region” (QRDR). Η QRDR συμβάλλει στην ελίκωση του DNA και στην
885 περίπτωση της *E. coli* κωδικοποιείται από τα νουκλεοτίδια μεταξύ της θέσης 51 και 106
886 της DNA γυράσης, με πιο σημαντική περιοχή τα νουκλεοτίδια από 83 έως 87 (Biswas *et*
887 *al.*, 2007). Αναφέρεται ότι μια μόνο μετάλλαξη στην περιοχή από 83 έως 87 της
888 γυράσης στην *E. coli* οδηγεί σε χαμηλού επιπέδου αντοχή στις κινολόνες, ενώ σε
889 περίπτωση ύπαρξης και δεύτερης μετάλλαξης εμφανίζεται αντοχή υψηλού επιπέδου
890 (Heisig and Tschorny, 1994).

891 Οι κινολόνες, προκειμένου να φτάσουν τον στόχο τους (την γυράση και την
892 τοποισομεράση IV), πρέπει να περάσουν από το τοίχωμα των βακτηρίων (Σχήμα 2). Τα
893 Gram αρνητικά βακτήρια μπορούν να αλλάξουν την διαβατότητα της μεμβράνης τους με
894 το να αλλάξουν την δομή των πορινών τους, οι οποίες ευθύνονται για την δημιουργία
895 καναλιών μέσα από τα οποία διέρχονται οι κινολόνες. Στην περίπτωση της *E. coli* οι
896 πορίνες αυτές ονομάζονται OmpF and OmpC (Van Bambeke *et al.*, 2000). Παράλληλα
897 τόσο τα Gram αρνητικά όσο και τα Gram θετικά βακτήρια έχουν ενεργειακά
898 εξαρτώμενες αντλίες, οι οποίες προσπαθούν να αποβάλλουν τις κινολόνες από το
899 βακτήριο. Οι αντλίες αυτές μπορεί να είναι ανενεργές, να λειτουργούν σε μικρό βαθμό ή
900 να υπερλειτουργούν. Στην περίπτωση της *E. coli* η αντλία AcrAB-TolC φαίνεται ότι
901 παίζει σπουδαίο ρόλο στην απομάκρυνση των κινολονών. Μεταλλάξεις στην *acrR* (ένας
902 από τους υποδοχείς της *acrAB*) οδηγεί σε αύξηση της δράσης των αντλιών, ενώ
903 μεταλλάξεις που αυξάνουν τη δράση του *marR* (ένας από τους υποδοχείς της *acrA*)
904 οδηγεί στην ενεργοποίηση του *acrAB*, του *tolC* και ενός γονιδίου που ελλατώνει την
905 έκφραση του *ompF* και κατ'επέκταση την δράση των αντλιών (Van *et al.*, 2005).

906



907

908 **Σχήμα 2.** Ενδοκυττάρια συγκέντρωση των κινολονών στα Gram αρνητικά βακτήρια.

909

910

911

912

913

914

915

916

917

918

919

920

921

B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

922

923

924

925

926

927

928

929

930

931

932

933 2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

934 Τα είδη του γένους *Bartonella* είναι gram αρνητικοί βάκιλοι ή κοκκοβάκιλοι που
935 ανήκουν στα α2-πρωτεοβακτήρια. Το γένος *Bartonella* συγγενεύει με βακτήρια του
936 γένους *Brucella* και *Agrobacterium* (Birtles and Raoult, 1996). Την τελευταία δεκαετία ο
937 αριθμός των αναγνωρισμένων μπαρτονελλών αυξήθηκε γρήγορα με αποτέλεσμα σήμερα
938 η οικογένεια Bartonellaceae να περιλαμβάνει 22 είδη και 3 υποείδη. Η γεωγραφική
939 κατανομή των μπαρτονελλών εξαρτάται από την κατανομή των ξενιστών και των
940 μεταβιβαστών τους (Kosoy *et al.*, 2008a). Όπως προαναφέρθηκε, διάφορα θηλαστικά
941 έχει βρεθεί να είναι οι φορείς ή οι ξενιστές των Μπαρτονελλών, όπως γάτες, σκύλοι,
942 τρωκτικά, βοοειδή κ.α. (Fournier *et al.*, 2007; Bai *et al.*, 2007a). Μέχρι σήμερα, 11 είδη
943 Μπαρτονέλλας σχετίζονται με ένα αυξανόμενο αριθμό ασθενειών
944 συμπεριλαμβανόμενων: ΝΕΟΓ (*Bartonella henselae*), ΒΑ και ΗΠΙ (*B. henselae*,
945 *Bartonella quintana*), βακτηριαμία-ενδοκαρδίτιδα (*B. henselae*, *B. quintana*, *Bartonella*
946 *vinsonii* subsp. *arupensis*, *Bartonella alsatica* και *Bartonella rochalimae*), Carrions
947 disease (*Bartonella bacilliformis*), πυρετό των χαρακωμάτων (*B. quintana*),
948 μυοκαρδίτιδα (*Bartonella washoensis*) και σπληνομεγαλία (*B. rochalimae*) (Angelakis *et*
949 *al.*, 2008a).

950

951 Η θεραπεία των μπαρτονελλώσεων εξαρτάται από τις κλινικές εκδηλώσεις της νόσου.
952 Υπάρχουν ελάχιστα δημοσιευμένα περιστατικά και κλινικές μελέτες. Επιπλέον, -όπως
953 προαναφέρθηκε στο γενικό μέρος- η *in vitro* ευαισθησία των μπαρτονελλών στα
954 αντιβιοτικά δεν ανταποκρίνεται στην *in vivo* ευαισθησία. Μόνο οι αμινογλυκοσίδες

955 διατηρούν την βακτηριοκτόνο δράση τους, ενώ τα υπόλοιπα αντιβιοτικά ασκούν μόνο
956 βακτηριοστατική δράση.

957 Οι κινολόνες τα τελευταία χρόνια χρησιμοποιούνται συχνά για την θεραπεία της Carion's
958 disease (Kymionis *et al.*, 2004;Curi *et al.*, 2006;Maco *et al.*, 2004;Henriquez *et al.*, 2004)
959 καθώς και για τις οφθαλμικές επιπλοκές των μαρτονελλώσεων (Conrad,
960 2001;Margileth, 1992). Όμως, αναφέρονται αρκετά περιστατικά ανεπιτυχούς θεραπείας
961 μετά την χορήγηση κινολονών λόγω μη υποχώρησης των συμπτωμάτων ή
962 επανεμφάνισης τους αμέσως μετά την λήξη της αντιβιοτικής αγωγής (Biswas *et al.*,
963 2007). Επιπλέον, προηγούμενες έρευνες σχετικά με την ευαισθησία των μαρτονελλών
964 στις κινολόνες, δείχνουν ότι η αντοχή των μαρτονελλών στις κινολόνες παρουσιάζει
965 μεγάλες διαφορές, ανάλογα με το είδος της κινολόνης που χρησιμοποιείται (Ives *et al.*,
966 2001;Kordick *et al.*, 1997;Rolain *et al.*, 2004).

967

968

969

970

971

972

973

974

975 **2.1 Στόχοι της παρούσας μελέτης**

976 Α) Η μελέτη της ευαισθησίας διαφόρων στελεχών μπαρτονέλλας (στελέχη αναφοράς και
977 στελέχη που απομονώθηκαν από φυσικούς ξενιστές) σε ένα μεγάλο εύρος αντιβιοτικών

978 Β) Η αναζήτηση και ο προσδιορισμός παραγόντων που επηρεάζουν την ποικιλότητα
979 ευαισθησία των μπαρτονελλών απέναντι στις κινολόνες.

980 Γ) Η μελέτη μηχανισμών αντοχής στις κινολόνες σε φυσικά απομονωθέντα στελέχη, και
981 σε in vitro ανθεκτικά στις κινολόνες στελέχη μπαρτονέλλας.

982 Δ) Ανίχνευση και ταυτοποίηση στελεχών Μπαρτονέλλας σε φυσικούς ξενιστές.

983 Η έρευνα περιλαμβάνει 2 επιμέρους υπομελέτες:

984 **ΠΡΩΤΗ ΥΠΟΜΕΛΕΤΗ**

985 **Α) Μελέτη της ευαισθησίας στελεχών Μπαρτονέλλας**

986 Προσδιορίστηκαν οι MICs που παρουσίαζαν 20 στελέχη Μπαρτονέλλας που
987 απομονώθηκαν από άγρια ζώα στην Αυστραλία καθώς και τεσσάρων στελεχών
988 αναφοράς απέναντι σε 11 αντιβιοτικά.

989 **Β) Διερεύνηση της αιτίας που οδηγεί σε ποικιλότητα συμπεριφορά των**
990 **Μπαρτονελλών στις κινολόνες**

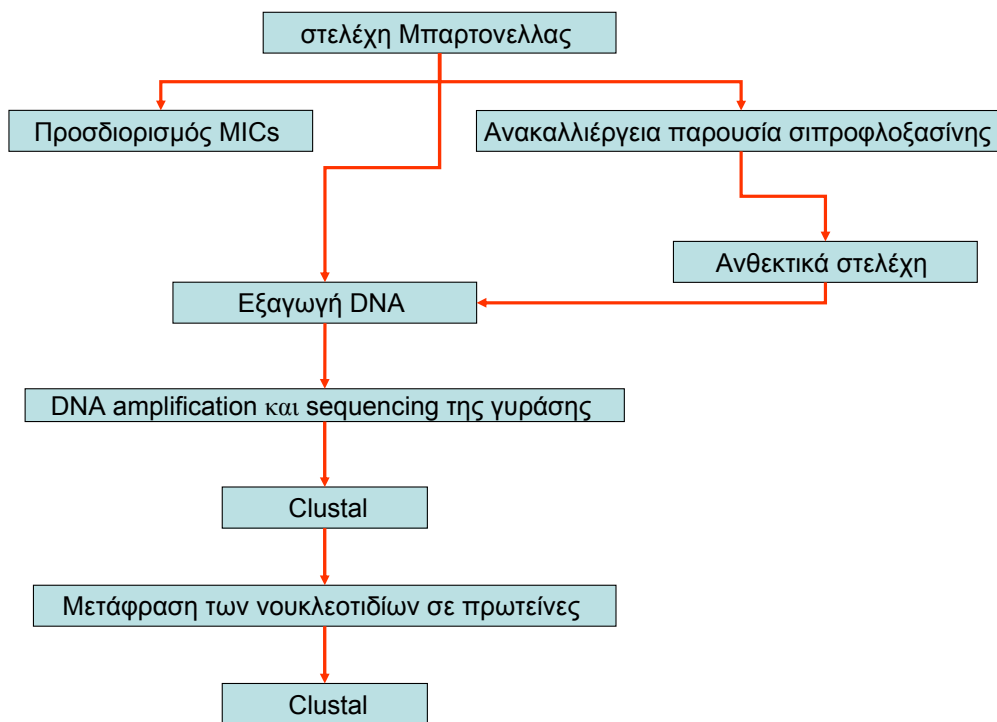
991 i) Προσδιορίστηκε η γονιδιακή αλληλουχία της QRDR της γυράσης στα απομονωθέντα
992 από ζώα στελέχη Μπαρτονελλών καθώς και σε στελέχη αναφοράς και συγκρίθηκαν οι

993 γονιδιακές αλληλουχίες όλων των στελεχών προκειμένου να μελετηθούν οι πιθανές
994 διαφορές μεταξύ τους.

995 ii) Επιπλέον δημιουργήθηκαν in vitro ανθεκτικά στην σιπροφλοξασίνη στελέχη
996 μπαρτονέλλας και συγκρίθηκαν οι γονιδιακές αλληλουχίες των ανθεκτικών και των
997 ευαίσθητων στελεχών, προκειμένου να μελετηθεί η ύπαρξη πιθανών μεταλλάξεων.

998

999 **Διάγραμμα εργασίας**



1000

1001

1002

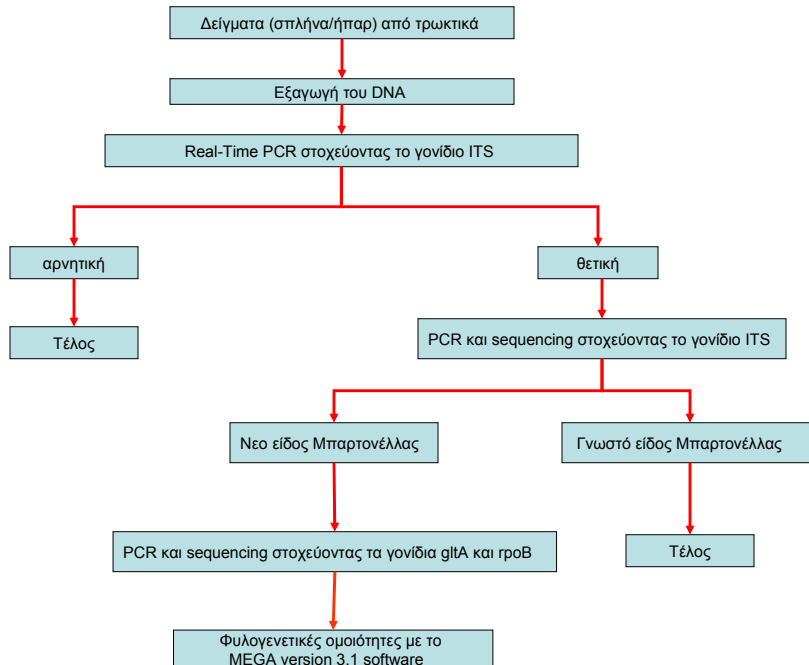
1003 **ΔΕΥΤΕΡΗ ΥΠΟΜΕΛΕΤΗ**

1004 **Ανίχνευση και ταυτοποίηση στελεχών *Bartonella* sp. σε φυσικούς ξενιστές**

1005 Δείγματα από τρωκτικά συνελήφθηκαν σε διαφορετικές επαρχίες του ΛΑΟΣ
1006 εξετάστηκαν για την ύπαρξη *Bartonella* sp. με την χρήση Real-Time PCR. Τα θετικά
1007 δείγματα αναλήθηκαν με standard PCR στοχεύοντας το γονίδιο ITS προκειμένου να
1008 αναγνωριστεί το είδος. Τα νέα είδη Μπαρτονέλλας εξετάστηκαν επιπλέον με standard
1009 PCR στοχεύοντας τα γονίδια *gltA* και *proB*.

1010

1011 **Διάγραμμα εργασίας**



1012

1013

1014

1015 **2.2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

1016 **2.2.1 ΠΡΩΤΗ ΥΠΟΜΕΛΕΤΗ**

1017 **A) Μελέτη της ευαισθησίας στελεχών Μπαρτονέλλας**

1018 **2.2.1.1 Στελέχη**

1019 Στην έρευνα χρησιμοποιήθηκαν στελέχη αναφοράς Μπαρτονέλλας και στελέχη που
1020 είχαν απομονωθεί από άγρια ζώα της Αυστραλίας. Η σύλληψη, ο χειρισμός των ζώων
1021 και η μελέτη τους έγιναν σύμφωνα με τον ‘The Australian Code of Practice for the Care
1022 and Use of Animals for Scientific Purposes’. Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν και τέσσερα
1023 στελέχη αναφοράς *B. henselae* strain Houston, *B. henselae* strain Marseille, *B.*
1024 *bacilliformis* (ATCC KC384) και *B. quintana* strain Oklahoma.

1025 **2.2.1.2 Αντιβιοτικά**

1026 Όλα τα στελέχη ελέγχθηκαν για τα παρακάτω αντιβιοτικά: ερυθρομυκίνη,
1027 κλαριθρομυκίνη, τετρακυκλίνη, αζυθρομυκίνη, αμοξυσιλίνη, κεφτριαξόνη, οφλοξασίνη,
1028 σιπροφλοξασίνη, μιπενέμη, ριφαμπικίνη και βανκομυκίνη. Όλα τα αντιβιοτικά
1029 προήλθαν από την AB BIODISK (Solna, Σουηδία).

1030 **2.2.1.3 Καλλιέργεια-προσδιορισμός της ευαισθησίας**

1031 Για τον προσδιορισμό της ευαισθησίας χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος του E-test. Όλα τα
1032 στελέχη καλλιεργήθηκαν σε αιματούχο 5% Columbia άγαρ στους 37°C και σε

1033 ατμόσφαιρα 5% CO₂. Εξαίρεση αποτέλεσε η *B. bacilliformis* για την οποία η
1034 θερμοκρασία που χρησιμοποιήθηκε για την καλλιέργεια ήταν 30°C. Μετά την
1035 πρωτοκαλλιέργεια κάθε στέλεχος ανακαλλιεργήθηκε σε αιματούχο 5% Columbia άγαρ,
1036 στο οποίο είχε τοποθετηθεί στριπ E-test. Τα στελέχη μπαρτονέλλας, αφέθηκαν να
1037 αναπτυχθούν για χρονικό διάστημα 5 έως 12 ημερών και κατόπιν προσδιορίστηκε η
1038 ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MICs) όλων των υπό έλεγχο στελεχών για το κάθε
1039 είδος αντιβιοτικού. Το κάθε E-test πραγματοποιήθηκε εις διπλούν για κάθε στέλεχος
1040 μπαρτονέλλας, προκειμένου να υπάρξει επαλήθευση του αποτελέσματος.

1041 Συγχρόνως, σαν μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν στελέχη *Staphylococcus aureus* ATCC
1042 29213 και *Escherichia coli* ATCC 25922. Ο προσδιορισμός των MICs για τους
1043 μάρτυρες έγινε σε αιματούχο 5% Columbia άγαρ, όπως και στα στελέχη της
1044 μπαρτονέλλας, με εξαίρεση ότι ο έλεγχος και ο προσδιορισμός των MICs για τα
1045 συγκεκριμένα βακτήρια έγινε στις 24 ώρες.

1046 **B) Διερεύνηση της αιτίας που οδηγεί σε ποικιλόμορφη συμπεριφορά των**
1047 **Μπαρτονελλών στις κινολόνες**

1048 **i) Προσδιορισμός της γονιδιακής αλληλουχίας της QRDR της γυράσης**

1049 **2.2.1.4 Εξαγωγή του DNA**

1050 Προκειμένου να εξάγουμε το DNA, έγινε λήψη μιας αποικίας από κάθε στέλεχος
1051 μπαρτονέλλας. Κατόπιν, η εξαγωγή του DNA έγινε με την χρησιμοποίηση του QIAamp
1052 Tissue kit (QIAGEN, Hilden, Germany), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η
1053 διαδικασία έγινε κάτω από στείρες συνθήκες προκειμένου να αποφευχθεί ο κίνδυνος
1054 επιμολύνσεων. Το DNA μέχρι να μελετηθεί αποθηκεύθηκε στους -20°C.

1055 **2.2.1.5 Πολλαπλασιασμός του γονιδίου *gyrA* και ανάλυση της αλληλουχίας των**
1056 **βάσεων του DNA (PCR -sequencing του γονιδίου *gyrA*)**

1057 Στα στελέχη μπαρτονέλλας που απομονώθηκαν από τα ζώα της Αυστραλίας,
1058 προχωρήσαμε σε γενωμικό πολλαπλασιασμό (DNA amplification) του γονιδίου *gyrA*
1059 χρησιμοποιώντας τους ειδικούς εναρκτές (primers) BagyrAR και BagyrAF (Biswas *et*
1060 *al.*, 2006) (Πίνακας). Οι συγκεκριμένοι primers σχεδιάστηκαν έτσι ώστε η γονιδιακή
1061 αλληλουχία που στοχεύουν να περιλαμβάνει την περιοχή QRDR. Το γενωμικό
1062 πολλαπλασιασμό του γονιδίου *gyrA* ακολούθησε sequencing analysis στο προϊόν της
1063 PCR της συγκεκριμένης περιοχής. Προκειμένου να διαπιστωθεί αν οι νουκλεοτιδικές
1064 αλληλουχίες που προέκυψαν φέρουν μεταλλάξεις, συγκρίθηκαν μεταξύ τους αλλά και με
1065 αποθηκευμένες στην GenBank αλληλουχίες, με την χρήση του προγράμματος
1066 CLUSTAL W (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>). Στη συνέχεια, με την χρήση του
1067 προγράμματος DNA TO PROTEIN TRANSLATION
1068 (<http://bio.lundberg.gu.se/edu/translat.html>), οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες του γονιδίου
1069 της γυράσης μεταφράστηκαν σε αλληλουχίες αμινοξέων. Οι αμινοξικές αλληλουχίες που
1070 προέκυψαν συγκρίθηκαν εκ νέου, με την χρήση του προγράμματος CLUSTAL W,
1071 προκειμένου να διαπιστωθεί αν οι μεταλλάξεις σε επίπεδο νουκλεοτιδίων είναι ικανές να
1072 οδηγήσουν σε διαφορετικές αλληλουχίες αμινοξέων και κατ' επέκταση σε διαφορετική
1073 πρωτεϊνική μορφολογία. Οι αλληλουχίες των αμινοξέων συγκρίθηκαν και με τις
1074 αλληλουχίες των στελεχών αναφοράς τόσο των μπαρτονελλών όσο και της *E. coli*. Για
1075 τα στελέχη αναφοράς *B. henselae* (BH10120), *B. quintana* (BQ07850), *B. bacilliformis*
1076 (BARBAKC583_0737) and *Escherichia coli* (JW2225), χρησιμοποιήθηκαν οι ήδη

1077 κατατεθειμένες στη τράπεζα γονιδίων (GenBank) αλληλουχίες αμινοξέων της QRDR
1078 περιοχής.

1079 **2.2.1.6 Στατιστική ανάλυση**

1080 Όλες οι στατιστικές αναλύσεις έγιναν με το Epi info 6 software (Centers for Disease
1081 Control and Prevention, Atlanta, GA, USA).

1082 **ii) Ανθεκτικά στελέχη**

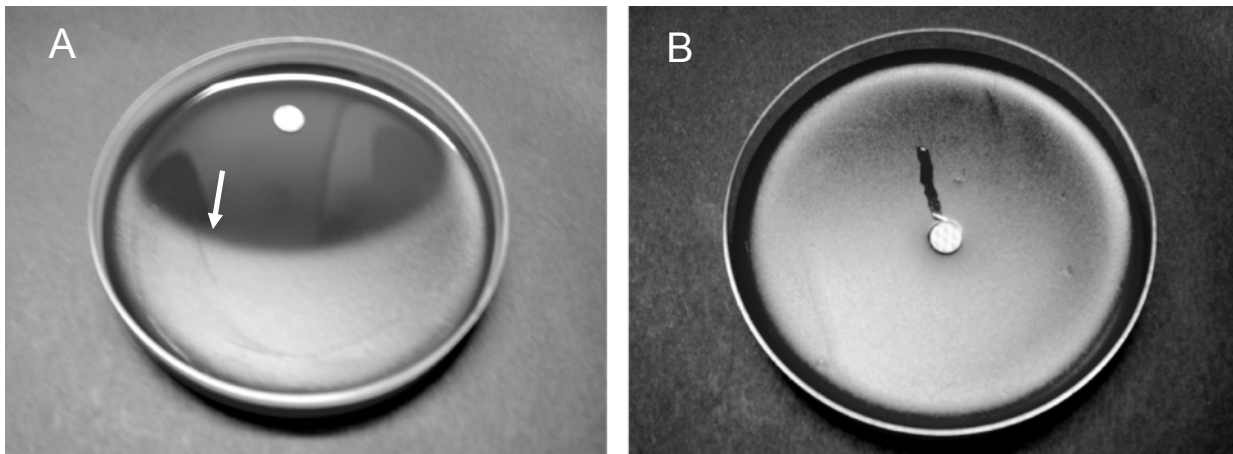
1083 **2.2.1.7 Στελέχη**

1084 Η *B. quintana* και η *B. henselae* χρησιμοποιήθηκαν για τη δημιουργία ανθεκτικών
1085 στελεχών.

1086 **2.2.1.8 Καλλιέργεια-δημιουργία ανθεκτικών στελεχών**

1087 Οι μπαρτονέλλες καλλιεργήθηκαν σε αιματούχο 5% Columbia άγαρ στους 37°C και σε
1088 ατμόσφαιρα 5% CO₂. Για την δημιουργία των ανθεκτικών στελεχών χρησιμοποιήθηκαν
1089 δίσκοι σιπροφλοξασίνης (5 mg). Για την διαδικασία αυτή, τόσο η *B. quintana* όσο και η
1090 *B. henselae* ανακαλλιεργήθηκαν παρουσία δίσκου σιπροφλοξασίνης. Καθώς ο δίσκος της
1091 σιπροφλοξασίνης κάθε φορά δημιουργούσε μια ζώνη αναστολής γύρω του,
1092 χρησιμοποιήθηκαν για ανακαλλιέργεια τα βακτήρια που αναπτύσσονταν πάνω σε αυτή τη
1093 ζώνη. Τα βακτήρια αυτά ήταν πιο ανθεκτικά από τα υπόλοιπα μιας και κατορθώνανε να
1094 αναπτυχθούν παρουσία μεγαλύτερης συγκέντρωσης αντιβιοτικού.

1095 Η διαδικασία αυτή, επαναλήφθηκε, μέχρι τα βακτήρια να μπορούν να αναπτύσσονται
1096 ακόμα και σε επαφή με τον δίσκο της σιπροφλοξασίνης (Εικόνα 14).



1097
1098

Εικόνα 14

1099 A: Ο δίσκος της σιπροφλοξασίνης και η ζώνη αναστολής που προκαλεί. Το βέλος
1100 δείχνει την περιοχή από όπου χρησιμοποιήσαμε τα βακτήρια για την ανακαλλιέργεια.

1101 B: ανθεκτικό στέλεχος που καταφέρνει και αναπτύσσεται ακόμα και σε επαφή με το
1102 δίσκο του αντιβιοτικού.

1103

1104 **2.2.1.9 Προσδιορισμός της ευαισθησίας**

1105 Παράλληλα σε κάθε ανακαλλιέργεια της *B. quintana* και της *B. henselae*
1106 προσδιορίστηκαν και οι MICs για την σιπροφλοξασίνη με την χρήση του E-test (AB
1107 BIODISK -Solna, Sweden).

1108

1109 **2.2.1.10 Εξαγωγή του DNA**

1110 Για την εξαγωγή του DNA, ελήφθη μια αποικία από κάθε ανθεκτικό και ευαίσθητο
1111 στέλεχος μπαρτονέλλας. Στη συνέχεια, η εξαγωγή του DNA έγινε με την χρήση του
1112 QIAamp Tissue kit (QIAGEN, Hilden, Germany), σύμφωνα με τις οδηγίες του
1113 κατασκευαστή. Η διαδικασία έγινε κάτω από στείρες συνθήκες προκειμένου να

1114 αποφευχθεί ο κίνδυνος επιμολύνσεων. Το DNA μέχρι να μελετηθεί αποθηκεύθηκε στους
1115 -20°C.

1116 **2.2.1.11 DNA amplification και sequencing**

1117 Τόσο στα ανθεκτικά, όσο και στα ευαίσθητα στις κινολόνες στελέχη Μπαρτονέλλας,
1118 προχωρήσαμε σε γονιδιακό πολλαπλασιασμό (DNA amplification) των γονιδίων *gyrA*,
1119 *gyrB*, *parC* και *parE*. Για το σκοπό αυτό, δημιουργήθηκαν ειδικά για τις ανάγκες της
1120 μελέτης ειδικοί εναρκτές (primers) που στόχευαν τα συγκεκριμένα γονίδια (Πίνακας 5).
1121 Τον γονιδιακό πολλαπλασιασμό των παραπάνω γονιδίων ακολούθησε ανάλυση της
1122 αλληλουχίας των βάσεων των συγκεκριμένων περιοχών του κάθε γονιδίου (sequencing
1123 analysis). Οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες που προέκυψαν συγκρίθηκαν με την χρήση
1124 του προγράμματος CLUSTAL W, προκειμένου να διαπιστωθεί αν τα ανθεκτικά στελέχη
1125 έφεραν μεταλλάξεις σε σχέση με τα αρχέγονα. Στη συνέχεια, με την χρήση του
1126 προγράμματος DNA TO PROTEIN TRANSLATION μεταφράστηκαν οι νουκλεοτιδικές
1127 αλληλουχίες σε αλληλουχίες αμινοξέων και συγκρίθηκαν εκ νέου για τυχόν αλλαγές σε
1128 αμινοξικό αυτή τη φορά επίπεδο.

Γονίδιο	Primer	Sequence (5'>3')
<i>gyrA</i>	BagyrAR	AAAATCAGGACCAGGAATGATT
	BagyrAF	AGTATTATTGATGAAATGCAAC
<i>gyrB</i>	BagyrAR	CTGAAGTSCGBCCWATTGTT
	BagyrAF	CTGAAGTSCGBCCWATTGTT
<i>parC</i>	BparCF	GATGTRCGTGATGGKTTRAA
	BparCR	GGAAAAGCYCCWGGTAAAACG
<i>parE</i>	BparEF	CAATACGYGATCCTTTCGAT
	BparER	TYCCYCCTTGYGATATTCTG

1129

1130 **Πίνακας 5.** Οι ειδικοί εναρκτές (primers) που χρησιμοποιήθηκαν.

1131

1132

1133

1134

1135

1136

1137

1138

1139 **2.2.2 ΔΕΥΤΕΡΗ ΥΠΟΜΕΛΕΤΗ**

1140 **Ανίχνευση και ταυτοποίηση *Bartonella sp***

1141 **2.2.2.1 Θηλαστικά**

1142 Από τον Ιούνιο μέχρι τον Δεκέμβρη του 2006 χρησιμοποιήθηκαν παγίδες σε διάφορες
1143 επαρχίες του ΛΑΟΣ προκειμένου να συλληφθούν μικρά τρωκτικά. Όλα τα ζώα
1144 φωτογραφήθηκαν και κατόπιν θανατώθηκαν σύμφωνα με τις οδηγίες των τοπικών
1145 υγειονομικών αρχών. Από τα ζώα, αφαιρέθηκαν το ήπαρ και η σπλήνα. Τα δείγματα
1146 τοποθετήθηκαν σε αιθανόλη και στάλθηκαν στο εργαστήριο για εργαστηριακό έλεγχο.

1147

1148 **2.2.2.2 Εξαγωγή του DNA**

1149 Από κάθε δείγμα ιστού (σπλήνα-ήπαρ), έγινε εξαγωγή του DNA με τη χρήση του
1150 QIAamp Tissue kit (QIAGEN, Hilden, Germany), σύμφωνα με τις οδηγίες του
1151 κατασκευαστή. Η διαδικασία έγινε κάτω από στείρες συνθήκες προκειμένου να
1152 αποφευχθεί ο κίνδυνος επιμολύνσεων. Το DNA μέχρι να μελετηθεί αποθηκεύθηκε στους
1153 -20°C.

1154 **2.2.2.3 Εφαρμογή της Real-time (RT) quantitative PCR**

1155 Τα δείγματα ελέγχθηκαν για την ύπαρξη μπαρτονέλλας με την χρήση RT-PCR σε ένα
1156 SmartCycler (Roche Diagnostics GmbH, Germany), χρησιμοποιώντας ειδικούς εναρκτές
1157 (primers) και ανιχνευτή (probe) που στόχευαν το γονίδιο ITS (Πίνακας 6). Σε κάθε
1158 δοκιμασία χρησιμοποιούνταν παράλληλα θετικοί (DNA της *B. elizabethae*) και αρνητικοί
1159 μάρτυρες (απεσταγμένο νερό) για επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων.

Primers	Γονίδιο	Αλληλουχία
BartoITSf	16S-23S rRNA	5'-GGG-GCC-GTA-GCT-CAG-CTG-3'
BartoITSr	16S-23S rRNA	5'-TGA-ATA-TAT-CTT-CAC-AAT-TTC-3'
BartoITS	16S-23S rRNA	6'-FAM-CGA-TCC-CGT-CCG-CTC-CAC-CA-tamra

1160

1161 **Πίνακας 6.** Οι ειδικοί εναρκτές και ο ειδικός ανιχνευτής που χρησιμοποιήθηκαν στην
 1162 RT-PCR.

1163

1164 2.2.2.4 DNA amplification και sequencing

1165 Τα θετικά για την παρουσία μπαρτονέλλας δείγματα, ελέγχθηκαν με τη μέθοδο PCR-
 1166 DNA sequencing του ITS γονιδίου. Στα δείγματα που ανιχνεύθηκαν μπαρτονέλλες, οι
 1167 οποίες δεν είχαν προηγουμένως περιγραφεί (νέα στελέχη), ακολούθησε επιπλέον ένας
 1168 επιπλέον γονιδιακός πολλαπλασιασμός (DNA amplification) και sequencing analysis
 1169 των γονιδίων *gltA* και *rpoB* (La Scola *et al.*, 2003) (Πίνακας 7). Οι φυλογενετικές
 1170 ομοιότητες προσδιορίστηκαν μετά από την σύγκριση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών
 1171 των παραπάνω γονιδίων με το πρόγραμμα MEGA version 3.1 software package.

Γονίδιο	Primer	Αλληλουχία (5>3)
ITS	ITSF	TTCAGATGATGATCCCAA
	ITSR	AACATGTCTGAATATATC
<i>gltA</i>	BgltA1F	TTACTTATGATCCKGGYTTTA
	BgltA2F	GCTATGTCTGCATTCTATCA
	BgltA3F	GCGAATGAAGCGTGCCTAAA
	BgltA2R	AATGCAAAAAGAACAGTAAACA
<i>rpoB</i>	BrpoB1400F	CGCATTGGCTTACTTCGTATG
	BrpoB2300R	GTAGACTGATTAGAACGCTG
	BrpoB1596R	GGACAAATACGACCATAATGCG
	BrpoB2028F	GGAAAATGATGATGCGAATCGTGC
	BrpoB1873R	TCYTCCATMGCWGAMAGATAAA

1172

1173 **Πίνακας 7** . Οι primers που χρησιμοποιήθηκαν για την standard PCR

1174

1175

1176

1177

1178

1179

1180

1181

1182

1183

1184

1185

1186

1187

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1188

1189

1190

1191

1192

1193

1194 **3.1 ΠΡΩΤΗ ΥΠΟΜΕΛΕΤΗ**

1195 **A) Μελέτη της ευαισθησίας στελεχών Μπαρτονέλλας**

1196 **3.1.1 Στελέχη μπαρτονέλλας**

1197 Ελέγχθηκαν 24 στελέχη Μπαρτονελλών. Από αυτά τα 20 στελέχη είχαν απομονωθεί από
1198 άγρια ζώα της Αυστραλίας. Στον Πίνακα 8 παρουσιάζονται τα στελέχη και το είδος του
1199 ζώου από το αίμα του οποίου απομονώθηκαν.

Θυλαστικά	Στελέχη
<i>Macropus giganteus</i>	Nh1, Nh2, Nh3
<i>Rattus tunneyi</i>	Nh4, Nh5
<i>Isoodon macrouris</i>	Nh6, Nh7, Nh19
<i>Rattus fuscipes</i>	Nh8
<i>Uromys caudimaculatus</i>	Nh9
<i>Rattus leucopus</i>	Nh10, Nh15, Nh20
<i>Rattus corniatus</i>	Nh11, Nh14
<i>Melomys</i>	Nh12, Nh18
<i>Unknown</i>	Nh13, Nh16, Nh17

1200

1201 **Πίνακας 8.** Στελέχη μπαρτονέλλας και είδος του θηλαστικού από το οποίο
1202 απομονώθηκαν.

1203

1204

1205 **3.1.2 MICs**

1206 Όλα τα στελέχη μπαρτονέλλας χρειάστηκαν 5-7 μέρες ανάπτυξης προκειμένου να
1207 υπάρξουν εμφανείς αποικίες και να είναι αναγνώσιμη η MIC. Εξαίρεση αποτέλεσε η *B.*
1208 *bacilliformis* που χρειάστηκε 12 μέρες προκειμένου να αναπτυχθεί. Με την μέθοδο E-
1209 test, βρήκαμε ότι οι MICs για τις β-λακταμίνες κυμαίνονταν από 0.004 -0.016 mg/L για
1210 την κεφτριαζόνη και από 0.004 μέχρι 0.03 mg/L για την αμοξισιλίνη. Οι μακρολίδες
1211 βρέθηκαν αρκετά δραστικές κατά των μπαρτονελλών με MICs να κυμαίνονται από 0.008
1212 μέχρι 0.12 mg/L για την αζυθρομυκίνη, από 0.004 μέχρι 0.016 mg/L για την
1213 κλαριθρομυκίνη και από 0.008 μέχρι 0.06 mg/L για την ερυθρομυκίνη. Σε όλα τα
1214 στελέχη, εκτός από ένα (Nh4), οι MICs για την ιμιπενένη κυμάνθηκαν από 0.03 -0.5
1215 mg/L. Στο στέλεχος Nh4 η MIC για την ιμιπενένη ήταν 6 έως 100 φορές μεγαλύτερη από
1216 τα υπόλοιπα στελέχη (3 mg/L). Οι MICs για τις τετρακυκλίνες κυμάνθηκαν από 0.008 -
1217 0.06 mg/L. Οι MICs για την ριφαμπικίνη κυμάνθηκαν από 0.002 -0.06 mg/L, και τέλος
1218 οι MICs για την βανκομυκίνη κυμάνθηκαν από 1-16 mg/L.

1219 Όλα τα στελέχη μπαρτονέλλας, παρουσίασαν διαφορετική ευαισθησία στις δυο
1220 κινολόνες που χρησιμοποιήθηκαν. Έτσι οι MICs για την σιπροφλοξασίνη κυμάνθηκαν
1221 από 0.06–0.5 mg/L με μέσο όρο 0.25 mg/L, ενώ οι MICs για την οφλοξασίνη ήταν
1222 μεγαλύτερη, με μέσο όρο 2 mg/L και εύρος 0.5–4 mg/L. Στατιστική ανάλυση έδειξε ότι
1223 το αποτέλεσμα ήταν στατιστικά σημαντικό ($p= 0.005$). Στον πίνακα 9 παρουσιάζονται οι
1224 αναλυτικές τιμές των MICs που παρουσίασαν τα 24 στελέχη που συμπεριλήφθηκαν στην
1225 μελέτη απέναντι στα 11 αντιβιοτικά που εξετάστηκαν.

Strain	Source	Antimicrobial agent										
		AMX	CEF	AZI	CLA	ERY	TET	IMP	VAN	RIF	OFL	CIP
Nh1	<i>Macropus giganteus</i>	0.004	0.004	0.016	0.016	0.032	0.032	0.032	2	0.004	1.5	0.25
Nh2	<i>Macropus giganteus</i>	0.008	0.008	0.023	0.016	0.016	0.064	0.032	3	0.012	2	0.38
Nh3	<i>Macropus giganteus</i>	0.008	0.008	0.016	0.008	0.023	0.032	0.047	2	0.003	1.5	0.19
Nh4	<i>Rattus tuneyi</i>	0.016	0.016	0.016	0.008	0.023	0.032	3	4	0.032	4	0.38
Nh5	<i>Rattus tuneyi</i>	0.004	0.008	0.008	0.016	0.016	0.008	0.125	16	0.002	1	0.25
Nh6	<i>Isoodon macrouris</i>	0.008	0.004	0.016	0.004	0.016	0.016	0.032	3	0.002	0.75	0.19
Nh7	<i>Isoodon macrouris</i>	0.008	0.008	0.016	0.008	0.008	0.023	0.064	2	0.002	0.75	0.125
Nh8	<i>Rattus fuscipes</i>	0.008	0.004	0.047	0.016	0.032	0.047	0.5	6	0.004	1.5	0.25
Nh9	<i>Uromys caudimaculatus</i>	0.008	0.008	0.032	0.016	0.047	0.047	0.125	6	0.032	3	0.25
Nh10	<i>Rattus leucopus</i>	0.023	0.016	0.023	0.016	0.016	0.032	0.19	16	0.012	2	0.25
Nh11	<i>Rattus cornuatus</i>	0.008	0.016	0.047	0.016	0.032	0.032	0.38	16	0.012	1.5	0.19
Nh12	<i>Melomys</i>	0.008	0.008	0.032	0.016	0.023	0.047	0.25	6	0.008	2	0.25
Nh13	unknown	0.008	0.004	0.023	0.016	0.023	0.032	0.094	6	0.008	2	0.38
Nh14	<i>Rattus cornuatus</i>	0.004	0.016	0.016	0.004	0.047	0.008	0.064	6	0.008	1.5	0.5
Nh15	<i>Rattus leucopus</i>	0.008	0.008	0.016	0.008	0.016	0.032	0.25	6	0.004	1.5	0.25
Nh16	unknown	0.004	0.004	0.016	0.008	0.016	0.016	0.25	6	0.004	1.5	0.125
Nh17	unknown	0.008	0.008	0.016	0.008	0.016	0.023	0.25	8	0.006	1.5	0.19
Nh18	<i>Melomys</i>	0.016	0.016	0.023	0.008	0.064	0.032	0.125	6	0.016	1.5	0.19
Nh19	<i>Isoodon macrouris</i>	0.016	0.016	0.064	0.004	0.016	0.008	0.064	3	0.002	0.5	0.064
Nh20	<i>Rattus leucopus</i>	0.004	0.004	0.008	0.004	0.016	0.008	0.75	1.5	0.064	2	0.25
BhM	<i>B. henselae</i> strain Marseille	0.016	0.008	0.016	0.008	0.016	0.016	0.5	4	0.002	4	0.38
BhH	<i>B. henselae</i> strain Houston	0.016	0.008	0.016	0.008	0.016	0.032	0.5	3	0.002	4	0.38
Bb	<i>B. bacilliformis</i>	0.016	0.008	0.016	0.008	0.016	0.016	0.094	12	0.006	1.5	0.25
BqO	<i>B. quintana</i> strain Oklahoma	0.016	0.008	0.008	0.008	0.016	0.016	0.5	6	0.002	3	0.19

Abbreviations: AMX, amoxicillin; CEF, ceftriaxone; AZI, azithromycin; CLA, clarithromycin; ERY, erythromycin; TET, tetracycline; IMP, imipenem; VAN, vancomycin; RIF, rifampicin; OFL, ofloxacin; CIP, ciprofloxacin.

1226

1227 **Πίνακας 9.** Αναλυτικές τιμές των MIC που παρουσίασαν τα 24 στελέχη μπαρτονελλών
1228 έναντι των 11 αντιβιοτικών που εξετάστηκαν. (Angelakis *et al.*, 2008a)

1229

1230 **B) Διερεύνηση της αιτίας που οδηγεί σε ποικιλόμορφη αντίδραση των**
1231 **Μπαρτονελλών στις κινολόνες**

1232 **3.1.3 Προσδιορισμός της γονιδιακής αλληλουχίας της QRDR της γυράσης**

1233 Οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες της QRDR περιοχής της γυράσης -που προέκυψαν από
1234 την sequencing analysis- για τα 24 στελέχη μπαρτονελλών συγκρίθηκαν για τις μεταξύ
1235 τους ομοιότητες με το πρόγραμμα CLUSTAL W και τα αποτελέσματα φαίνονται στην
1236 εικόνα 15.

```

E. henselae      GTTATGGGGAAAATTTCCATCCCTCATGGAGATGCTTCGATTACGATGCTTTGGTGGGTATG 300
E. quintana     GTTATGGGGAAAATTTCCATCCCTCATGGAGATGCTTCGATTACGATGCTTTGGTGGGTATG 299
E. bacilliformis GTGATGGGAAAATTTCCATCCCTCATGGTGTGATGCTTCAATTTATGATGCTTTGGTGGGTATG 300
Nh20            GTTATGGGGAAAATTTCCATCCCCATGGTGTGATGCTTCAATTTATGATGCTTTAGTGGGTATG 176
Nh18            GTTATGGGGAAAATTTCCACCCCCATGGTGTGATGCTTCAATTTATGATGCTTTGGTGGGTATG 176
Nh9             GTTATGGGGAAAATTTCCACCCCCATGGTGTGATGCTTCAATTTATGATGCTTTGGTGGGTATG 177
Nh13            GTCATGGGGAAAATTTCCATCCCCATGGTGTGATGCTTCAATTTATGATGCTTTAGTGGGTATG 202
Nh14            GTCATGGGGAAAATTTCCATCCCCATGGTGTGATGCTTCAATTTATGATGCTTTAGTGGGTATG 178
Nh10            GTCATGGGGAAAATTTCCATCCCCATGGTGTGATGCTTCAATTTATGATGCTTTAGTGGGTATG 216
Nh2             GTCATGGGGAAAATTTCCATCCACATGGAGATGCTTCAATTTATGATGCTTTAGTGGGTATG 139
Nh4             GTCATGGGGAAAATTTCCACCCCCATGGTGTGATGCTTCAATTTATGATGCTTTGGTGGGTATG 198
Nh1             GTTATGGGGAAAATTTCCATCCCCATGGTGTGATGCTTCAATTTATGATGCTTTGGTGGGTATG 168
Nh7             GTTATGGGGAAAATTTCCATCCCCATGGTGTGATGCTTCAATTTATGATGCTTTGGTGGGTATG 138
Nh19            GTTATGGGGAAAATTTCCATCCCCATGGTGTGATGCTTCAATTTATGATGCTTTGGTGGGTATG 138
Nh11            GTTATGGGGAAAATTTCCATCCCCATGGTGTGATGCTTCAATTTATGATGCTTTGGTGGGTATG 174
Nh15            GTTATGGGGAAAATTTCCATCCCCATGGTGTGATGCTTCAATTTATGATGCTTTGGTGGGTATG 180
Nh5             GTTATGGGGAAAATTTCCATCCCCATGGTGTGATGCTTCAATTTATGATGCTTTGGTGGGTATG 202
Nh3             GTTATGGGGAAAATTTCCATCCCCATGGTGTGATGCTTCAATTTATGATGCTTTGGTGGGTATG 202
Nh8             GTTATGGGGAAAATTTCCATCCCCATGGTGTGATGCTTCAATTTATGATGCTTTGGTGGGTATG 205
Nh6             GTTATGGGGAAAATTTCCATCCCCATGGTGTGATGCTTCAATTTATGATGCTTTGGTGGGTATG 171
Nh12            GTTATGGGGAAAATTTCCATCCCCATGGTGTGATGCTTCAATTTATGATGCTTTGGTGGGTATG 174
Nh16            GTTATGGGGAAAATTTCCATCCCCATGGTGTGATGCTTCAATTTATGATGCTTTGGTGGGTATG 174
Nh17            GTTATGGGGAAAATTTCCATCCCCATGGTGTGATGCTTCAATTTATGATGCTTTGGTGGGTATG 207
E. coli         GTAATCGGTAAATACCATCCCATGGTGTGACTCGGCGGTCTATGACACGATGCTCCGCATG 276
* * * * *

```

```

E. henselae      GCACAGGATTTTCTTTACGGAAATCCATTGATTGATGGTCAAGGAAAATTTTGGTTCTGTT 360
E. quintana     GCTCAGGATTTCTCTTTACGAAATCCATTGATTGATGGTCAAGGAAAATTTTGGTTCTGTT 359
E. bacilliformis GCACAGGATTTTCTTTACGAAATCCCTCTGATTGATGGACAGGAAAATTTTGGTCTGTT 360
Nh20            GCACAGGATTTCTCTTTGAGAAAATCCACTGATTGATGGTCAAGGAAAATTTTGGTTCTGTT 236
Nh18            GCACAGGATTTTCTTTACGGAAATCCATTGATTGATGGTCAAGGAAAATTTTGGTTCTGTT 236
Nh9             GCACAGGATTTCTCTTTAAGAAAATCCACTGATTGATGGTCAAGGAAAATTTTGGTTCTGTT 237
Nh13            GCACAGGACTTTTCTTTAAGAAAATCCACTGATTGATGGTCAAGGAAAATTTTGGTTCTGTT 262
Nh14            GCACAGGACTTTTCTTTAAGAAAATCCACTGATTGATGGTCAAGGAAAATTTTGGTTCTGTT 237
Nh10            GCACAGGACTTTTCTTTAAGAAAATCCACTGATTGATGGTCAAGGAAAATTTTGGTTCTGTT 276
Nh2             GCACAGGATTTTCTTTAAGAAAATCCATTGATTGATGGTCAAGGAAAATTTTGGTTCTGTT 199
Nh4             GCACAGGATTTCTCTTTAAGAAAATCCACTGATTGATGGTCAAGGAAAATTTGGGTTCTATT 258
Nh1             GCACAGGATTTTCTTTACGGAAATCCATTGATTGATGGTCAAGGAAAATTTTGGTTCTGTT 228
Nh7             GCGCAGGACTTCTCTTTGAGAAAATCCATTGATTGATGGACAAGGAAAATTTTGGTTCTGTT 198
Nh19            GCGCAGGACTTCTCTTTGAGAAAATCCATTGATTGATGGACAAGGAAAATTTTGGTTCTGTT 198
Nh11            GCGCAGGACTTCTCTTTGAGAAAATCCATTGATTGATGGACAAGGAAAATTTTGGTTCTGTT 234
Nh15            GCGCAGGACTTCTCTTTGAGAAAATCCATTGATTGATGGACAAGGAAAATTTTGGTTCTGTT 240
Nh5             GCGCAGGACTTCTCTTTGAGAAAATCCATTGATTGATGGACAAGGAAAATTTTGGTTCTGTT 262
Nh3             GCGCAGGACTTCTCTTTGAGAAAATCCATTGATTGATGGACAAGGAAAATTTTGGTTCTGTT 262
Nh8             GCGCAGGACTTCTCTTTGAGAAAATCCATTGATTGATGGACAAGGAAAATTTTGGTTCTGTT 265
Nh6             GCGCAGGACTTCTCTTTGAGGAAATCCATTGATTGATGGACAAGGAAAATTTTGGTTCTGTT 231
Nh12            GCGCAGGACTTCTCTTTGAGGAAATCCATTGATTGATGGACAAGGAAAATTTTGGTTCTGTT 234
Nh16            GCGCAGGACTTCTCTTTGAGGAAATCCATTGATTGATGGACAAGGAAAATTTTGGTTCTGTT 234
Nh17            GCGCAGGACTTCTCTTTGAGGAAATCCATTGATTGATGGACAAGGAAAATTTTGGTTCTGTT 267
E. coli         GCGCAGCATTCTCGTGCCTTATATGCTGGTAGACGGTCAAGGTAACCTTCGGTTCTATC 336
* * * * *

```

1237

1238 **Εικόνα 15** Οι γονιδιακές αλληλουχίες της QRDR περιοχής της γυράσης για τα 24
1239 στελέχη μπαρτονέλλας που μελετήθηκαν, ταξινομημένες από το πρόγραμμα CLUSTAL
1240 W. Τα αστέρια αντιστοιχούν στα σημεία που οι αλληλουχίες είναι όμοιες.


1241

1242 Όπως προκύπτει από την εικόνα 15, οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες της QRDR περιοχής
1243 της γυράσης διέφεραν αρκετά μεταξύ τους. Προκειμένου να διαπιστωθεί αν αυτές οι

1244 αλλαγές σε επίπεδο νουκλεοτιδίων ήταν ικανές να οδηγήσουν σε διαφορετικές
 1245 αλληλουχίες αμινοξέων και κατ' επέκταση σε διαφορετική πρωτεϊνική μορφολογία, οι
 1246 νουκλεοτιδικές αλληλουχίες μεταφράστηκαν σε αλληλουχίες αμινοξέων και
 1247 συγκρίθηκαν. Τα αποτελέσματα φαίνονται στην εικόνα 16 .

Fluoroquinolones and *Bartonella*

<i>B. henselae</i>	NEMGLSFNKPYRKSAGVVGEVMGKFHHPHGD	<u>A</u> SIYDALVRMAQDFSLRNPLIDGQGNFGSV
<i>B. quintana</i>	NEMGLAFNKPYRKSAGVVGEVMGKFHHPHGD	<u>A</u> SIYDALVRMAQDFSLRNPLIDGQGNFGSV
<i>B. bacilliformis</i>	NEMGLLFNKPYRKSAGVVGEVMGKFHHPHGD	<u>A</u> SIYDALVRMAQDFSLRNPLIDGQGNFGSV
Nh1	NEMGLSFNKPYRKSAGVVGEVMGKFHHPHGD	<u>A</u> SIYDALVRMAQDFSLRNPLIDGQGNFGSV
Nh4	NEMGLSFNKPYRKSAGVVGEVMGKFHHPHGD	<u>A</u> SIYDALVRMAQDFSLRNPLIDGQGNLGS
Nh20	NEMGLSFNKPYRKSAGVVGEVMGKFHHPHGD	<u>A</u> SIYDALVRMAQDFSLRNPLIDGQGNFGSV
Nh15	NEMGLVFNKPYRKSAGVVGEVMGKFHHPHGD	<u>A</u> SIYDALVRMAQDFSLRNPLIDGQGNFGSV
Nh6	NEMGLVFNKPYRKSAGVVGEVMGKFHHPHGD	<u>A</u> SIYDALVRMAQDFSLRNPLFDGQGNFGSV
Nh19	NEMGLVFNKPYRKSAGVVGEVMGKFHHPHGD	<u>A</u> SIYDALVRMAQDFSLRNPLFDGQGNFGSV
Nh11	NEMGLVFNKPYRKSAGVVGEVMGKFHHPHGD	<u>A</u> SIYDALVRMAQDFSLRNPLIDGQGNFGSV
Nh8	NEMGLVFNKPYRKSAGVVGEVMGKFHHPHGD	<u>A</u> SIYDALVRMAQDFSLRNPLIDGQGNFGSV
Nh10	NEMGLSFNKPYRKSAGVVGEVMGKFHHPHGD	<u>A</u> SIYDALVRMAQDFSLRNPLIDGQGNFGSV
Nh16	NEMGLVFNKPYRKSAGVVGEVMGKFHHPHGD	<u>A</u> SIYDALVRMAQDFSLRNPLIDGQGNFGSV
Nh12	NEMGLVFNKPYRKSAGVVGEVMGKFHHPHGD	<u>A</u> SIYDALVRMAQDFSLRNPLIDGQGNFGSV
Nh3	NEMGLVFNKPYRKSAGVVGEVMGKFHHPHGD	<u>A</u> SIYDALVRMAQDFSLRNPLIDGQGNFGSV
Nh5	NEMGLVFNKPYRKSAGVVGEVMGKFHHPHGD	<u>A</u> SIYDALVRMAQDFSLRNPLIDGQGNFGSV
Nh7	NEMGLVFNKPYRKSAGVVGEVMGKFHHPHGD	<u>A</u> SIYDALVRMAQDFSLRNPLIDGQGNFGSV
Nh17	NEMGLVFNKPYRKSAGVVGEVMGKFHHPHGD	<u>A</u> SIYDALVRMAQDFSLRNPLIDGQGNLGS
Nh20	NEMGLSFNKPYRKSAGVVGEVMGKFHHPHGD	<u>A</u> SIYDALVRMAQDFSLRNPLIDGQGNFGSV
Nh18	NEMGLSFNKPYRKSAGVVGEVMGKFHHPHGD	<u>A</u> SIYDALVRMAQDFSLRNPLIDGQGNFGSV
Nh1	NEMGLSFNKPYRKSAGVVGEVMGKFHHPHGD	<u>A</u> SIYDALVRMAQDFSLRNPLIDGQGNFGSV
Nh9	NEMGLSFNKPYRKSAGVVGEVMGKFHHPHGD	<u>A</u> SIYDALVRMAQDFSLRNPLIDGQGNFGSV
Nh14	NEMGLSFNKPYRKSAGVVGEVMGKFHHPHGD	<u>A</u> SIYDALVRMAQDFSLRNPLIDGQGNLVL
<i>E. coli</i>	NVLGNDWNKAYKKSARVVDVIGKYHHPHGD	<u>S</u> AVYDTIVRMAQPFSLRYMLVDGQGNFGSI
	* * * * *	* * * * *

Ser-83  Ala

1248

1249

1250 **Εικόνα 16.** Οι αμινοξικές αλληλουχίες της QRDR περιοχής της γυράσης για τις 24
 1251 Μπαρτονέλλες που μελετήθηκαν ταξινομημένες από το πρόγραμμα CLUSTAL W. Οι
 1252 αστερίσκοι αντιστοιχούν στα σημεία που οι αλληλουχίες είναι όμοιες.

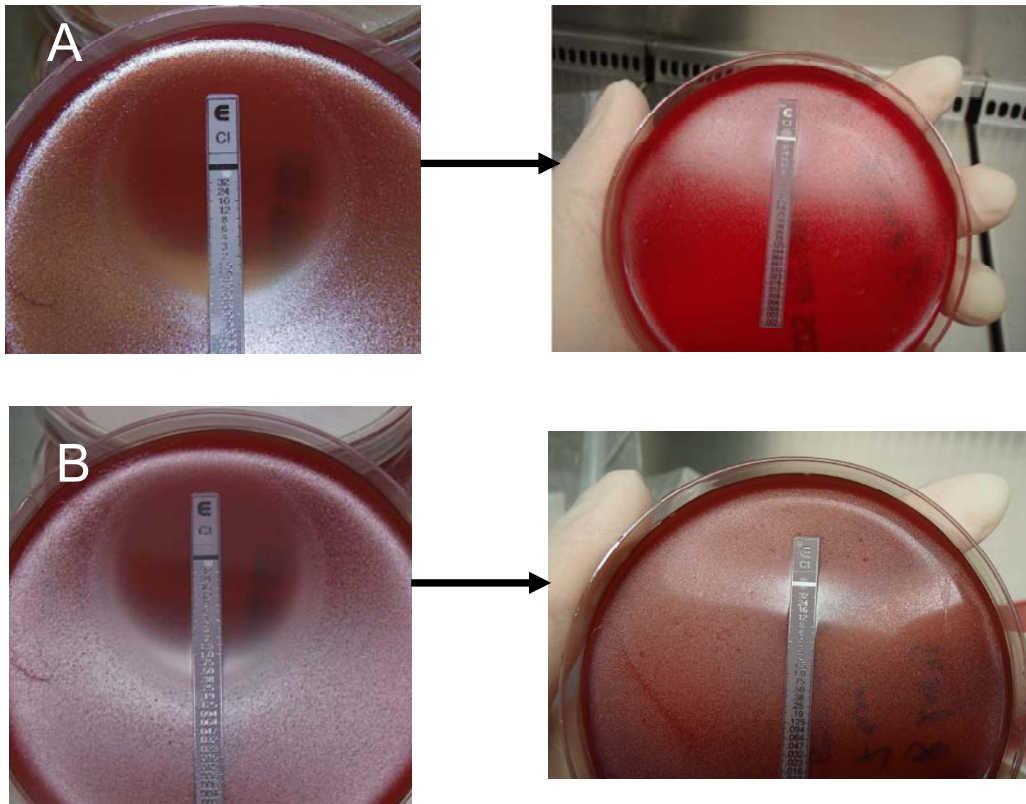
1253

1254 Από την σύγκριση αυτή βρέθηκε ότι όλες οι μπαρτονέλλες (στελέχη αναφοράς και
 1255 στελέχη που απομονώθηκαν από την φύση) έφεραν μια φυσική μετάλλαξη στην θέση 83

1256 της QRDR περιοχής της γυράσης (αρίθμηση με βάση την QRDR της *E. coli*). Στην θέση
1257 αυτή η σερίνη, η οποία υπάρχει σε όλα τα ευαίσθητα στις κινολόνες βακτήρια, είχε
1258 αντικατασταθεί από μια αλανίνη (Ser83Ala).

1259 3.1.4 Ανάπτυξη ανθεκτικών στις κινολόνες στελεχών Μπαρτονέλλας

1260 Με την μέθοδο των ανακαλλιιεργιών που χρησιμοποιήσαμε προκειμένου να αναπτύξουμε
1261 in vitro ανθεκτικά στελέχη *B. henselae* και *B. quintana* στην σιπροφλοξασίνη, η *B.*
1262 *henselae* έγινε ανθεκτική μετά από 4 ανακαλλιέργειες και η *B. quintana* μετά από 5. Και
1263 για τα δυο στελέχη η MIC τους απέναντι στην σιπροφλοξασίνη αυξήθηκε από 0.38 σε
1264 μεγαλύτερη από 45mg/L (Εικόνα 17).



1265 **Εικόνα 17:** Προσδιορισμός της MIC με την μέθοδο του E-test για τα ευαίσθητα και τα
1266 ανθεκτικά στελέχη της *B. henselae* (A) και *B. quintana* (B).
1267

1268

1269 Η σύγκριση των αμινοξικών αλληλουχιών της QRDR περιοχής της γυράσης με το
1270 πρόγραμμα CLUSTAL W για τις ευαίσθητες και τις ανθεκτικές Μπαρτονελλες έδειξε
1271 μια αντικατάσταση αμινοξέος στην θέση 87 (βάση της QRDR της *E. coli*). Στη θέση
1272 αυτή και για τα δυο ανθεκτικά στελέχη το Asp (ασπαρτικό οξύ) έγινε Asn (ασπαραγίνη)
1273 (Asp87Asn) (Εικόνα 18)

```
Bh.resist  GKFFHPHGDAIYNALVRMAQDFSLRNPLIDGQGNFGSVVDGPPAAMRYTECRLEKVSEEL 120  
Bh.sensit  GKFFHPHGDAIYDALVRMAQDFSLRNPLIDGQGNFGSVVDGPPAAMRYTECRLEKVSEEL 120  
*****:*****
```

```
Bq.resist  NEMGLAFNKPYRKSAGVVGEVMGKFFHPHGDAIYNALVRMAQDFSLRNPLIDGQGNFGSV 120  
Bq.sensit  NEMGLAFNKPYRKSAGVVGEVMGKFFHPHGDAIYDALVRMAQDFSLRNPLIDGQGNFGSV 120  
*****:*****
```

1274

1275 **Εικόνα 18**

1276 Τα ανθεκτικά στη σιπροφλοξασίνη στελέχη αναφοράς *B. henselae* και *B. quintana*
1277 έφεραν δεύτερη μετάλλαξη στη θέση που αντιστοιχεί στην αμινοξική θέση 87 της QRDR
1278 περιοχής της γυράσης. Τα ανθεκτικά στελέχη έφεραν στη θέση του Asp (ασπαρτικό οξύ)
1279 το αμινοξύ Asn (ασπαραγίνη) (Asp87Asn). Τα αστέρια αντιστοιχούν στα σημεία που οι
1280 αλληλουχίες είναι όμοιες.

1281

1282

1283

1284

1285 Αντίστοιχες συγκρίσεις των αμινοξικών αλληλουχιών που κωδικοποιούν τα γονίδια
 1286 *gyrB*, *parC* και *parE* δεν έδειξε την ύπαρξη διαφορών (Εικόνες 19, 20 και 21
 1287 αντίστοιχα).

```

Bh.sensit  IVENLVNEGLSAWLEEHHPNEAKIVTSKVVEAAAAAREAAARKARELTRRKGALDITSLPGKL 60
Bh.resist  IVENLVNEGLSAWLEEHHPNEAKIVTSKVVEAAAAAREAAARKARELTRRKGALDITSLPGKL 60
*****

Bh.sensit  ADCQERDPAKSEIFIVEGDSAGGSAKSGRSRQNQAILPLRGKILNVERARFDRMLSSDMI 120
Bh.resist  ADCQERDPAKSEIFIVEGDSAGGSAKSGRSRQNQAILPLRGKILNVERARFDRMLSSDMI 120
*****

Bh.sensit  GTLITALGTSIGKDEFSPDKLRYHKIIIMTDADVDGAHIRTLLLTFFFRQMPELIERGHL 180
Bh.resist  GTLITALGTSIGKDEFSPDKLRYHKIIIMTDADVDGAHIRTLLLTFFFRQMPELIERGHL 180
*****

Bq.resist  IVENLVNEGLSAWLEEHHPSEAKIVTSKVVEAATAAREAARKARELTRRKGALDITSLPGKL 60
Bq.sensit  IVENLVNEGLSAWLEEHHPSEAKIVTSKVVEAATAAREAARKARELTRRKGALDITSLPGKL 60
*****

Bq.resist  ADCQERDPAKSEIFIVEGDSAGGSAKSGRSRQNQAILPLRGKILNVERARFDRMLSSDMI 120
Bq.sensit  ADCQERDPAKSEIFIVEGDSAGGSAKSGRSRQNQAILPLRGKILNVERARFDRMLSSDMI 120
*****

Bq.resist  GTLITALGTSIGKDEFSPDKLRYHKIIIMTDADVDGAHIRTLLLTFFFRQMPELIERGHL 180
Bq.sensit  GTLITALGTSIGKDEFSPDKLRYHKIIIMTDADVDGAHIRTLLLTFFFRQMPELIERGHL 180
*****

```

1288

1289

1290 **Εικόνα 19**

1291 Οι αμινοξικές αλληλουχίες της *gyrB* περιοχής της γυράσης για τα ανθεκτικά στη
 1292 σιπροφλοξασίνη στελέχη αναφοράς *B. henselae* και *B. quintana*. Τα αστέρια
 1293 αντιστοιχούν στα σημεία που οι αλληλουχίες είναι όμοιες.

1294

1295

```

Bh.sensit    KPVHRRIVHAMRLLKLNPGHSYAKCARIVGDVMGKFHHPHGDASIYDALVRLAQNFVRYP 60
Bh.resist    KPVHRRIVHAMRLLKLNPGHSYAKCARIVGDVMGKFHHPHGDASIYDALVRLAQNFVRYP 60
*****

Bh.sensit    LVDGQGNFGNIDGDNAAAMRYTEARMTEVTALLLEGINENAIIDFRRLTYNEEDEEPIVL 118
Bh.resist    LVDGQGNFGNIDGDNAAAMRYTEARMTEVTALLLEGINENAIIDFRRLTYNEEDEEPIVL 118
*****

Bq.sensit    KPVHRRIVHAMRLLKLNPEQSYAKCARIVGDVMGKFHHPHGDASIYDALVRLAQSFVRYP 60
Bq.resist    KPVHRRIVHAMRLLKLNPEQSYAKCARIVGDVMGKFHHPHGDASIYDALVRLAQSFVRYP 60
*****

Bq.sensit    LVDGQGNFGNIDGDNAAAMRYTEARMTEVAALLLEGINENAIIDFRRLTYNEEDEEPPVVL 118
Bq.resist    LVDGQGNFGNIDGDNAAAMRYTEARMTEVAALLLEGINENAIIDFRRLTYNEEDEEPPVVL 118
*****

```

1296

1297

1298

Εικόνα 20.

1299

1300

1301

1302

Οι αμινοξικές αλληλουχίες της *parC* περιοχής της τοποισομεράσης IV για τα ανθεκτικά στη σιπροφλοξασίνη στελέχη αναφοράς *B. henselae* και *B. quintana*. Τα αστέρια αντιστοιχούν στα σημεία που οι αλληλουχίες είναι όμοιες.

```

Bh.resist    MSDKNKDLFSILNNAQFSINIKENKLSPLSLSSEAANSRKDTQENDYNALSIRVLEGLEPV 60
Bh.sensit    MSDKNKDLFSILNNAQFSINIKENKLSPLSLSSEAANSRKDTQENDYNALSIRVLEGLEPV 60
*****

Bh.resist    RLRPGMYIGGTDSKALHHLFAEIIDNAMDEAVAGYADFDVSLKNGYLTVTDNNGRGIPV 120
Bh.sensit    RLRPGMYIGGTDSKALHHLFAEIIDNAMDEAVAGYADFDVSLKNGYLTVTDNNGRGIPV 120
*****

Bh.resist    ENHPQMPGKSTLEVIMTQLHSGGKFDGKAYQTAGGLHGVGISVNVNALS DYMEVEVARERK 180
Bh.sensit    ENHPQMPGKSTLEVIMTQLHSGGKFDGKAYQTAGGLHGVGISVNVNALS DYMEVEVARERK 180
*****

Bq.resist    MSDKNKDLFSILNKAQSQINTKEKNLKPKSTSSEVMTSKKDTQEDNYNALSIRVLKGLEPV 60
Bq.sensit    MSDKNKDLFSILNKAQSQINTKEKNLKPKSTSSEVMTSKKDTQEDNYNALSIRVLKGLEPV 60
*****

Bq.resist    RLRPGMYIGGTDSKALHHLFAEIIDNAMDEAVAGYADLIDVSLERNGYLTVTDNNGRGIPV 120
Bq.sensit    RLRPGMYIGGTDSKALHHLFAEIIDNAMDEAVAGYADLIDVSLERNGYLTVTDNNGRGIPV 120
*****

Bq.resist    ENHPQMLDKSTLEVIMTQLHSGGKFDGKAYQTAGGLHGVGISVNVNALSDDMEVEVARERK 180
Bq.sensit    ENHPQMLDKSTLEVIMTQLHSGGKFDGKAYQTAGGLHGVGISVNVNALSDDMEVEVARERK 180
*****

```

1303

1304

Εικόνα 21

1305

1306

1307

Οι αμινοξικές αλληλουχίες της *parE* περιοχής της τοποισομεράσης IV για τα ανθεκτικά στη σιπροφλοξασίνη στελέχη αναφοράς *B. henselae* και *B. quintana*. Τα αστέρια αντιστοιχούν στα σημεία που οι αλληλουχίες είναι όμοιες.

1308

1309 3.2 ΔΕΥΤΕΡΗ ΥΠΟΜΕΛΕΤΗ

1310 3.2.1 Ανίχνευση και ταυτοποίηση *Bartonella* sp. σε φυσικούς ξενιστές.

1311 Για την επιδημιολογική έρευνα για την ύπαρξη *Bartonella* sp. σε φυσικούς ξενιστές

1312 ελέχθηκαν συνολικά 568 δείγματα (311 ήπαρ και 257 σπλήνα) από 310 τρωκτικά που

1313 συνελήφθησαν σε 4 επαρχίες του Λάος (εικόνα 22).

1314



1315

1316 **Εικόνα 22** : Περιοχές σύλληψης των τρωκτικών

1317

1318

1319 Σε 128 από τα παραπάνω δείγματα (22.5%), τα οποία αντιστοιχούσαν σε 79 τρωκτικά
1320 (25.5%), ανιχνεύτηκε *Bartonella sp* με την χρήση της RT-PCR. Οι θετικοί και
1321 αρνητικοί μάρτυρες έδωσαν τα αναμενόμενα αποτελέσματα.
1322 Με την εφαρμογή standard PCR και sequencing analysis στοχεύοντας το γονίδιο ITS,
1323 χαρακτηρίστηκαν 5 διαφορετικά είδη μπαρτονελλών στο σύνολο των θετικών
1324 δειγμάτων: *B. phoceensis*, *B. elizabethae* και *B. tribocorum*, Lao/Nh1 και Lao/Nh2.
1325 Τα 3 είδη *B. phoceensis*, *B. elizabethae* και *B. tribocorum* έχουν προηγουμένως
1326 περιγραφεί. Η νουκλεοτιδική αλληλουχία των δυο ειδών μπαρτονέλλας Lao/Nh1 και
1327 Lao/Nh2 δεν ταίριαζε με τα ήδη υπάρχοντα είδη. Πρόκειται για νέα είδη. Τα δυο αυτά
1328 στελέχη ονομάστηκαν Lao/Nh1 και Lao/Nh2. Συνοπτικά τα αποτελέσματα φαίνονται
1329 στον πίνακα 10.
1330

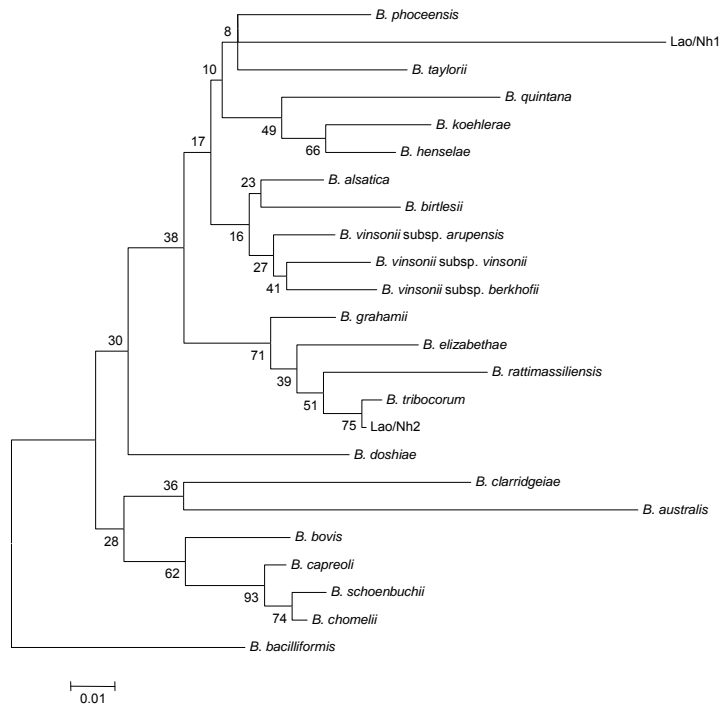
Location % rodents with <i>Bartonellae</i>	Rodent Species	Spleen/Liver	Bartonella	% all rodents with <i>Bartonella</i>
Vientiane City 15.5 %	<i>Rattus rattus</i>	79/77	<i>B. phoceensis</i> (1), <i>B. elizabethae</i> (2), <i>B. tribocorum</i> (2) and Lao/Nh2 (3)	10.1 %
	<i>R. exulans</i>	23/23	<i>B. elizabethae</i> (1), <i>B. phoceensis</i> (1) and <i>B. tribocorum</i> (5)	30.4 %
	<i>Mus cervicolor</i>	6/6	Lao/Nh2 (1)	16.7 %
	<i>Mus caroli</i>	2/2	<i>B. phoceensis</i> (1)	50 %
Luang Prabang 11.2 %	<i>R. rattus</i>	141/139	<i>B. elizabethae</i> (4), <i>B. phoceensis</i> (8), Lao/Nh2 (8), Lao/Nh1 (1)	9.1 %
		2	Lao/Nh2 (1)	50 %
	<i>B. indica</i>	2	0	0
	<i>M. caroli</i>	1	0	0
Champasak 12.4 %	<i>M. cervicolor</i>	64/65	0	0
	<i>R. rattus</i>	1/1	0	0
	<i>R. exulans</i>	56/56	<i>B. phoceensis</i> (2), <i>B. elizabethae</i> (1), <i>B. tribocorum</i> (1) and Lao/Nh2 (6)	17.9 %
	Other	2/2	0	0
Luang Nam Tha 19.2 %	<i>R. rattus</i>	160/159	<i>B. phoceensis</i> (11), <i>B. elizabethae</i> (2), <i>B. tribocorum</i> (3), Lao/Nh1 (5) and Lao/ Nh2 (11)	20.1 %
	<i>R. argentiventer</i>	1/1	0	0
	Other	5/6	0	0
	<i>B. savilei</i>	1/1	0	0
	<i>R. exulans</i>	1/1	0	0

1331

1332 **Πίνακας 10.** Αποτελέσματα ανά επαρχία όπου φαίνονται ο αριθμός και το είδος των
1333 τρωκτικών που συνελήφθησαν, καθώς και τα είδη των μπαρτονελλών που ανιχνεύτηκαν
1334

1335

1336 Το φυλογενετικό δέντρο που προέκυψε από τις αλληλουχίες του ITS γονιδίου των
1337 Lao/Nh1 και Lao/Nh2 σε σύγκριση με τις γνωστές ακολουθίες, έδειξε ότι οι Lao/Nh1 και
1338 Lao/Nh2 μάλλον αποτελούν νέα είδη (εικόνα 23).



1339

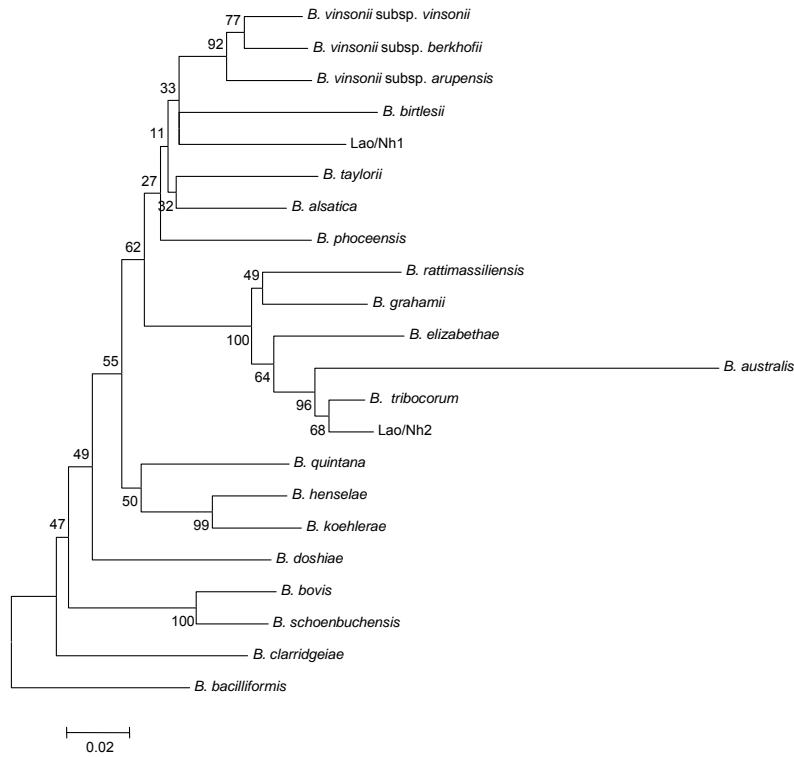
1340

1341 **Εικόνα 23.** Φυλογενετικό δέντρο βασισμένο στο ITS γονίδιο.

1342

1343 Βασισμένοι στην πρόταση του La Scola ότι για να χαρακτηριστεί μια Μπαρτονέλλα ως
1344 νέο είδος θα πρέπει μια γονιδιακή αλληλουχία 327 βάσεων από το γονίδιο *gltA* , καθώς
1345 και μια γονιδιακή αλληλουχία 825 βάσεων από το γονίδιο *trpB* να έχουν λιγότερο από
1346 96.0% και 95.4% ομοιότητα από τα υπάρχοντα είδη μπαρτονέλλας (La Scola *et al.*,
1347 2003), προχωρήσαμε σε PCR και sequencing των συγκεκριμένων γονιδίων. Η στατιστική
1348 ανάλυση μέσω του MEGA version 3.1 software package έδειξε ότι τόσο η Lao/Nh1 όσο

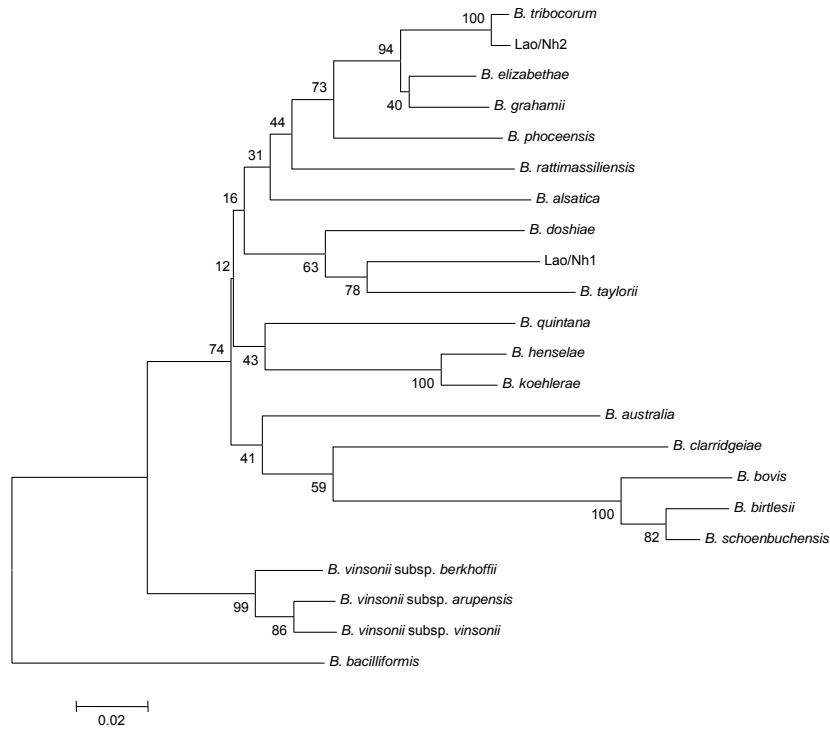
1365 Τα αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν και από τα αντίστοιχα φυλογενετικά δέντρα που
1366 επιβεβαίωσαν ότι η Lao/Nh2 συγγενεύει με την *B. tribocorum* ενώ η Lao/Nh1 είναι πιο
1367 κοντά στην *B. taylorii* (Εικόνες 26, 27).



1368

1369 **Εικόνα 26.** Φυλογενετικό δέντρο βασισμένο στο *gltA* γονίδιο.

1370



1371

1372 **Εικόνα 27.** Φυλογενετικό δέντρο βασισμένο στο *rpoB* γονίδιο.

1373

1374 Οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των νέων ειδών μπαρτονελλών κατατέθηκαν στην

1375 GenBank, και οι κωδικοί (accession numbers) είναι οι παρακάτω:

1376 Lao/Nh1 *gltA* EU755060, Lao/Nh1 *rpoB* EU714973, Lao/Nh1 ITS EU714976, Lao/Nh2

1377 *gltA* EU755061, Lao/Nh2 *rpoB* EU714974, Lao/Nh2 ITS EU714977

1378

1379

1380

1381

1382

1383

1384

1385

1386

1387

1388

1389

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

1390

1391

1392

1393

1394

1395

1396

1397

1398

1399

1400

1401

1402

Πρώτη υπομελέτη

1403 Στην πρώτη υπομελέτη της παρούσας εργασίας προσδιορίστηκε η ευαισθησία διαφόρων
1404 στελεχών μπαρτονέλλας (στελεχών αναφοράς και στελεχών που απομονώθηκαν από
1405 φυσικούς ξενιστές) σε ένα μεγάλο εύρος αντιβιοτικών. Συνολικά μελετήθηκαν 24
1406 στελέχη. Προσδιορίστηκαν οι MICs που παρουσίαζαν 20 στελέχη μπαρτονέλλας που
1407 απομονώθηκαν από άγρια ζώα στην Αυστραλία καθώς και τεσσάρων στελεχών
1408 αναφοράς απέναντι σε 11 αντιβιοτικά.

1409 Μελετήθηκαν επίσης μοριακοί μηχανισμοί αντοχής ή μειωμένης ευαισθησίας των
1410 μπαρτονελλών στις κινολόνες.

1411 Ο προσδιορισμός της ευαισθησίας των μπαρτονελλών στα αντιβιοτικά έχει επιτευχθεί σε
1412 προηγούμενες μελέτες με την καλλιέργεια του μικροβίου είτε σε ευκαρυωτικά κύτταρα
1413 είτε σε αξενικά μέσα. Τα αποτελέσματα όσο αφορά την ευαισθησία των Μπαρτονελλών
1414 στα διάφορα μέσα είναι σχεδόν τα ίδια (1). Όσο αφορά την καλλιέργεια των
1415 Μπαρτονελλών σε αξενικά μέσα, έχουν χρησιμοποιηθεί είτε στερεά (άγαρ) είτε υγρά
1416 θρεπτικά υλικά, τα οποία έχουν εμπλουτιστεί από 5 έως 10% με αίμα αλόγου ή αίμα
1417 προβάτου. Στην παρούσα έρευνα χρησιμοποιήσαμε 5% αιματούχο Columbia άγαρ. Το
1418 θρεπτικό αυτό υλικό, αποτελεί το πιο συχνά χρησιμοποιούμενο αξενικό για την ανάπτυξη
1419 των Μπαρτονελλών (1).

1420 Οι Μπαρτονέλλες όταν αναπτύσσονται σε αξενικά υλικά όπως το 5% αιματούχο Columbia
1421 άγαρ που χρησιμοποιήθηκε στη μελέτη μας, παρουσιάζουν μεγάλη ευαισθησία στους
1422 περισσότερους αντιμικροβιακούς παράγοντες συμπεριλαμβανομένων της πενικιλίνης

1423 και των κεφαλοσπορινών, των αμινογλυκοσιδών, της χλωραμφενικόλης, των
 1424 τετρακυκλινών, των μακρολίδων, της ριφαμπικίνης, της κοτριμοξαζόλης και των
 1425 φλουοροκινολονών (Πίνακας 11). Παρόλα αυτά, η ευαισθησία των μπαρτονέλλων in
 1426 vitro δεν ανταποκρίνεται με την αντίστοιχη in vivo, με αποτέλεσμα τα περισσότερα
 1427 αντιβιοτικά in vivo να έχουν βακτηριοστατική δράση απέναντι στις μπαρτονέλλες (1). Η
 1428 μόνη κατηγορία αντιβιοτικών που διατηρεί την βακτηριοκτόνο δράση της in vivo είναι οι
 1429 αμινογλυκοσίδες.

Drug group and drug	MIC (μg/ml)				
	<i>B. henselae</i>	<i>B. quintana</i>	<i>B. bacilliformis</i>	<i>B. vinsonii</i>	<i>B. elizabethae</i>
Aminoglycosides					
Amikacin	2-4	4-8	2-8	4	1
Gentamicin	0.12-0.25	0.12-2	1-2	0.5	0.12
Streptomycin	ND	ND	4	ND	ND
Tobramycin	0.5-1	0.5-4	2-4	2	0.25
Cephalosporins					
Cefotaxime	0.12-0.25	0.12-0.25	0.03-0.12	0.12	0.06
Cefotetan	0.25-0.5	0.12-0.5	2	1	1
Ceftazidime	0.25-0.5	0.25-0.5	0.12-0.25	0.25	0.5
Ceftriaxone	0.12-0.25	0.06-0.25	0.003-0.006	0.06	0.12
Cephalothin	8-16	8-16	4-8	16	8
Macrolides					
Azithromycin	0.006-0.015	0.006-0.03	0.015	0.015	0.006
Clarithromycin	0.006-0.03	0.006-0.03	0.015-0.03	0.03	0.015
Erythromycin	0.06-0.25	0.06-0.12	0.06	0.25	0.12
Roxithromycin	0.015-0.03	0.015-0.06	0.03	0.12	0.06
Telithromycin	0.003	0.006	0.015	ND	ND
Penicillins					
Amoxicillin	0.6-0.12	0.03-0.06	0.03-0.06	0.06	0.03
Oxacillin	1-2	1-4	0.25-0.5	1	4
Penicillin G	0.03-0.06	0.03	0.015-0.03	0.03	0.015
Ticarcillin	0.25	0.06-0.25	0.06-0.12	0.25	0.12
Quinolones					
Ciprofloxacin	0.25-1	0.5-2	0.25-0.5	1	0.5
Pefloxacin	4-8	2-8	1-2	4	2
Sparfloxacin	0.06	0.06-0.12	0.25	0.06	0.06
Tetracyclines					
Doxycycline	0.12	0.06-0.25	0.03-0.06	0.25	0.06
Miscellaneous					
Clindamycin	2-4	4-16	32-64	8	8
Colistin	4-16	4-16	16	8	4
Fosfomicin	16-32	32-64	8-16	16	16
Imipenem	0.5	0.25-1	0.5-1	2	0.25
Rifampin	0.03-0.06	0.06-0.25	0.003	0.12	0.03
TMP-SMX	1/5	0.25/1.25-1/5	0.4/2-0.8/4	1/5	0.5/2.5
Vancomycin	2-8	8-16	4-8	8	8

1430

1431 **Πίνακας 11.** Οι MICs 5 στελεχών αναφοράς Μπαρτονέλλας σε 5% αιματούχο Columbia
 1432 άγαρ, όπως έχουν προσδιοριστεί από προηγούμενες μελέτες .

1433 Για τον προσδιορισμό της MIC στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε το E-test.
 1434 Πρόσφατες έρευνες αναφέρουν ότι η μέθοδος του E-test είναι χρήσιμη και αξιόπιστη για
 1435 τον προσδιορισμό της ευαισθησίας των μπαρτονελλών στα αντιβιοτικά. Η Dorbecker
 1436 εφάρμοσε το E-test σε στελέχη μπαρτονελλας που είχαν απομονωθεί από γάτες και
 1437 έδειξε ότι η τεχνική αυτή δουλεύει τόσο με στελέχη αναφοράς όσο και με στελέχη που
 1438 έχουν απομονωθεί από ζώα (Dorbecker *et al.*, 2006)). Τα αποτελέσματά της
 1439 επιβεβαίωσαν ότι οι Μπαρτονελλες είναι ευαίσθητες στα περισσότερα αντιβιοτικά όταν
 1440 καλλιεργούνται σε αξενικά μέσα (Πίνακας 12). Επίσης τα αποτελέσματα αυτά
 1441 συμφωνούν με ανάλογες έρευνες που είχαν γίνει στο παρελθόν οι οποίες είχαν σαν στόχο
 1442 να τεκμηριώσουν την χρησιμότητα του E-test για τον προσδιορισμό της ευαισθησίας των
 1443 Μπαρτονελλών (Pendle *et al.*, 2006).

1444

Antimicrobial agent (number of strains)	Number of isolates for which MIC (mg/L) was														
	≤0.002	0.004	0.008	0.015	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	>16
Telithromycin (29)	28			1											
Macrolides															
erythromycin (26)		2	5	7	4	4	4								
roxithromycin (30)		3	2	4	6	9	6								
clarithromycin (31)	19	3	5	4											
azithromycin (30)			8	15	4	3									
Aminoglycosides															
gentamicin (25)								1	1	13	6	3	1		
tobramycin (26)								1	1	1	10	11	2		
amikacin (29)											8	14	6	1	
streptomycin (26)							1			1	10	7	7		
netilmicin (26)								3	16	6		1			
Quinolones															
ciprofloxacin (27)								2	7	16	2				
levofloxacin (24)								1	1	21	1				
moxifloxacin (29)							1	5	19	4					
gemifloxacin (28)						1	6	14	7						
Doxycycline (28)		1	2	2	9	8	6								
Rifampicin (30)			14	7	8	1									

1445

1446 Πίνακας 12

1447 Κατανομή των MICs των στελεχών Μπαρτονελλας που μελετήθηκαν σε προηγούμενες
 1448 μελέτες με τη μέθοδο του E-test, σε 5% αιματούχο σοκολατούχο άγαρ.

1449 Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, δεν διαφέρουν μ' εκείνα προηγούμενων
1450 μελετών, στις οποίες χρησιμοποιήθηκε η ίδια μεθοδολογία. Όλα τα στελέχη
1451 μπαρτονέλλας (στελέχη αναφοράς και στελέχη απομονωμένα από φυσικούς ξενιστές)
1452 παρουσιάστηκαν ευαίσθητα στις αμινιγλυκοσίδες, στις μακρολίδες (MICs : 0.008 -0.12
1453 mg/L για την αζυθρομυκίνη, 0.004 -0.016 mg/L για την κλαριθρομυκίνη και 0.008 - 0.06
1454 mg/L για την ερυθρομυκίνη) στην δοξυκυκλίνη (MICs :0.008 -0.06 mg/L) και στην
1455 ριφαμικίνη (MIC: 0.002 - 0.06 mg/L). Αντίθετα, η βανκομυκίνη φάνηκε να είναι
1456 αναποτελεσματική καθώς παρουσίαζε υψηλές MICs (1 -16 mg/L) για όλα σχεδόν τα
1457 στελέχη.

1458 Οι MICs για τις β-λακταμίνες κυμαίνονταν από 0.004 -0.016 mg/L για την κεφτριαξόνη
1459 και από 0.004 μέχρι 0.03 mg/L για την αμοξισιλίνη. Η ιμιπενέμη ήταν δραστική για όλα
1460 τα στελέχη που μελετήθηκαν εκτός από ένα (*Nh4*), στο οποίο η MIC ήταν 3μg/ml
1461 (Εικόνα 28).

1462 Αυτή η πολλή αυξημένη MIC μας οδήγησε στην υποψία ότι το συγκεκριμένο στέλεχος
1463 είναι πιθανόν να φέρει το γονίδιο της μεταλλο-βήτα λακταμάσης (MBL), το οποίο μπορεί
1464 να βρίσκεται είτε πάνω στο χρωμόσωμα του βακτηρίου, είτε πάνω σε κάποιο πλασμίδιο
1465 το οποίο ενδεχομένως να φέρει. Το γονίδιο MBL έχει βρεθεί σε πολλά gram αρνητικά
1466 βακτήρια και ευθύνεται για την αντοχή τους στην ιμιπενέμη (Helfand and Bonomo,
1467 2005). Από έρευνα που κάναμε στο γονιδίωμα των Μπαρτονελλών που έχουν κατατεθεί
1468 στην Genbank (<http://www.genome.jp/kegg/>) βρήκαμε ότι το γονίδιο αυτό υπάρχει και
1469 στην *B. bacilliformis*.

A



B



1470

1471 **Εικόνα 28.**

1472 Etest σε 5% αιματούχο Columbia άγαρ για *A. B. henselae* και *B. Nh4*

1473

1474

1475 Αν και η δράση των MBL πραγματοποιείται μέσω της υδρόλυσης της ιμιπενέμης, η

1476 αντοχή των βακτηριδίων στις καρβαπενέμες δεν είναι ανάλογη με την ταχύτητα της

1477 υδρόλυσης (Massidda *et al.*, 1991). Οι MBL, όπως όλες οι λακταμάσες, μπορούν να

1478 διακριθούν σε αυτές που μεταφέρονται μέσω χρωμοσωμάτων και σε αυτές που

1479 περιέχονται σε περιοχές που μεταφέρονται μέσω γονιδίων, με την πλειοψηφία των MBL

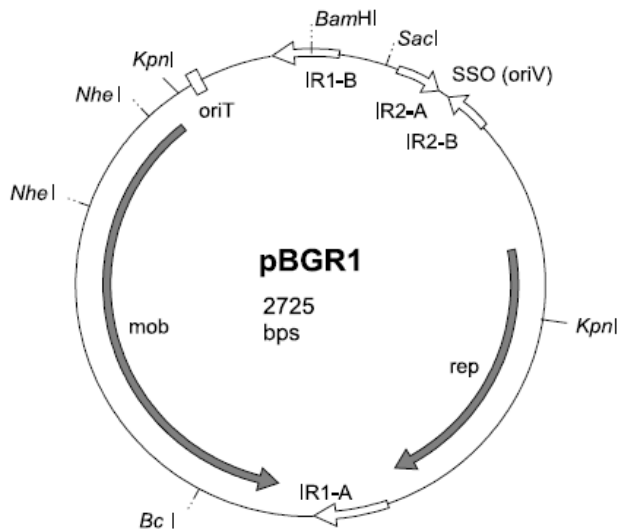
1480 γονιδίων να βρίσκονται σε πλασμίδια από 120 έως 180 kb . Όσον αφορά τις

1481 Μπαρτονέλλες, η ύπαρξη πλασμιδίων δεν είναι συχνή και η μόνη αναφορά για φυσικό

1482 πλασμίδιο γίνεται για την *B. grahamii* (Seubert *et al.*, 2003). Αν και στο πλασμίδιο που

1483 βρέθηκε στην *B. grahamii* δεν βρέθηκαν MBL γονίδια (εικόνα 29), υποπευόμαστε ότι

1484 στο συγκεκριμένο στέλεχος *Nh4* από την Αυστραλία είναι πολύ πιθανό να υπάρχει
1485 κάποιο πλασμίδιο το οποίο να φέρει κάποια MBL γονίδια. Η παραπάνω υπόθεση χρήζει
1486 παραπέρα διερεύνησης.
1487

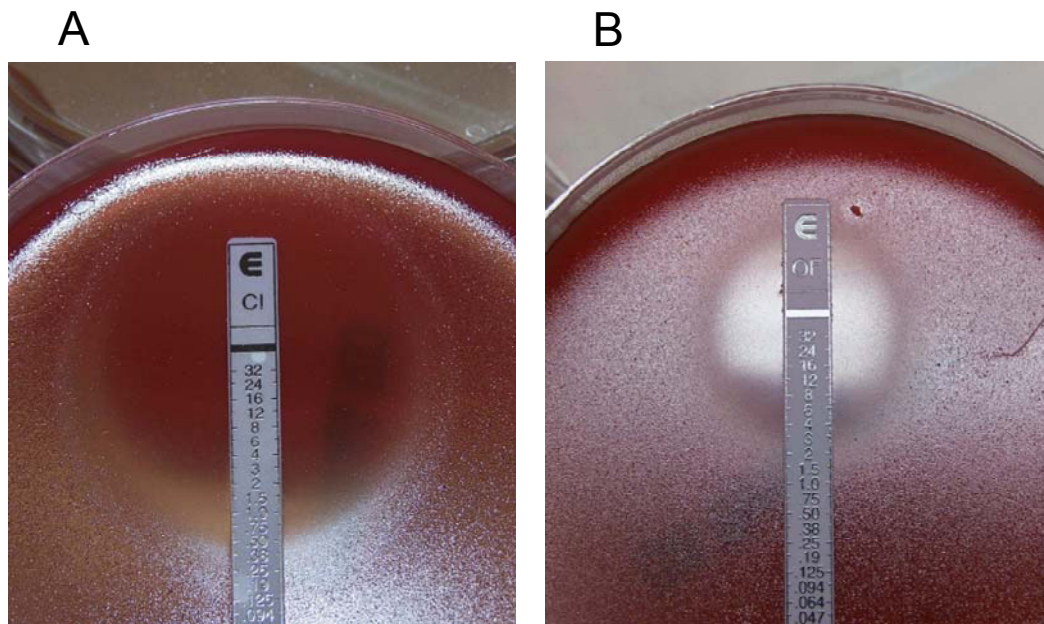


1488
1489 **Εικόνα 29.** Ο χάρτης του κρυπτικού pBGR1 πλασμιδίου που ανακαλύφθηκε στην *B.*
1490 *grahamii* .

1491

1492

1493 Με την μέθοδο του E-test σε 5% αιματούχο Columbia άγαρ, βρήκαμε ότι όλα τα στελέχη
1494 που μελετήθηκαν, παρουσίασαν διαφορετική ευαισθησία απέναντι στις δυο κινολόνες
1495 που χρησιμοποιήθηκαν με την σιπροφλοξασίνη να εμφανίζεται 10 φορές πιο δραστική
1496 από την οφλοξασίνη (MIC για την σιπροφλοξασίνη από 0.06–0.5 mg/L , με μέσο όρο
1497 0.25 mg/L, ενώ MIC για την οφλοξασίνη μεγαλύτερη, με εύρος 0.5–4 mg/L και μέσο όρο
1498 2 mg/L) .



1499

1500 **Εικόνα 30.** Etest σε 5% αιματούχο Columbia άγαρ για την *B. henselae* παρουσία Α.
 1501 σιπροφλοξασίνης και Β. οφλοξασίνης.

1502

1503 Το παραπάνω εύρημα είναι σε συμφωνία με προηγούμενες δημοσιευμένες μελέτες, στις
 1504 οποίες έχουν παρατηρηθεί διαφορές όσο αφορά στη δράση των διαφόρων
 1505 φλουοκινολονών (όχι μόνο σιπροφλοξασίνη και οφλοξασίνη).

1506 Παρ' όλο που οι κινολόνες χρησιμοποιούνται τα τελευταία χρόνια για την
 1507 θεραπεία των λοιμώξεων από *Bartonella* sp., (κυρίως για τη νόσο του Carrion και για τις
 1508 οφθαλμικές επιπλοκές των μαρτονελλώσεων, έχουν αναφερθεί αρκετά περιστατικά
 1509 ανεπιτυχούς θεραπείας λόγω μη υποχώρησης των συμπτωμάτων ή επανεμφάνισης τους
 1510 αμέσως μετά την λήξη της αντιβιοτικής αγωγής (Biswas *et al.*, 2007). Προηγούμενες
 1511 έρευνες σχετικά με την ευαισθησία των μαρτονελλών στις κινολόνες, δείχνουν ότι οι

1512 MICs τους στις κινολόνες εμφανίζουν μεγάλη ετερογένεια, ανάλογα με το είδος της
 1513 κινολόνης που χρησιμοποιείται (Ives *et al.*, 2001;Kordick *et al.*, 1997;Rolain *et al.*,
 1514 2004), ανεξάρτητα με το είδος ή στέλεχος. Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 13)
 1515 παρουσιάζονται συνοπτικά τα αποτελέσματα των σημαντικότερων μελετών που
 1516 υπάρχουν στη διεθνή βιβλιογραφία συμπεριλαμβανομένης και της παρούσας μελέτης.
 1517

Αναφορά	Kordick DL et all	Dorbecker C et all	Maurin M et all	Rolain et al	Παρούσα έρευνα
Μέθοδος	άγαρ αραιώση (μg/ml)	άγαρ αραιώση (mg/L)	άγαρ αραιώση (μg/ml)	άγαρ αραιώση (μg/ml)	Etest (μg/ml)
Στελέχη	Αναφοράς B.h B.c B.v	Αναφοράς και μη 31 Bartonella spp.	Αναφοράς B.q	Αναφοράς B.h B.q B.e B.b B.w	Αναφοράς και μη B.h B.q B.b B.a
Αντιβιοτικά					
Κινολόνες					
Ενροφλοξασίνη	0,5 0,125 0,5				
Σπυροφλοξασίνη	0,5 0,5 0,5	0,25-2	2	0,25 0,5 0,5 0,25 1	0,4 0,2 0,25 0,064-0,5
Λεβοφλοξασίνη		0,25-2			
Γεμφλοξασίνη		0,06-0,5			
Οφλοξασίνη					4 3 1,5 0,5-4
Σπαρφλοξασίνη			0,06	0,06 0,06 0,06 0,25 0,06	
Πεφλοξασίνη			4	4 2 2 1 3	

1518

1519 Πίνακας 13

1520 MICs των διαφόρων φλουροκινολονών έναντι διαφόρων στελεχών Bartonella sp.
 1521 Συνοπτικά αποτελέσματα των σημαντικότερων μελετών που υπάρχουν στη διεθνή
 1522 βιβλιογραφία συμπεριλαμβανομένης και της παρούσας μελέτης.
 1523

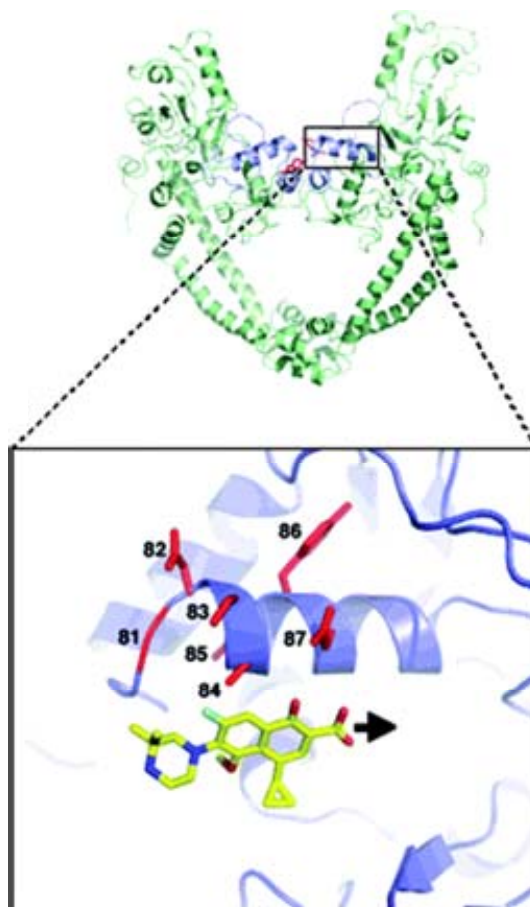
1524 Παρ' όλες τις μεγάλες διαφορές όσο αφορά στη δράση των διαφόρων φλουοκινολονών
 1525 (όχι μόνο σπυροφλοξασίνη και οφλοξασίνη) που έχουν παρατηρηθεί σε προηγούμενες

1526 έρευνες όπως φαίνεται στο πίνακα 13, δεν γίνεται αναφορά ούτε έχει διευκρινιστεί η
1527 αιτία που μπορεί να οδηγεί σε αυτήν την ποικιλομορφία.

1528

1529 Ένας από τους στόχους της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση της αιτίας που οδηγεί
1530 σε ποικιλόμορφη ευαισθησία των μπαρτονελλών απέναντι στις κινολόνες. Περιγράψαμε
1531 την μοριακή βάση της ιδιότητας των μπαρτονελλών να παρουσιάζουν ποικιλόμορφη
1532 ευαισθησία ενάντια στις κινολόνες. Συγκεκριμένα, μελετήθηκε η ύπαρξη πιθανών
1533 μηχανισμών αντοχής στις κινολόνες σε φυσικά απομονωθέντα στελέχη και σε στελέχη
1534 αναφοράς.

1535 Ο στόχος των κινολονών είναι η DNA γυράση και η DNA τοποισομεράση IV. Οι
1536 υπομονάδες της DNA γυράσης είναι η GyrA και η GyrB, ενώ της τοποισομεράσης IV
1537 είναι η ParC και η ParE (7). Οι μηχανισμοί αντοχής στις κινολόνες έχουν μελετηθεί
1538 αναλυτικά για την *E. coli* με τις πιο πολλές μεταλλάξεις να περιγράφονται στην QRDR
1539 περιοχή της γυράσης. Η QRDR περιοχή αποτελείται από την περιοχή που
1540 καταλαμβάνουν τα αμινοξέα από την θέση Ala67 μέχρι την θέση Gln106 στην *gyrA* και
1541 Asp426 έως Lys447 στην *gyrB* (7). Οι συχνότερες μεταλλάξεις στην περιοχή αυτή
1542 απαντώνται στις θέσεις 83 και 87 στην *gyrA*, οι οποίες βρίσκονται κοντά στις πιο ενεργές
1543 περιοχές της γυράσης (Εικόνα 31). Μεταλλάξεις σε αυτές τις περιοχές ενδεχομένως να
1544 επηρεάζουν την πρόσδεση των κινολονων στην γυράση και κατ'επέκταση να μειώνουν
1545 την ευαισθησία των μικροβίων.



1546
1547

1548 **Εικόνα 31.** Τρισδιάστατη απεικόνιση της QRDR περιοχής της *E. coli* με τις θέσεις που
1549 παίζουν σημαντικό ρόλο στην πρόσδεση των κινολονών στην γυράση.
1550

1551 Στην παρούσα μελέτη, προσδιορίστηκαν οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες της QRDR
1552 περιοχής της γυράσης στα 24 στελέχη μαρτονέλλας που συμπεριελήφθησαν στη
1553 μελέτη (20 στελέχη απομονωθέντα από φυσικούς ξενιστές και 4 στελέχη αναφοράς), και
1554 στη συνέχεια συγκρίθηκαν προκειμένου να μελετηθούν οι πιθανές διαφορές μεταξύ τους.
1555 Από την σύγκριση αυτή βρέθηκε ότι όλα τα στελέχη (στελέχη αναφοράς και στελέχη
1556 απομονωθέντα από φυσικούς ξενιστές) έφεραν μια φυσική μετάλλαξη στην θέση 83 της
1557 QRDR περιοχής της γυράσης (βάση της QRDR της *E. coli*). Στην θέση αυτή η σερίνη, η

1558 οποία υπάρχει σε όλα τα ευαίσθητα στις κινολόνες μικρόβια, είχε αντικατασταθεί από
1559 μια αλανίνη (Ser83Ala).

1560 Παρεμφερείς in vitro μελέτες, έδειξαν στην *E. coli* ότι η μετάλλαξη στην σερίνη 83 της
1561 QRDR περιοχής, αποτελούσε το πρώτο βήμα για την μείωση της ευαισθησίας των
1562 μικροβίων στις κινολόνες (Heisig and Tschorny, 1994). Επίσης, βρέθηκε ότι στελέχη με
1563 μετάλλαξη της σερίνης 83 της QRDR περιοχής ήταν πιο ανθεκτικά στις κινολόνες από
1564 αντίστοιχα στελέχη που έφεραν μετάλλαξη στην θέση Asp-87, γεγονός που οδήγησε στο
1565 συμπέρασμα ότι η σερίνη 83 παίζει πιο δραστικό ρόλο στην πρόσδεση των κινολονών
1566 οπότε και μεταλλάξεις σε αυτή οδηγούν σε πιο ανθεκτικά στελέχη (Heisig and Tschorny,
1567 1994; Biswas *et al.*, 2007). Επιπλέον, σύμφωνα με τον Heisig, στελέχη *E. coli*, τα οποία
1568 έφεραν μια αντίστοιχη μετάλλαξη με τις Μπαρτονέλλες στην θέση 83 (Ser83Ala),
1569 παρουσίαζαν αντίστοιχη ευαισθησία στις κινολόνες καθώς ήταν πιο ευαίσθητα στην
1570 σιπροφλοξασίνη και περισσότερο ανθεκτικά στην οφλοξασίνη (Heisig and Tschorny,
1571 1994). Αντίστοιχη μετάλλαξη στη θέση 83 (Ser83Ala) έχει επίσης παρατηρηθεί και στο
1572 *Tropheryma whipplei*, στην *Brucella* και στο *Mycoplasma pneumoniae*. Στελέχη *T.*
1573 *whipplei*, που έφεραν μετάλλαξη στη θέση 83 της GyfA, παρουσίαζαν επίσης
1574 διαφορετική ευαισθησία απέναντι στην σιπροφλοξασίνη (MICs 4 έως 8 µg/ml) και στην
1575 λεβοφλοξασίνη (MICs 0.25 µg/ml) (Masselot *et al.*, 2003). Από αντίστοιχη έρευνα που
1576 κάναμε για τα βακτήρια του γένους *Brucella* (*B. suis*, *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. ovis*)
1577 με το να συγκρίνουμε τις γονιδιακές και αμινοξικές αλληλουχίες της γυράσης τους,
1578 βρήκαμε ότι παρουσιάζουν επίσης Ser83Ala μετάλλαξη. Όταν ανατρέξαμε στην
1579 βιβλιογραφία βρήκαμε όπως αναμέναμε ότι τα βακτήρια αυτά εμφάνιζαν αντίστοιχη
1580 ποικιλομορφία απέναντι στα διάφορα σκευάσματα φλουοροκινολονών in vitro

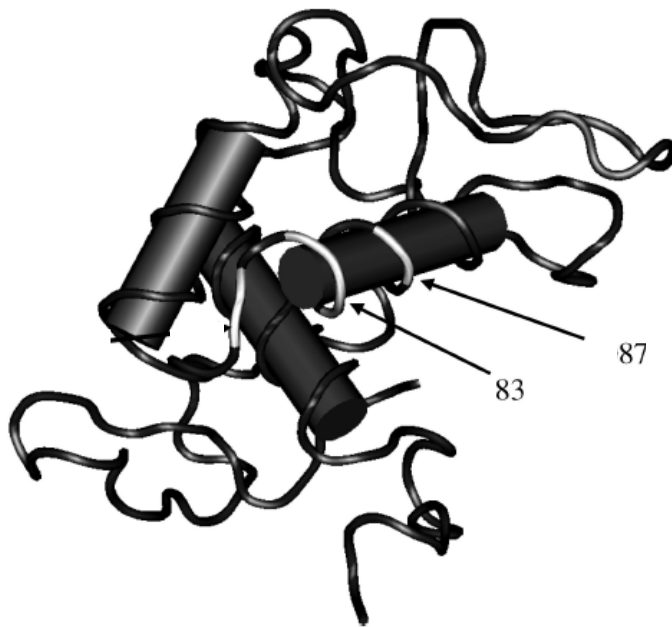
1581 (Trujillano-Martin *et al.*, 1999; Kocagoz *et al.*, 2002). Τέλος, τα στελέχη του *M.*
1582 *pneumoniae* που εμφάνιζαν Ser83Ala είχαν και αυτά διαφορετική ευαισθησία στις
1583 κινολόνες (Kenny and Cartwright, 1991; Kenny *et al.*, 1989). Τα παραπάνω οδηγούν στην
1584 υπόθεση ότι η φυσική μετάλλαξη Ser83Ala παίζει σημαντικό ρόλο τη διαφορετική
1585 ευαισθησία των μπαρτονελλών απέναντι στις κινολόνες.

1586

1587 Επιπλέον, στην πρώτη υπομελέτη της παρούσας εργασίας, για την καλύτερη κατανόηση
1588 πιθανών μηχανισμών αντοχής, δημιουργήθηκαν *in vitro* ανθεκτικά στην σιπροφλοξασίνη
1589 (σε αιματούχο 5% Columbia άγαρ, με την βοήθεια δίσκων σιπροφλοξασίνης), στελέχη
1590 μπαρτονέλλας, και μελετήθηκε η μοριακή βάση αυτής της αντοχής. Όταν συγκρίθηκαν οι
1591 νουκλεοτιδικές αλληλουχίες της QRDR περιοχής της γυράσης των ανθεκτικών και
1592 ευαίσθητων στελεχών, τα ανθεκτικά στελέχη, εμφάνισαν μια σημειακή μετάλλαξη στην
1593 θέση που αντιστοιχεί στο αμινοξύ 87 (αρίθμηση βάσει της QRDR της *E. coli*). Σαν
1594 αποτέλεσμα της μετάλλαξης, στη θέση 87 και στα δυο ανθεκτικά στελέχη, το ασπαρτικό
1595 οξύ αντικαταστάθηκε από το αμινοξύ ασπαραγίνη (Asp87Asn).

1596 Το αποτέλεσμα αυτό επιβεβαιώνει προηγούμενες έρευνες που πραγματοποιήθηκαν σε
1597 στελέχη *B. bacilliformis*, τα οποία ήταν ανθεκτικά στην σιπροφλοξασίνη (Biswas *et al.*,
1598 2007). Σύμφωνα με αυτές τις έρευνες, τόσο οι Minnick *et al.*, όσο και οι Biswas *et al.*,
1599 έδειξαν ότι τα στελέχη *B. bacilliformis* ανέπτυσαν αντοχή στην σιπροφλοξασίνη όταν
1600 μετάλλαξαν την θέση 87 της QRDR περιοχής της DNA γυράσης, με αντικατάσταση του
1601 Asp από Asn (Biswas *et al.*, 2007; Minnick *et al.*, 2003). Και στις δυο αυτές έρευνες τα
1602 ανθεκτικά στελέχη μπαρτονέλλας έφεραν επίσης την Ser83-Ala μετάλλαξη. Ανάλογες
1603 μελέτες σχετικά με την αντοχή στις κινολονών στην *E. coli* έχουν οδηγήσει στην

1604 υπόθεση ότι μειωμένη ευαισθησία εμφανίζεται σε περίπτωση μιας μόνο μετάλλαξης στην
1605 QRDR περιοχής της DNA γυράσης, ενώ αντοχή παρατηρείται στις περιπτώσεις που
1606 υπάρχει διπλή μετάλλαξη. Στην προκειμένη περίπτωση, τα ανθεκτικά στελέχη
1607 Μπαρτονέλλας έφεραν διπλή μετάλλαξη στην QRDR περιοχής της DNA γυράσης σε
1608 σχέση με την *E. coli*, στην θέση 83 και 87 (Εικόνα 32).



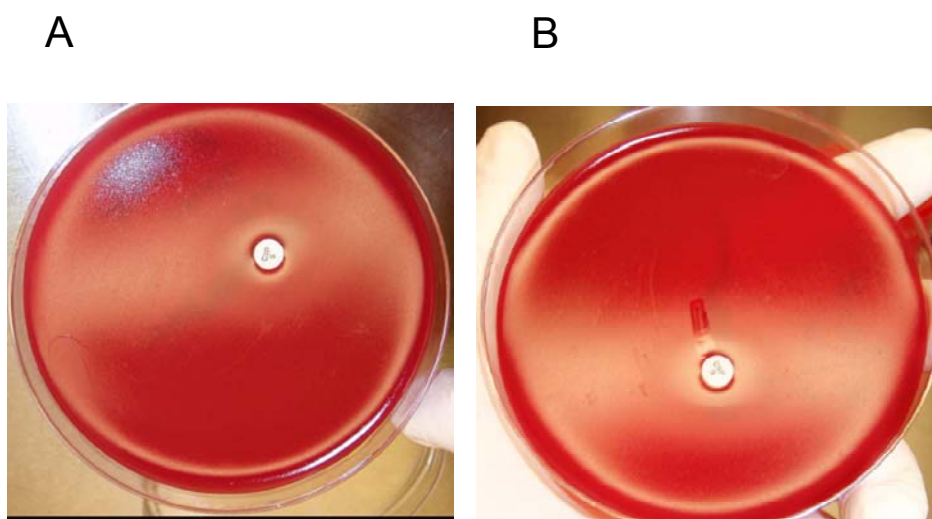
1609

1610 **Εικόνα 32.** Τρισδιάστατη απεικόνιση της QRDR περιοχής της *E. coli* με τις θέσεις 83
1611 και 87 της *gyrA*, οι οποίες παίζουν σημαντικό ρόλο στην πρόσδεση των κινολονών στην
1612 γυράση.
1613

1614 Τόσο τα στελέχη της *B. henselae* όσο και της *B. quintana* ανέπτυξαν σχετικά γρήγορη
1615 αντοχή στην σιπροφλοξασίνη (4 με 5 ανακαλλιέργειες). Σε αντίστοιχη έρευνα, η *B.*
1616 *bacilliformis* ανέπτυξε αντοχή στην σιπροφλοξασίνη μετά από 4 ανακαλλιέργειες (9).
1617 Η σχετικά γρήγορη αυτή ανάπτυξη αντοχής στην σιπροφλοξασίνη ενδεχομένως να
1618 εξηγεί γιατί οι κινολόνες αποτυγχάνουν όταν χρησιμοποιούνται για την μακροχρόνια

1619 θεραπεία των μπαρτονελλώσεων, μιας και τα βακτήρια εύκολα γίνονται ανθεκτικά στις
1620 κινολόνες.

1621



1622

1623 **Εικόνα 33.** Καλλιέργεια *B. henselae* και *B. quintana* παρουσία δίσκου σιπροφλοξασίνης
1624 (5mg).

1625

1626 **Συμπερασματικά :**

1627 Η φυσική μετάλλαξη στην θέση 83 της QRDR περιοχής της γυράσης οδηγεί σε
1628 ποικιλόμορφη ευαισθησία των Μπαρτονελλών απέναντι στα διάφορα σκευάσματα
1629 φλουοροκινολονών. Αυτό, σε συνδυασμό με τη γρήγορη ανάπτυξη αντοχής στην
1630 σιπροφλοξασίνη και κατ' επέκταση και σε όλες τις κινολόνες, ενδεχομένως να εξηγεί
1631 γιατί οι κινολόνες αποτυγχάνουν όταν χρησιμοποιούνται για την μακροχρόνια θεραπεία
1632 των μπαρτονελλώσεων. Ο πιθανότερος λόγος είναι ότι τα μικρόβια, σε σύντομο σχετικά

1633 διάστημα, καταφέρνουν και αναπτύσσουν και δεύτερη αμινοξική μετάλλαξη στην θέση
1634 87 της QRDR περιοχής της γυράσης με αποτέλεσμα να αποκτούν υψηλού επιπέδου
1635 αντοχή στις κινολόνες. Τα αποτελέσματα μας έχουν κλινική χρήση, καθώς οι κινολόνες
1636 χρησιμοποιούνται συχνά για την θεραπεία των μπαρτονελλώσεων και κυρίως των
1637 οφθαλμικών επιπλοκών τους και του πυρετού Oroya (Biswas *et al.*, 2007).
1638 Συμπερασματικά λοιπόν, προτείνουμε ότι οι κινολόνες δεν θα πρέπει να αποτελούν το
1639 αντιβιοτικό πρώτης επιλογής τόσο για την βραχυχρόνια αλλά κυρίως για την
1640 μακροχρόνια θεραπεία των μπαρτονελλώσεων καθώς προκύπτει εύκολα ανάπτυξη
1641 αντοχής υψηλού επιπέδου σε αυτές.

1642

1643

1644

1645

1646

1647

1648

1649

1650

1651

1652

Δεύτερη υπομελέτη

1653 Η δεύτερη υπομελέτη είχε στόχο την ανίχνευση και ταυτοποίηση στελεχών *Bartonella*
1654 *sp.* σε φυσικούς ξενιστές.

1655 Δείγματα από τρωκτικά που συνελήφθηκαν σε διαφορετικές επαρχίες του ΛΑΟΣ
1656 εξετάστηκαν για την ύπαρξη *Bartonella sp.* με την χρήση Real-Time PCR. Τα θετικά
1657 δείγματα αναλύθηκαν με standard PCR στοχεύοντας το γονίδιο ITS προκειμένου να
1658 αναγνωριστεί το είδος. Τα νέα είδη Μπαρτονέλλας εξετάστηκαν επιπλέον με standard
1659 PCR στοχεύοντας τα γονίδια *gltA* και *rpoB*.

1660 Η μελέτη αυτή αποτελεί την πρώτη επιδημιολογική έρευνα που γίνεται για την ύπαρξη
1661 Μπαρτονελλών στο ΛΑΟΣ. Βρέθηκε ένα αρκετά υψηλό ποσοστό (25.5%) τρωκτικών
1662 μολυσμένα με Μπαρτονελλά. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι τα τρωκτικά των
1663 οποίων η σύλληψη έγινε σε αστικές περιοχές ήταν εξίσου μολυσμένα με μπαρτονελλά μ'
1664 αυτά των οποίων η σύλληψη έγινε σε αγροτικές και δασώδεις περιοχές.

1665 Στην επιδημιολογική μας έρευνα ανιχνεύσαμε την ύπαρξη *B. phoceensis*, *B. elizabethae*
1666 και *B. tribocorum*. Αξίζει να αναφερθεί ότι είναι η πρώτη φορά που η *B. phoceensis*
1667 ανιχνεύεται σε αυτήν την γεωγραφική περιοχή. Κατά την συγκεκριμένη έρευνα
1668 ανακαλύψαμε επίσης την ύπαρξη δυο νέων ειδών μπαρτονελλών.

1669 Από μελέτες που έχουν γίνει σε παραπλήσιες χώρες η *B. elizabethae* έχει βρεθεί στο
1670 παρελθόν σε μικρά θηλαστικά στο Μπαγκλαντες (Bai *et al.*, 2007b), ενώ η *B. tribocorum*
1671 και η *B. clarridgeiae* έχουν ανιχνευθεί σε ψύλλους που συλλέχθηκαν από τρωκτικά στην

1672 νότια Κίνα (Li *et al.*, 2007). Στην Ταϊλάνδη στο παρελθόν έχουν αναφερθεί λοιμώξεις
1673 από *B. henselae* και *B. Clarridgeiae*, ενώ πρόσφατα απομονώθηκε ένα νέο είδος
1674 μπαρτονέλλας που ονομάστηκε *B. tamiae*, από 3 ασθενείς που ζούσαν σε συνθήκες που
1675 ευνοούσαν την επαφή με τρωκτικά (Kosoy *et al.*, 2008b).
1676 Καθώς η μετάδοση της *B. henselae* και της *B. clarridgeiae* σχετίζεται με τις γάτες
1677 ενδεχομένως για το λόγο αυτό να μην βρέθηκαν στην έρευνα μας, μιας και μελετήσαμε
1678 μόνο τρωκτικά.
1679 Στην εικόνα 34 φαίνονται οι Μπαρτονέλλες που έχουν βρεθεί σε παραπλήσιες του
1680 ΛΑΟΣ χώρες.



1681
1682

1683 **Εικόνα 34.** Μπαρτονέλλες που έχουν βρεθεί σε παραπλήσιες του ΛΑΟΣ χώρες

1684

1685

1686

1687 Ανάλογη μελέτη σε τρωκτικά, έγινε παράλληλα με την παρούσα μελέτη στην Κύπρο,
1688 από το Εργαστήριο Βακτηριολογίας Παρασιτολογίας, Ζωονόσων και Γεωγραφικής
1689 Ιατρικής, στην οποία ανιχνεύτηκε *Bartonella sp* DNA, σε 6 από τα 32 τρωκτικά που
1690 ελέγχθηκαν με τη μέθοδο της PCR. Σε 2 δείγματα αίματος (σε 1 *Rattus norvegicus* και 1
1691 *Rattus rattus*) ανιχνεύτηκε *Bartonella tribocorum*. Σε 3 δείγματα από καρδιακό ιστό
1692 προερχόμενα από 3 *Rattus norvegicus* ανιχνεύτηκε *Bartonella elizabethae*, ενώ σε 1
1693 *Rattus norvegicus* ανιχνεύτηκε *Bartonella rattimassiliensis sp.* (Διδακτ. Διατριβή
1694 Παπαευσταθίου Ανδρέας, Ιατρική Σχολή Παν/μιο Κρήτης)

1695

1696 Οι μπαρτονέλλες δεν παρουσιάζουν ιδιαίτερα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά στα οποία θα
1697 μπορούσε να στηριχθεί ο διαχωρισμός τους, με αποτέλεσμα η πιστοποίηση της
1698 ταυτότητας τους να βασίζεται κυρίως σε φυλογενετικές διαφορές.

1699 Όπως προαναφέρθηκε, στην παρούσα μελέτη ανιχνεύτηκαν και χαρακτηρίστηκαν δυο
1700 νέα στελέχη *Bartonella* που ονομάστηκαν Lao/Nh1 και Lao/Nh2.

1701 Καθώς ανακαλύψαμε ότι η γονιδιακή αλληλουχία του γονιδίου ITS για δυο είδη
1702 *Bartonella* διέφερε από τα ήδη υπάρχοντα είδη, χρησιμοποιήσαμε τα γονίδια *gltA* και
1703 *rpoB* προκειμένου να διευκρινίσουμε την ταξονομική θέση των δυο αυτών
1704 μπαρτονελλών. Όπως προαναφέρθηκε τα γονίδια *gltA* και *rpoB* έχουν καλή
1705 “διαχωριστική δύναμη” και η χρήση τους είναι απαραίτητη ώστε να χαρακτηριστεί ένα
1706 νέο είδος *Bartonella* (La Scola *et al.*, 2003). Ένα στέλεχος *Bartonella* μπορεί να
1707 χαρακτηριστεί ως νέο είδος αν μια γονιδιακή αλληλουχία 327 βάσεων από το γονίδιο
1708 *gltA* καθώς και μια γονιδιακή αλληλουχία 825 βάσεων από το γονίδιο *rpoB* να έχουν

1709 λιγότερο από 96.0% και 95.4% ομοιότητα από τα υπάρχοντα είδη *Bartonella* (La Scola
1710 *et al.*, 2003).

1711 Η Lao/Nh1 είχε λιγότερη από 95.4% και 96.0% ομοιότητα για μια περιοχή 825-bp του
1712 γονιδίου *rpoB* και 327-bp του γονιδίου *gltA* αντίστοιχα, γεγονός που την καθιστά νέο
1713 είδος. Η Lao/Nh2 είχε λιγότερη από 95.4% για μια περιοχή 825-bp του γονιδίου *rpoB*
1714 αλλά παρουσίαζε 97.8% ομοιότητα με την *B. tribocorum* όσον αφορά τις 327 βάσεις
1715 του γονιδίου *gltA*, γεγονός που την σημαίνει ότι αποτελεί υποείδος της *B. tribocorum*. Η
1716 Lao/Nh1 φυλογενετικά βρίσκεται κοντά στις *B. birtlesii* και *B. taylorii* ενώ η Lao/Nh2
1717 κοντά με την *B. tribocorum*. Αξίζει να σημειωθεί ότι η Lao/Nh1 βρέθηκε μόνο σε
1718 τρωκτικά *Rattus rattus*, τα οποία συλλέχθηκαν από τις επαρχίες Luangnamtha και Luang
1719 Prabang. Αυτό ενδεχομένως σημαίνει ότι η Lao/Nh1 πρόκειται για ενδημική αυτών των
1720 περιοχών μπαρτονέλλα, με τα τρωκτικά *Rattus rattus* να αποτελούν είτε τους ξενιστές
1721 είτε τους φορείς τους. Αντίθετα η Lao/Nh2 είχε πιο ευρεία κατανομή και βρέθηκε στις
1722 ίδιες περιοχές και στα ίδια τρωκτικά που βρέθηκε και η *B. tribocorum*, γεγονός που
1723 ενδεχομένως ενισχύει την συγγένεια τους.

1724 Όπως προαναφέρθηκε, 11 είδη Μπαρτονέλλας σχετίζονται με ένα αυξανόμενο αριθμό
1725 «αναδυόμενων νόσων». Από τα φυλογενετικά δεδομένα μπορούμε να συμπεράνουμε ότι
1726 η Lao/Nh2 το πιθανότερο είναι να μην ανήκει στις μπαρτονέλλες που είναι παθογόνες
1727 για τον άνθρωπο. Για την Lao/Nh1 δεν έχουμε αρκετά στοιχεία για το κατά πόσο μπορεί
1728 είναι παθογόνο στέλεχος. Θα ήταν χρήσιμη παραπέρα διερεύνηση προκειμένου να
1729 διαπιστωθεί ότι δεν είναι παθογόνα για τον άνθρωπο.

1730

1731

1732

1733

1734

1735 Συμπερασματικά:

1736 Από την επιδημιολογική έρευνα αποδείξαμε ότι τα μολυσμένα με μπαρτονέλλα τροφικά

1737 υπήρχαν τόσο σε αστικές όσο και σε αγροτικές περιοχές γεγονός που σημαίνει ότι τόσο ο

1738 αγροτικός όσο και ο αστικός πληθυσμός εκτίθεται σε παράγοντες που μεταδίδουν το

1739 βακτήριο. Σύμφωνα με πρόσφατες έρευνες, όλες οι μπαρτονέλλες μπορούν να αποβούν

1740 ευκαιριακά παθογόνα για τον άνθρωπο αρκεί να υπάρχουν οι απαραίτητες συνθήκες,

1741 όπως ανοσοκαταστολή, άμεση επαφή με το αίμα του ξενιστή ή του φορέα κ.α. Είναι

1742 πιθανόν, ένας αριθμός περιπτώσεων νόσου με άγνωστη προς το παρόν αιτιολογία, να

1743 προκαλείται από μπαρτονέλλες, πράγμα που καθιστά σημαντικές επιδημιολογικές

1744 μελέτες σαν αυτή της παρούσας μελέτης. Τέτοιες μελέτες συμβάλλουν στην ανίχνευση

1745 και τον προσδιορισμό των κυκλοφορούντων ειδών μπαρτονέλλας στους φυσικούς

1746 ξενιστές σε μια περιοχή ή μια χώρα.

1747

1748

1749

1750

1751

1752

1753

1754

1755

1756
1757
1758
1759
1760
1761
1762
1763
1764

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

Reference List

- 1765 1 Alsmark CM, Frank AC, Karlberg EO, Legault BA, Ardell DH, Canback B,
1766 Eriksson AS, Naslund AK, Handley SA, Huvet M, La Scola B, Holmberg M,
1767 Andersson SG: The louse-borne human pathogen *Bartonella quintana* is a genomic
1768 derivative of the zoonotic agent *Bartonella henselae*. Proc Natl Acad Sci U S A
1769 101:9716-9721 (2004).
- 1770 2 Angelakis E, Biswas S, Taylor C, Raoult D, Rolain JM: Heterogeneity of
1771 susceptibility to fluoroquinolones in *Bartonella* isolates from Australia
1772 reveals a natural mutation in *gyrA*. J Antimicrob Chemother 61:1252-1255
1773 (2008a).
- 1774 3 Angelakis E, Lepidi H, Rolain JM, Raoult D.: First human case of *Bartonella*
1775 *alsatica* lymphadenitis 2008b).
- 1776 4 Angelakis E, Raoult D., Rolain JM: *Bartonellas*: Oxford University press 2008c).
- 1777 5 Bai Y, Montgomery SP, Sheff KW, Chowdhury MA, Breiman RF, Kabeya H,
1778 Kosoy MY: *Bartonella* strains in small mammals from Dhaka, Bangladesh, related
1779 to *Bartonella* in America and Europe. Am J Trop Med Hyg 77:567-570 (2007a).

- 1780 6 Bai Y, Montgomery SP, Sheff KW, Chowdhury MA, Breiman RF, Kabeya H,
1781 Kosoy MY: *Bartonella* strains in small mammals from Dhaka, Bangladesh, related
1782 to *Bartonella* in America and Europe. Am J Trop Med Hyg 77:567-570 (2007b).
- 1783 7 Bass JW, Vincent JF, Person DA: The expanding spectrum of *Bartonella*
1784 *infections*: II. Cat scratch disease. Pediat Inf Dis J 16:163-179 (1997a).
- 1785 8 Bass JW, Vincent JM, Person DA: The expanding spectrum of *Bartonella*
1786 *infections*: I. Bartonellosis and trench fever. Pediat Inf Dis J 16:2-10 (1997b).
- 1787 9 Birtles RJ, Harrison TG, Saunders NA, Molyneux DH: Proposals to unify the
1788 genera *Grahamella* and *Bartonella*, with descriptions of *Bartonella talpae*
1789 *comb.nov.*, *Bartonella peromysci comb. nov.*, and three new species, *Bartonella*
1790 *grahamii* sp. nov., *Bartonella taylorii* sp. nov., and *Bartonella doshiae* sp. nov. Int J
1791 Syst Bact 45:1-8 (1995).
- 1792 10 Birtles RJ, Raoult D: Comparison of partial citrate synthase gene (*gltA*) sequences
1793 for phylogenetic analysis of *Bartonella* species. Int J Syst Bact 46:891-897 (1996).
- 1794 11 Biswas S, Raoult D, Rolain JM: Molecular characterization of resistance to
1795 macrolides in *Bartonella henselae*. Antimicrob Agents Chemother 50:3192-3193
1796 (2006).

- 1797 12 Biswas S, Raoult D, Rolain JM: Molecular mechanisms of resistance to antibiotics
1798 in *Bartonella bacilliformis*. J Antimicrob Chemother 59:1065-1070 (2007).
- 1799 13 Breitschwerdt B, Kordick D: *Bartonella* infection in animals : carriership, reservoir
1800 potential, pathogenicity and zoonotic potential for human infection. Clin Microbiol
1801 Rev 13:428-438 (2000).
- 1802 14 Brenner DJ, O'Connor S, Winkler HH, Steigerwalt AG: Proposals to unify the
1803 genera *Bartonella* and *Rochalimaea*, with descriptions of *Bartonella quintana*
1804 comb. nov., *Bartonella vinsonii* comb. nov., *Bartonella henselae* comb. nov., and
1805 *Bartonella elizabethae* comb.nov., and to remove the family *Bartonellaceae* from
1806 the order *Rickettsiales*. Int J Syst Bact 43:777-786 (1993).
- 1807 15 Brouqui P, La Scola B, Roux V, Raoult D: Chronic *Bartonella quintana* bacteremia
1808 in homeless patients. New Engl J Med 340:184-189 (1999a).
- 1809 16 Brouqui P, Lascola B, Roux V, Raoult D: Chronic *Bartonella quintana* bacteremia
1810 in homeless patients. N Engl J Med 340:184-189 (1999b).
- 1811 17 Brouqui P, Raoult D: Arthropod-borne diseases in homeless. Ann N Y Acad Sci
1812 1078:223-235 (2006a).
- 1813 18 Brouqui P, Raoult D: New insight into the diagnosis of fastidious bacterial
1814 endocarditis. FEMS Immunol Med Microbiol 47:1-13 (2006b).

- 1815 19 Carithers HA: Cat-scratch disease. Am J Dis Child 119:200-203 (1970).
- 1816 20 Conrad DA: Treatment of cat-scratch disease. Curr Opin Pediatr 13:56-59 (2001).
- 1817 21 Curi AL, Machado DO, Heringer G, Campos WR, Orefice F: Ocular manifestation
1818 of cat-scratch disease in HIV-positive patients. Am J Ophthalmol 141:400-401
1819 (2006).
- 1820 22 Debru R, Lamy M, Jammet ML, Costil L, Mozziconacci P: La maladie des griffes
1821 du chat. Societe Medecale des Hopitaux de Paris 66:76-79 (1950).
- 1822 23 Dehio C, Lanz C, Pohl R, Behrens P, Bermond D, Piemont Y, Pelz K, Sander A:
1823 *Bartonella schoenbuchii* sp. nov., isolated from the blood of wild roe deer. Int J
1824 Syst Evol Microbiol 51:1557-1565 (2001).
- 1825 24 Dorbecker C, Sander A, Oberle K, Schulin-Casonato T: In vitro susceptibility of
1826 Bartonella species to 17 antimicrobial compounds: comparison of Etest and agar
1827 dilution. J Antimicrob Chemother 58:784-788 (2006).
- 1828 25 Drancourt M, Raoult D: *rpoB* gene sequence-based identification of *Staphylococcus*
1829 species. J Clin Microbiol 40:1333-1338 (2002).
- 1830 26 Drlica K, Malik M: Fluoroquinolones: action and resistance. Curr Top Med Chem
1831 3:249-282 (2003).

- 1832 27 Fournier PE, Taylor C, Rolain JM, Barrassi L, Smith G, Raoult D: *Bartonella*
1833 *australis* sp. nov. from kangaroos, Australia. Emerg Infect Dis 13:1961-1962
1834 (2007).
- 1835 28 GREER WE, KEEFER CS: Cat-scratch fever; a disease entity. N Engl J Med
1836 244:545-548 (1951).
- 1837 29 Heisig P, Tschorny R: Characterization of fluoroquinolone-resistant mutants of
1838 *Escherichia coli* selected in vitro. Antimicrob Agents Chemother 38:1284-1291
1839 (1994).
- 1840 30 Helfand MS, Bonomo RA: Current challenges in antimicrobial chemotherapy: the
1841 impact of extended-spectrum beta-lactamases and metallo-beta-lactamases on the
1842 treatment of resistant Gram-negative pathogens. Curr Opin Pharmacol 5:452-458
1843 (2005).
- 1844 31 Henriquez C, Hinojosa JC, Ventosilla P, Infante B, Merello J, Mallqui V,
1845 Verastegui M, Maguina C: Report of an unusual case of persistent bacteremia by
1846 *Bartonella bacilliformis* in a splenectomized patient. Am J Trop Med Hyg 71:53-55
1847 (2004).
- 1848 32 Houpikian P, Raoult D: Western immunoblotting for *Bartonella* endocarditis. Clin
1849 Diagn Lab Immunol 10:95-102 (2003).

- 1850 33 Hurst H: Trench fever. Br Med J 70:318-320 (1942).
- 1851 34 Ihler GM: *Bartonella bacilliformis*: Dangerous pathogen slowly emerging from
1852 deep background. FEMS Microbiol Lett 144:1-11 (1996).
- 1853 35 Ives TJ, Marston EL, Regnery RL, Butts JD: In vitro susceptibilities of Bartonella
1854 and Rickettsia spp. to fluoroquinolone antibiotics as determined by
1855 immunofluorescent antibody analysis of infected Vero cell monolayers. Int J
1856 Antimicrob Agents 18:217-222 (2001).
- 1857 36 Jacomo V, Kelly PJ, Raoult D: Natural History of Bartonella Infections (an
1858 Exception to Koch's Postulate). Clin Diagn Lab Immunol 9:8-18 (2002).
- 1859 37 Kelly P, Angelakis E, Raoult D.: Rickettsia and Rickettsia-like Organisms :
1860 Clinical Infectious Diseases 2008).
- 1861 38 Kenny GE, Cartwright FD: Susceptibility of *Mycoplasma pneumoniae* to several
1862 new quinolones, tetracycline, and erythromycin. Antimicrob Agents Chemother
1863 35:587-589 (1991).
- 1864 39 Kenny GE, Hooton TM, Roberts MC, Cartwright FD, Hoyt J: Susceptibilities of
1865 genital mycoplasmas to the newer quinolones as determined by the agar dilution
1866 method. Antimicrob Agents Chemother 33:103-107 (1989).

- 1867 40 Kocagoz S, Akova M, Altun B, Gur D, Hascelik G: In vitro activities of new
1868 quinolones against *Brucella melitensis* isolated in a tertiary-care hospital in Turkey.
1869 Clin Microbiol Infect 8:240-242 (2002).
- 1870 41 Koehler JE, Tappero JW: Bacillary angiomatosis and bacillary peliosis in patients
1871 infected with human immunodeficiency virus. Clin Infect Dis 17:612-624 (1993).
- 1872 42 Kordick DL, Papich MG, Breitschwerdt B: Efficacy of enrofloxacin or doxycycline
1873 for treatment of *Bartonella henselae* or *Bartonella clarridgeiae* infection in cats.
1874 Antimicrob Agents Chemother 41:2448-2455 (1997).
- 1875 43 Kosoy M, Morway C, Sheff KW, Bai Y, Colborn J, Chalcraft L, Dowell SF,
1876 Peruski LF, Maloney SA, Baggett H, Sutthirattana S, Sidhirat A, Maruyama S,
1877 Kabeya H, Chomel BB, Kasten R, Popov V, Robinson J, Kruglov A, Petersen LR:
1878 *Bartonella tamiae* sp. nov., a newly recognized pathogen isolated from three human
1879 patients from Thailand. J Clin Microbiol 46:772-775 (2008a).
- 1880 44 Kosoy M, Morway C, Sheff KW, Bai Y, Colborn J, Chalcraft L, Dowell SF,
1881 Peruski LF, Maloney SA, Baggett H, Sutthirattana S, Sidhirat A, Maruyama S,
1882 Kabeya H, Chomel BB, Kasten R, Popov V, Robinson J, Kruglov A, Petersen LR:
1883 *Bartonella tamiae* sp. nov., a newly recognized pathogen isolated from three human
1884 patients from Thailand. J Clin Microbiol 46:772-775 (2008b).

- 1885 45 Kostrzewski J: The epidemiology of Trench fever. Bul de l'Academie polonaise des
1886 sciences et des lettres Classe de Medicine 7:233-263 (1949).
- 1887 46 Kymionis GD, Siganos CS, Pallikaris IG: Late onset of serologic positive titers in a
1888 patient with Parinaud's oculoglandular syndrome. Semin Ophthalmol 19:125-126
1889 (2004).
- 1890 47 La Scola B, Zeaiter Z, Khamis A, Raoult D: Gene-sequence-based criteria for
1891 species definition in bacteriology: the *Bartonella* paradigm. Trends Microbiol
1892 11:318-321 (2003).
- 1893 48 Lepidi H, Coulibaly B, Casalta JP, Raoult D: Autoimmunohistochemistry: a new
1894 method for the histologic diagnosis of infective endocarditis. J Infect Dis 193:1711-
1895 1717 (2006).
- 1896 49 Li DM, Liu QY, Yu DZ, Zhang JZ, Gong ZD, Song XP: Phylogenetic analysis of
1897 *Bartonella* detected in rodent fleas in Yunnan, China. J Wildl Dis 43:609-617
1898 (2007).
- 1899 50 Logan JS: Trench fever in Belfast, and the nature of the 'relapsing fevers' in the
1900 United Kingdom in the nineteenth century. Ulster Med J 58:83-88 (1989).

- 1901 51 Maco V, Maguina C, Tirado A, Maco V, Vidal JE: Carrion's disease (Bartonellosis
1902 bacilliformis) confirmed by histopathology in the High Forest of Peru. Rev Inst
1903 Med Trop Sao Paulo 46:171-174 (2004).
- 1904 52 Maggi RG, Duncan AW, Breitschwerdt EB: Novel chemically modified liquid
1905 medium that will support the growth of seven *Bartonella* species. J Clin Microbiol
1906 43:2651-2655 (2005).
- 1907 53 Margileth AM: Antibiotic therapy for cat scratch disease : clinical study of
1908 therapeutic outcome in 268 patients and a review of the literature. Pediatr Infect Dis
1909 J 11:474-478 (1992).
- 1910 54 Mason RA: Propagation and growth cycle of *Rickettsia quintana* in a new liquid
1911 medium. J Bacteriol 103:184-190 (1970).
- 1912 55 Masselot F, Boulos A, Maurin M, Rolain JM, Raoult D: Molecular evaluation of
1913 antibiotic susceptibility, the *Tropheryma whipplei* paradigm. Antimicrob Agents
1914 Chemother 47:1658-1664 (2003).
- 1915 56 Massidda O, Rossolini GM, Satta G: The *Aeromonas hydrophila* cphA gene:
1916 molecular heterogeneity among class B metallo-beta-lactamases. J Bacteriol
1917 173:4611-4617 (1991).

- 1918 57 Maurin M, Raoult D: *Bartonella (Rochalimaea) quintana* infections. Clin Microbiol
1919 Rev 9:273-292 (1996).
- 1920 58 Maurin M, Roux V, Stein A, Ferrier F, Viraben R, Raoult D: Isolation and
1921 characterization by immunofluorescence, SDS-PAGE, Western blot, RFLP-PCR,
1922 16S rRNA gene sequencing and pulsed-field gel electrophoresis of *Rochalimaea*
1923 *quintana* from a french patient with bacillary angiomatosis. J Clin Microbiol
1924 32:1166-1171 (1994).
- 1925 59 Minnick MF, Wilson ZR, Smitherman LS, Samuels DS: gyrA Mutations in
1926 Ciprofloxacin-Resistant Bartonella bacilliformis Strains Obtained In Vitro.
1927 Antimicrob Agents Chemother 47:383-386 (2003).
- 1928 60 Myers WF, Cutler LD, Wisseman CL, Jr.: Role of erythrocytes and serum in the
1929 nutrition of *Rickettsia quintana*. J Bacteriol 97:663-666 (1969).
- 1930 61 Myers WF, Osterman JV, Wisseman CL, Jr.: Nutritional studies of *Rickettsia*
1931 *quintana*: nature of the hematin requirement. J Bacteriol 109:89-95 (1972).
- 1932 62 Noguchi H: Etiology of Oroya fever. III The behavior of *Bartonella bacilliformis* in
1933 *Macacus rhesus*. J Exp Med 44:697-714 (1926).
- 1934 63 Pendle S, Ginn A, Iredell J: Antimicrobial susceptibility of Bartonella henselae
1935 using Etest methodology. J Antimicrob Chemother 57:761-763 (2006).

- 1936 64 Raoult D, Roblot F, Rolain JM, Besnier JM, Loulergue J, Bastides F, Choutet P:
1937 First isolation of *Bartonella alsatica* from a valve of a patient with
1938 endocarditis. J Clin Microbiol 44:278-279 (2006).
- 1939 65 Renesto P, Gouvernet J, Drancourt M, Roux V, Raoult D: Use of *rpoB* gene
1940 analysis for detection and identification of *Bartonella* species. J Clin Microbiol
1941 39:430-437 (2001).
- 1942 66 Renesto P, Lorvellec-Guillon K, Drancourt M, Raoult D: RpoB gene analysis as a
1943 novel strategy for identification of spirochetes from the genera *Borrelia*,
1944 *Treponema*, and *Leptospira*. J Clin Microbiol 38:2200-2203 (2000).
- 1945 67 RICKETTS WE: Clinical manifestations of Carrion's disease. Arch Med Interna
1946 84:751-81, illust (1949).
- 1947 68 Rolain JM, Brouqui P, Koehler JE, Maguina C, Dolan MJ, Raoult D:
1948 Recommendations for treatment of human infections caused by *Bartonella* species.
1949 Antimicrob Agents Chemother 48:1921-1933 (2004).
- 1950 69 Rolain JM, La Scola B, Liang Z, Davoust B, Raoult D: Immunofluorescent
1951 Detection of Intraerythrocytic *Bartonella henselae* in Naturally Infected Cats. J Clin
1952 Microbiol 39:2978-2980 (2001).

- 1953 70 Rolain JM, Lepidi H, Zanaret M, Triglia JM, Michel G, Thomas PA, Texereau M,
1954 Stein A, Romaru A, Eb F, Raoult D: Lymph node biopsy specimens and diagnosis
1955 of cat-scratch disease. *Emerg Infect Dis* 12:1338-1344 (2006).
- 1956 71 Sanogo YO, Zeaiter Z, Caruso G, Merola F, Shpynov S, Brouqui P, Raoult D:
1957 *Bartonella henselae* in *Ixodes ricinus* Ticks (Acari: Ixodida) Removed from
1958 Humans, Belluno Province, Italy. *Emerg Infect Dis* 9:329-332 (2003).
- 1959 72 Seubert A, Falch C, Birtles RJ, Schulein R, Dehio C: Characterization of the cryptic
1960 plasmid pBGR1 from *Bartonella grahamii* and construction of a versatile
1961 *Escherichia coli*-*Bartonella* spp. shuttle cloning vector. *Plasmid* 49:44-52 (2003).
- 1962 73 Spach DH, Kanter AS, Dougherty MJ, Larson AM, Coyle MB, Brenner DJ,
1963 Swaminathan B, Matar GM, Welch DF, Root RK, Stamm WE: *Bartonella*
1964 (*Rochalimaea*) *quintana* bacteremia in inner-city patients with chronic alcoholism.
1965 *N Engl J Med* 332:424-428 (1995).
- 1966 74 Stoler MH, Bonfiglio TA, Steigbigel RT, Pereira M: An atypical subcutaneous
1967 infection associated with acquired immune deficiency syndrome. *Am J Clin Pathol*
1968 80:714-718 (1983).
- 1969 75 Swift HF: Trench fever. *The Harvey Lecture series XV*:58-86 (1920).

- 1970 76 Trujillano-Martin I, Garcia-Sanchez E, Fresnadillo MJ, Garcia-Sanchez JE, Garcia-
1971 Rodriguez JA, Montes M, I: In vitro activities of five new antimicrobial agents
1972 against *Brucella melitensis*. *Int J Antimicrob Agents* 12:185-186 (1999).
- 1973 77 Van Bambeke F, Balzi E, Tulkens PM: Antibiotic efflux pumps. *Biochem*
1974 *Pharmacol* 60:457-470 (2000).
- 1975 78 Van BF, Michot JM, Van EJ, Tulkens PM: Quinolones in 2005: an update. *Clin*
1976 *Microbiol Infect* 11:256-280 (2005).
- 1977 79 Vinson JW, Fuller HS: Studies on trench fever. 1. Propagation of rickettsia-like
1978 organisms from a patient's blood. *Pathol Microbiol* 24:S152-S166 (1961).
- 1979 80 Weiss E: Biochemistry and metabolism of rickettsiae : current trends, Burgdorfer
1980 W, Anacker R (eds): *Rickettsiae and rickettsial diseases*, pp 387-400 (Academic
1981 Press, New York 1981).
- 1982 81 Weiss E, Moulder JW: Order I *Rickettsiales*, Gieszczkiewicz 1939, Krieg NR, Holt
1983 JG (eds): *Bergey's manual of systematic bacteriology* 1 ed., pp 687-703 (Williams
1984 & Wilkins, Baltimore 1984).
- 1985
- 1986