

საქართველოში გამოყოფილი *Brucella melitensis*-ის  
მოლეკულურ-გენეტიკური შესწავლა

მარინე რამიშვილი

სადისერტაციო ნაშრომი წარმოდგენილია  
საქართველოს აგრარული უნივერსიტეტის  
აგრარულ მეცნიერებების საბჭოზე  
აგრარულ მეცნიერებათა დოქტორის აკადემიური ხარისხის  
მოსაპოვებლად

სამეცნიერო ხელმძღვანელები:

პაატა იმნაძე, სრული პროფ. მედიცინის აკადემიური დოქტორი,  
მერაბ ნათიძე, სრული პროფ. ვეტერინარიის მეცნიერებათა დოქტორი.

საქართველოს აგრარული უნივერსიტეტი  
თბილისი, 2017

**დარგობრივი კომისიის რეკომენდაცია**

დისერტანტი: მარინე რამიშვილი

დისერტაციის სათაური: „საქართველოში გამოყოფილი *Brucella melitensis*-ის მოლეკულურ-გენეტიკური შესწავლა”

დისერტაციის დაცვის თარიღი:

ოპონენტი 1: გიორგი მუსხელიშვილი

ოპონენტი 2: გიორგი მელაშვილი

რეკომენდებულია დაცვისათვის /დარგის/ დარგობრივი კომისიის მიერ.

თავჯდომარე, ანა ბოკუჩავა : \_\_\_\_\_

(ხელმოწერა)

წევრი, /სახელი, გვარი/ : \_\_\_\_\_

(ხელმოწერა)

წევრი /სახელი, გვარი/ : \_\_\_\_\_

(ხელმოწერა)

სადოქტორო სკოლის კოორდინატორი: \_\_\_\_\_ ნატო კობახიძე

(ხელმოწერა)

თარიღი:

## ავტორის დეკლარაცია

*„როგორც წარმოდგენილი სადოქტორო დისერტაციის ავტორი, ვაცხადებ, რომ ჩემი დისერტაცია წარმოადგენს ორიგინალურ ნაშრომს და მასში სხვა ავტორების აქამდე გამოქვეყნებული, გამოსაქვეყნებლად მიღებული ან დასაცავად წარდგენილი მასალები გამოყენებულია ციტირების სათანადო წესების დაცვით“.*

მარინე რამიშვილი

(ხელმოწერა)

თარიღი:

## აბსტრაქტი

### საქართველოში გამოყოფილი *Brucella melitensis*-ის მოლეკულურ-გენეტიკური შესწავლა

**შესავალი:** ბრუცელოზი ფართოდ გავრცელებული ზოონოზური ინფექციაა, რომელიც საგრძნობ ზიანს აყენებს ეკონომიკას. ინფექციის წყაროდან ადამიანის დასნებოვნება შესაძლოა მოხდეს დაავადებულ ცხოველთან კონტაქტით და/ან დაინფიცირებული საკვების მიღებით. ბრუცელოზის გამომწვევი მიეკუთვნება ბიოლოგიურად საშიში პათოგენების „ბ“ ჯგუფს.

**მიზანი:** აღნიშნული კვლევის ძირითად მიზანს წარმოადგენდა საქართველოში 2009–2011 წწ-ში *B. melitensis* შტამების გამოყოფა და მათი გენეტიკური დახასიათება.

**მეთოდები:** კვლევის ფარგლებში შეგროვებული ცხვრის, თხის და ძროხის შრატები გამოვიკვლიეთ როზ-ბენგალის რეაქციით. აღნიშნული ტესტით გამოკვლეული დადებითი და საეჭვო შრატები გამოვიკვლიეთ აგლუტინაციის ჩვენს მიერ მოდიფიცირებული დაჩქარებული რეაქციით და საკონფირმაციო სეროლოგიური ტესტებით (C-ELISA, FPA). სისხლი, რძე და ლიმფური ჯირკვლები გავთესეთ შესაბამის საკვებ არეებზე. გამოყოფილი იზოლატები შევისწავლეთ ბიოქიმიური ტესტებით და დავადასტურეთ მათი ბრუცელას გვარისადმი კუთვნილება პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქციით რეალურ დროში. ბრუცელას სახეობების დიფერენციაციისთვის გამოყოფილი იზოლატები დავატიპირეთ AMOS PCR და SNP მეთოდებით, სახეობებს შიგნით არსებული შესაძლო გენეტიკური განსხვავებების გამოვლენის მიზნით დავახასიათეთ MLVA-8 მეთოდით და მიღებული მონაცემების საფუძველზე BioNumerics 6.1 პროგრამით ავაგეთ დენდროგრამა.

**შედეგები:** გამოვიკვლიეთ 991 სული მსხვილფეხა და წვრილფეხა პირუტყვისგან აღებული 1396 ნიმუში. როზ-ბენგალის ტესტით გამოკვლევის შედეგად დადებითად მორეაგირე აღმოჩნდა 19.07% ცხოველი. დადებითი შრატების აგლუტინაციის დაჩქარებული რეაქციით პარალელური შესწავლით მივიღეთ როზ-ბენგალის ტესტით გამოკვლევის ანალოგიური შედეგები. როზ-ბენგალის ტესტით

გამოკვლევული 991 შრატიდან 22 დადებითი და 11 საექვო ცხვრის შრატის აგლუტინაციის დაჩქარებული რეაქციით პარალელური შესწავლისას მივიღეთ საკონფირმაციო ტესტებით (C-ELISA, FPA) გადამოწმების იდენტური შედეგები (22 დადებითი და 11 უარყოფითი). ცხოველების პათოლოგიური მასალის 405 ნიმუშის გათესვით შესაბამის საკვებ არეებზე მივიღეთ ბრუცელაზე საექვო 13 კულტურა. გამოყოფილი იზოლატების მიკრობიოლოგიური მეთოდებით შესწავლის და შედეგების პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქციით რეალურ დროში (real-time PCR) დადასტურების შემდეგ გენეტიკურ დონეზე ჩატარებული კვლევების (AMOS PCR და SNP) შედეგად 3 იზოლატი დატიპირდა როგორც *B. melitensis*, 5 როგორც *B. abortus*, ხოლო 5 იზოლატი სრული გენომური სექვენირების მეთოდით შესწავლის შემდეგ აღმოჩნდა *Ochrobactrum*-ის გვარის წარმომადგენელი. მრავლობითი ლოკუსების ტანდემურად განმეორებადი თანმიმდევრობების ცვლადი რაოდენობის (MLVA-8) ანალიზის შედეგად ბრუცელას შტამები განლაგდა 2 დიდ განშტოებად – *B. melitensis* და *B. abortus*. ორივე შტო თავის მხრივ დაიყო ცხრა ქვეჯგუფად, რომელთაგან ორი ქვეჯგუფი წარმოდგენილი იყო *B. melitensis* და *B. abortus*-ის თითო შტამით.

**დასკვნა:** ჩატარებული მოლეკულურ-გენეტიკური კვლევის შედეგებმა ცხადყო საქართველოს ტერიტორიაზე მოცირკულირე *B. melitensis* და *B. abortus* შტამების მრავალფეროვნება და ამავე დროს ამ მიმართულებით მოლეკულურ-ბიოლოგიური გამოკვლევების გაგრძელების აუცილებლობა დღეისათვის ბრუცელოზის ირგვლივ არსებული ცოდნის გასადრმაველად.

**საძიებო სიტყვები:** 1. ბრუცელოზი, 2. აგლუტინაციის დაჩქარებული რეაქცია, 3. დენდროგრამა, 4. SNP, 5. MLVA-8

ხელმძღვანელები: სახელი, გვარი (ხელმოწერა)

პაატა იმნაძე

მერაბ ნათიძე

## Abstract

### Molecular-Genetic Study of *B. melitensis* Strains Isolated in Georgia

**Background:** Brucellosis is widespread zoonotic infection associated with an enormous economic loss. Humans might be affected by direct contact with infected animals and/or ingestion of contaminated animal products. *Brucella* belongs to the class „B” of select agents.

**Objective:** The goal of this study was the genetic characterization of *B. melitensis* strains isolated in Georgia within 2009-2011.

**Methods:** Sera, collected from cattle, sheep and goats were screened using Rose Bengal test. Samples with positive and equivocal results were subjected to confirmatory serological tests (C-ELISA, FPA) and accelerated agglutination reaction, modified by us. Blood and milk samples, as well as lymphoid tissues were plated to isolate cultures. Isolates were subjected to biochemical tests, followed by real-time PCR to confirm strains as *Brucella* spp. Identification of *Brucella* species was performed by AMOS PCR and SNP assay. Genetic relationship among isolates was described using MLVA-8 approach. Data were analyzed by BioNumerics v.6.1 software.

**Results:** We have studied 1396 samples from 991 cattle and small ruminants. By Rose Bengal assay 19.07% of sera were positive, which were parallelly studied by accelerated agglutination reaction and similar results were obtained. Of 991, 22 positive samples were confirmed as positive, whereas 11 equivocal samples tested negative when subjected to confirmatory serological tests. Furthermore, results similar to confirmatory test results were obtained through the accelerated agglutination reaction. Thirteen suspected *Brucella* isolates were recovered from 405 samples. Microbiological and biochemical testing suggested their belonging to the genus *Brucella* that was further confirmed by real-time PCR. Based on AMOS-PCR and SNP analysis 3 isolates were typed as *B. melitensis* and 5 – as *B. abortus*. In addition, 5 strains failed to be typed by either of AMOS or SNP approach, were identified as *Ochrobactrum* spp. as a result of Whole Genome Sequencing. Data of MLVA-8 typing placed *Brucella* isolates into two major (*B. melitensis*, *B. abortus*) groups consisting of nine sub-groups, 2 of which were represented by single strain.

**Conclusion:** Our data suggest that *B.melitensis* and *B.abortus* strains circulating in Georgia are quite diverse. It also demonstrates the need of continuation *Brucella* research in Georgia in order to strengthen current knowledge.

**Key Words:** 1. Brucellosis, 2. Modified accelerated agglutination reaction, 3. Dendrogram, 4. SNP, 5. MLVA-8

ხელმძღვანელები: სახელი, გვარი (ხელმოწერა)

პაატა იმნაძე

მერაბ ნათიძე

## მადლობა



საქართველოს აგრარული უნივერსიტეტის რექტორატს და ადმინისტრაციას, განსაკუთრებით პროფესორებს: ანა ბოკუჩავას, ნატო კობახიძეს, ლევან მაკარაძეს, გიორგი ზაალიშვილს.



შპს „იმუნოგენი“ – დირექტორის მოადგილეს, სამუშაოს სამეცნიერო ხელმძღვანელს პროფესორ მერაბ ნათიძეს.



ლ. საყვარელიძის სახელობის დაავადებათა კონტროლისა და საზოგადოებრივი ჯანმრთელობის ეროვნული ცენტრის (დკსჯეც) დირექტორის მოადგილეს და სამუშაოს სამეცნიერო ხელმძღვანელს პროფესორ პაატა იმნაძეს.

დკსჯეც თანამშრომლებს, განსაკუთრებით: პროფესორ გურამ კაციტაძეს, დოქტორ მერაბ კეკელიძეს, პროფესორ შოთა ცანავას, ეკა ჟღენტს, ქეთევან სიდამონიძეს, დოქტორებს: გვანცა ჭანტურიას, ადამ კოტორაშვილს, გიორგი ჩახუნაშვილს, ლილე მალანიას.



სოფლის მეურნეობის სამინისტროს ლაბორატორიის თანამშრომლებს გაწეული დახმარებისთვის, განსაკუთრებით: მარინა დონდუაშვილს, ქეთევან გოგინაშვილს, თამარ თილილაურს, მარინა ნიკოლაიშვილს და გაგა ოსიაშვილს.



სურსათის ეროვნული სააგენტოს ვეტერინარიის დეპარტამენტის უფროსს, დოქტორ ლაშა ავალიანს სახელმწიფო ვეტერინარული სამსახურების მიერ განხორციელებული ბრუცელოზის პრევენციის და კონტროლის ღონისძიებების შესახებ ინფორმაციის მოწოდებისათვის.



DTRA – აშშ საფრთხის შემცირების სააგენტოს, გაწეული ფინანსური დახმარებისათვის.



WRAIR – ვოლტერ რიდის სამხედრო კვლევით ინსტიტუტს, მერილენდი, აშშ, პროფესორ ნინო ტრაპაიძეს, დოქტორ მაიკლჯონ ნიკოლიჩს, ერთობლივ სამუშაოში შეტანილი წვლილისა და გაწეული ფინანსური დახმარებისათვის.



## სარჩევი

დარგობრივი კომისიის რეკომენდაცია .....	II
ავტორის დეკლარაცია .....	III
აბსტრაქტი .....	IV
მადლობა.....	VIII
სარჩევი .....	IX
ცხრილების ჩამონათვალი .....	XI
სურათების ჩამონათვალი .....	XIII
სქემების ჩამონათვალი .....	XIV
აბრევიატურები .....	XV
1. შესავალი.....	1
1.1. თემის აქტუალობა .....	1
1.2 მიზანი და ამოცანები: .....	4
2. ლიტერატურის მიმოხილვა .....	5
2.1 ბრუცელოზი. ვეტერინარიისა და მედიცინის პრობლემა .....	5
2.2 ბრუცელათა სახეობები, მათი გავრცელება და დაავადების მიმდინარეობა.....	8
2.3 ცხოველებში ბრუცელოზის ლაბორატორიული დიაგნოსტიკა.....	17
2.3.1 სეროლოგიური ტესტები.....	17
2.3.2 ბაქტერიოლოგიური დიაგნოსტიკა .....	25
2.3.3 მოლეკულური დიაგნოსტიკა .....	29
2.4 საქართველოში ბრუცელოზის გავრცელების დინამიკა შინაურ პირუტყვში 2007-2012 წწ.....	33
3. მასალა და მეთოდები.....	37
3.1 გამოკვლეული მასალა .....	37
3.2 ბაქტერიოლოგიური გამოკვლევა .....	40
3.2.1 მორფოლოგიური თვისებების შესწავლა .....	41
3.2.2 ბიოქიმიური აქტივობის შესწავლა .....	43
3.2.3 მგრძობელობა საღებავების მიმართ .....	45
3.2.4 ანტიბიოტიკომგრძობელობის შესწავლა.....	46
3.3 სეროლოგიური გამოკვლევა.....	47
3.3.1 როზ-ბენგალის ტესტი (რბტ).....	47
3.3.2 სინჯარული აგლუტინაცია (რაიტის რეაქცია).....	48
3.3.3 კონკურენტული (ენზიმ შეკავშირებული იმუნოსორბენტული) იმუნოფერმენტული ანალიზი (C-ELISA).....	49
3.3.4 აგლუტინაციის დაჩქარებული რეაქცია .....	51
3.3.5 ფლუორესცენტული პოლარიზაციის რეაქცია – FPA (Fluorescence polarization assay) (ერთი სინჯარის ტესტირების პროცედურა) .....	55
3.4 მოლეკულური დიაგნოსტიკა.....	56
3.4.1 ბრუცელას შტამების ინაქტივაცია .....	57
3.4.2 დნმ-ის ექსტრაქცია .....	57
3.4.3 პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქცია რეალურ დროში (real-time PCR) .....	58
3.4.4 AMOS PCR .....	58

3.4.5. ერთ-ნუკლეოტიდური პოლიმორფიზმი (Single Nucleotide Polymorphism (SNP))	61
3.4.6 მრავლობითი ლოკუსების ტანდემურად განმეორებადი თანმიმდევრობების ცვლადი რაოდენობის ანალიზი MLVA-8 (MLVA – Multiple Locus Variable-Number Tandem Repeat (VNTR) Analysis)	68
3.5 შერჩევის მეთოდოლოგია და მონაცემთა სტატისტიკური ანალიზი	71
4. მიღებული შედეგები	73
4.1 მსხვილფეხა და წვრილფეხა პირუტყვის სისხლის შრატების როზ-ბენგალის ტესტით, აგლუტინაციის დაჩქარებული რეაქციით, ფლუორესცენტული პოლარიზაციის რეაქციით და კონკურენტული იმუნოფერმენტული ანალიზით გამოკვლევის შედეგები	73
4.2 მონაცემთა სტატისტიკური ანალიზი	79
4.3 წვრილფეხა და მსხვილფეხა პირუტყვიდან გამოყოფილი <i>B. melitensis</i> -ის იზოლატების ბიოლოგიური ნიშან-თვისებების შესწავლის შედეგები	82
4.3.1 კულტურალური თვისებები	82
4.3.2 მორფოლოგიური თვისებები	85
4.3.3 ბიოქიმიური თვისებები	85
4.4 ანტიბიოტიკომგრძობელობის განსაზღვრა	90
4.5 გამოყოფილ <i>B. melitensis</i> კულტურათა მოლეკულურ-გენეტიკური დახასიათება	92
4.5.1 პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქცია რეალურ დროში (real-time PCR)	92
4.5.2 AMOS PCR	94
4.5.3 ერთ-ნუკლეოტიდური პოლიმორფიზმი (SNP)	96
4.5.4 მრავლობითი ლოკუსების ტანდემურად განმეორებადი თანმიმდევრობების ცვლადი რაოდენობის ანალიზი (MLVA-8)	101
4.5.5 საქართველოში გამოყოფილი <i>Brucella spp.</i> შტამების MLVA-8 ტიპირების დენდროგრამა	104
5. მიღებული შედეგების განხილვა	108
6. დასკვნები:	113
7. პრაქტიკული რეკომენდაციები:	114
8. ბიბლიოგრაფია	115

## ცხრილების ჩამონათვალი

ცხრილი 1. ბრუცელას სახეობები, მათი ძირითადი მასპინძლები და ადამიანისთვის პათოგენობა.....	10
ცხრილი 2. ბრუცელოზის სადიაგნოსტიკოდ არსებული სეროლოგიური ტესტების მგრძნობელობის, სპეციფიკურობის და შესრულების ინდექსის მაჩვენებლები (Poester et al., 2010).....	18
ცხრილი 3. ბრუცელას სახეობათა ბიოქიმიური ტესტირება.....	28
ცხრილი 4. შეგროვებული ნიმუშები, ნიმუშის ტიპის, რეგიონისა და წლების მიხედვით.....	38
ცხრილი 5. ბრუცელოზის სამკურნალო ანტიბიოტიკების შეფასების ზონები.....	46
ცხრილი 6. C-ELISA პლანშეტის საილუსტრაციო გეგმა.....	50
ცხრილი 7. ფლუორესცენტული პოლარიზაციის რეაქციის შედეგების ინტერპრეტაცია.....	56
ცხრილი 8. real-time PCR-ის პირობები (Idaho Technology, <i>Brucella</i> , T1).....	58
ცხრილი 9. მულტიპლექს AMOS PCR-ით ტიპირების პირობები.....	59
ცხრილი 10. ერთ-ნუკლეოტიდური პოლიმორფიზმის რეაქციაში ბრუცელას სახეობების სადიფერენციაციო პრაიმერები.....	62
ცხრილი 11. SNP ტიპირების PCR პირობები.....	63
ცხრილი 12. ერთი ნუკლეოტიდით დაგრძელების რეაქციისთვის პრაიმერების ნარევის მომზადება.....	64
ცხრილი 13. ერთი ნუკლეოტიდით დაგრძელების რეაქციის პირობები.....	65
ცხრილი 14. SNP რეაქციის პროდუქტის გამწმენდი ნარევი.....	65
ცხრილი 15. ბრუცელას სახეობების დიფერენცირებისთვის სპეციფიკური SNP პროფილები.....	66
ცხრილი 16. საბოლოო მულტიპლექს SNP რეაქციის სპეციფიკური პრაიმერების მახასიათებლები.....	67
ცხრილი 17. MLVA-8 ანალიზისთვის გამოყენებული 8 სამიზნე უბნის თანმიმდევრობა.....	69
ცხრილი 18. MLVA-8 ანალიზის სარეაქციო ნარევი.....	69
ცხრილი 19. MLVA-8 ანალიზში გამოყენებული პრაიმერების ნარევი.....	70
ცხრილი 20. MLVA-8 ტიპირების PCR პირობები.....	70
ცხრილი 21. მსხვილფეხა და წვრილფეხა რქოსანი პირუტყვის შრატების ბრუცელოზზე როზ-ბენგალის ტესტით გამოკვლევის შედეგები.....	73
ცხრილი 22. წვრილფეხა და მსხვილფეხა რქოსანი პირუტყვის შრატების ბრუცელოზზე აგლუტინაციის დაჩქარებული რეაქციით და როზ-ბენგალის ტესტით გამოკვლევის შედეგები.....	75

ცხრილი 23. სოფლის მეურნეობის სამინისტროს ლაბორატორიის მიერ როზ-ბენგალის ტესტით, კონკურენტული იმუნოფერმენტული ანალიზით და ფლუორესცენტული პოლარიზაციის რეაქციით ცხვრის შრატების ბრუცელოზზე გამოკვლევის შედეგები .....	76
ცხრილი 24. კონკურენტული იმუნოფერმენტული ანალიზის (C-ELISA) საილუსტრაციო გეგმა-ცხრილი .....	77
ცხრილი 25. აგლუტინაციის დაჩქარებული, კონკურენტული იმუნოფერმენტული და ფლუორესცენტული პოლარიზაციის რეაქციებით ბრუცელოზზე ცხვრის შრატების გამოკვლევის შედეგები .....	78
ცხრილი 26. წვრილი რქოსანი პირუტყვის შრატების აგლუტინაციის დაჩქარებული და რაიტის რეაქციებით გამოკვლევის შედეგები .....	78
ცხრილი 27. მსხილფეხა რქოსანი პირუტყვის როზ-ბენგალის ტესტით გამოკვლევის შედეგები რეგიონების მიხედვით .....	79
ცხრილი 28. წვრილფეხა რქოსანი პირუტყვის როზ-ბენგალის ტესტით გამოკვლევის შედეგები რეგიონების მიხედვით .....	81
ცხრილი 29. ბაქტერიოლოგიურად გამოკვლეული პათოლოგიური მასალა .....	82
ცხრილი 30. ცხოველური ნიმუშებიდან გამოყოფილი <i>Brucella spp.</i> შტამები .....	83
ცხრილი 31. <i>Brucella spp.</i> იზოლატების ლაბორატორიული ტესტირების შედეგები ...	88
ცხრილი 32. ცხოველური ნიმუშებიდან გამოყოფილი ბრუცელას შტამების ანტიბიოტიკომგრძობლობის შედეგები .....	90
ცხრილი 33. გამოყოფილი იზოლატების ანტიბიოტიკომგრძობლობის შესწავლის ჯამური მაჩვენებლები .....	91
ცხრილი 34. Light Cycler 2.0 აპარატზე შესრულებული real-time PCR შედეგების ხარისხობრივი ანალიზის მენიუს თარგმანი .....	93
ცხრილი 35. real-time PCR დეტექციის ზღურბლის (CP) მაჩვენებლები .....	94
ცხრილი 36. ცხოველური ნიმუშებიდან სოფლის მეურნეობის სამინისტროს ლაბორატორიის მიერ გამოყოფილი <i>Brucella melitensis</i> -ის შტამები .....	97
ცხრილი 37. AMOS PCR-ით და SNP მეთოდით დატიპირებული ცხოველური ნიმუშებიდან გამოყოფილი <i>Brucella spp.</i> შტამები .....	97
ცხრილი 38. SNP ტიპირების შედეგები .....	100
ცხრილი 39. მულტიპლექსური MLVA-8 ტიპირების შედეგები .....	102

## სურათების ჩამონათვალი

სურათი 1. მსხვილფეხა და წვრილფეხა პირუტყვის განაწილება წლების მიხედვით	38
სურათი 2. გრამ-უარყოფითი ბრუცელები	42
სურათი 3. PCR შედეგების ვიზუალიზაცია, აგაროზის გელ-ელექტროფორეზი.	61
სურათი. 4. <i>glk</i> , <i>omp</i> და <i>trp</i> ამპლიფიცირებული უბნების ვიზუალიზაცია.	63
სურათი 5. ერთ-ნუკლეოტიდური პოლიმორფიზმის ფრაგმენტული ანალიზის რეაქციის შედეგების ელექტროფეროგრამა, CEQ-8000, Beckman Coulter.	68
სურათი 6. როზ-ბენგალის ტესტი.	73
სურათი 7. მსხვილფეხა და წვრილფეხა რქოსანი საქონლის შრატების ბრუცელოზზე როზ-ბენგალის ტესტით გამოკვლევის შედეგები წლების მიხედვით აბსოლუტურ რიცხვებში	74
სურათი 8. მსხვილფეხა და წვრილფეხა რქოსანი საქონლის შრატების ბრუცელოზზე როზ-ბენგალის ტესტით გამოკვლევის შედეგები წლების მიხედვით %-ში.	74
სურათი 9. კონკურენტული (ენზიმ შეკავშირებული იმუნოსორბენტული) იმუნოფერმენტული ანალიზი (C-ELISA)	77
სურათი 10. როზ-ბენგალის ტესტით გამოკვლეული მსხვილფეხა რქოსანი პირუტყვი რეგიონების მიხედვით, 2009-2011 წწ.	80
სურათი 11. როზ-ბენგალის ტესტით გამოკვლეული წვრილფეხა რქოსანი პირუტყვი რეგიონების მიხედვით, 2009-2011 წწ.	81
სურათი 12. ცხვრის რძიდან გამოყოფილი <i>B. melitensis</i> -ის კულტურა	83
სურათი 13. გრამის წესით შეღებილი ბრუცელები	85
სურათი 14. ბრუცელას იზოლატების ბიოქიმიური თვისებები	86
სურათი 15. Light Cycler 2.0 აპარატზე შესრულებული ბრუცელას სადიაგნოსტიკო PCR რეალურ დროში შედეგების ვიზუალიზაცია (Idaho Technology/BioFire Diagnostics Inc., Brucella,T1)	93
სურათი 16. ბრუცელას 13 შტამის AMOS-PCR-ის შედეგები.	96
სურათი 17. საქართველოში გამოყოფილი <i>Brucella spp.</i> შტამების MLVA-8 ტიპირების დენდროგრამა	105

## სქემების ჩამონათვალი

სქემა 1. აგლუტინაციის დაჩქარებული რეაქცია (ა). .....	53
სქემა 2. აგლუტინაციის დაჩქარებული რეაქცია (ბ) .....	54

## აბრევიატურები

*AMOS* PCR – *A-abortus*, *M-melitensis*, *O-ovis*, *S-suis* (PCR) – პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქცია.

ArcGIS – Geographic Information System – გეოგრაფიული საინფორმაციო სისტემა.

ATCC – American Type Culture Collection – ამერიკული ტიპის ეტალონური შტამები.

bp – base pair – ფუძე წყვილი.

*Brucella* spp. – *Brucella* species – ბრუცელას სახეობები.

BSL-2 – Biosafety Level – 2 – ბიუსაფრთხოების მე-2 დონე.

Cc – Conjugate control – კონიუგატ კონტროლი.

CDC – Center for Disease Control – ამერიკის დაავადებათა კონტროლის ცენტრი.

C-ELISA – Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay – კონკურენტული (ენზიმ შეკავშირებული იმუნოსორბენტული) იმუნოფერმენტული ანალიზი.

CFT – Complement Fixation Test – კომპლემენტის ფიქსაციის რეაქცია.

CI – Confidence Interval – სარწმუნოების ინტერვალი.

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute – კლინიკური ლაბორატორიის სტანდარტების ინსტიტუტი.

CP – Crossing Point – დეტექციის ზღურბლი.

DTRA – Defence Threat Reduction Agency – აშშ თავდაცვის საფრთხის შემცირების სააგენტო.

ExoSAP – Exonuclease Shrimp Alkaline Phosphatase – ტუტე ფოსფატაზა.

Fp – Forward primer – ამპლიკონის 5'-3' მიმართული თანამიმდევრობა (ფორვარდ პრაიმერი).

FPA – Fluorescence Polarization Assay – ფლუორესცენტული პოლარიზაციის რეაქცია.

GC – Guanine, Cytosine – გუანინი, ციტოზინი.

*glk* – glucokinase – გლუკოკინაზა.

I-ELISA - Indirect Enzyme-linked Immunosorbent Assay – არაპირდაპირი ენზიმ შეკავშირებული იმუნოსორბენტული ანალიზი.

IgG - Immunoglobuline G – იმუნოგლობულინი G.

M – Marker – მარკერი.

Mab - Monoclonal antibodies – მონოკლონური ანტისხეულები.

Mbp - Megabase pair – მილიონი ფუძე წყვილი.

MLVA - Multiple Locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis – მრავლობითი ლოკუსების ტანდემურად განმეორებადი თანმიმდევრობების ცვლადი რაოდენობის ანალიზი.

mP unit - milli-polarization unit – მილიპოლარიზაციის ერთეული.

NCDC - National Center for Disease Control – დაავადებათა კონტროლის ეროვნული ცენტრი.

NFA - National Food Agency – სსიპ სურსათის ეროვნული სააგენტო.

OD – Optical density – ოპტიკური სიმკვრივე.

OIE - World Organization for Animal Health – ცხოველთა ჯანმრთელობის მსოფლიო ორგანიზაცია.

*Omp25* - *omp-25* kDa outer membrane protein – მემბრანის გარეთა პროტეინი.

OR - Odds Ratio – შანსთა თანაფარდობა.

PBS - Phosphate Buffered Saline – ფოსფატური ბუფერი.

PCR - Polymerase Chain Reaction – პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქცია.

PPE - Personal Protective Equipment – პირადი დაცვის აღჭურვილობა.

RBPT - Rose-Bengal Plate Test – როზ-ბენგალის ტესტი.

R-LPS - Rough lipopolysaccharide – ხორკლიანი ლიპოპოლისაქარიდი.

Rp - Reverse primer - ამპლიკონის 3'-5' მიმართული თანმიმდევრობა (რევერს პრაიმერი).

real-time-PCR – პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქცია რეალურ დროში.

SAT - Standart Agglutination Test – სტანდარტული, სინჯარული აგლუტინაცია (რაიტის რეაქცია).

SBA - 5% Sheep Blood Agar – 5% ცხვრის სისხლიანი აგარი.

S-LPS - Smooth lipopolysaccharide – გლუვი ლიპოპოლისაქარიდი.



SLS - Sample Loading Solution – ელექტროფორეზისთვის ნიმუშზე დასამატებელი ბუფერი.

SNP - Single Nucleotide Polymorphism – ერთ-ნუკლეოტიდური პოლიმორფიზმი.

SOP - Standard Operating Procedure – სტანდარტული სამოქმედო პროცედურა.

TBE - Tris-Borate-EDTA – ტრის-ბორის მჟავა ბუფერი ეთილენდიამინოტეტრა-მმარმჟავასთან ერთად.

*trpE* - anthranilate synthase – ანთრანილატ სინთაზა.

TSI agar - Triple Sugar Iron agar – რკინის სამშაქრიანი აგარი.

USDA - United States Department of Agriculture – ამერიკის შეერთებული შტატების სოფლის მეურნეობის სამინისტრო.

VNTR - Variable-Number Tandem Repeats – ცვლადი რაოდენობის ტანდემური განმეორებები.

WHO - World Health Organization – ჯანმრთელობის მსოფლიო ორგანიზაცია.

## 1. შესავალი

### 1.1. თემის აქტუალობა

21-ე საუკუნის დასაწყისში, მსოფლიოს მრავალ ქვეყანაში ბრუცელოზი რჩება საზოგადოებრივი ჯანდაცვის და ვეტერინარიის ერთ-ერთ აქტუალურ პრობლემად.

ჯანმრთელობის მსოფლიო ორგანიზაციის მონაცემებით (WHO), მსოფლიოში ყოველწლიურად ბრუცელოზით დაახლოებით 500 000 ადამიანი ავადდება (Pappas et al., 2006b). დაავადების თავისებურება განპირობებულია ინფექციის გადაცემით ცხოველიდან ადამიანზე. ადამიანის დაინფიცირება ხდება რამდენიმე გზით: დაავადებული ცხოველის პათოლოგიურ მასალასთან შეხებით (აბორტირებული ნაყოფი, სისხლი, სანაყოფე გარსები, საშოდან გამონადენი); ლაბორატორიაში კულტურასთან ან ინფიცირებულ მასალასთან მუშაობისას; დაინფიცირებული საკვები პროდუქტებით (აუდუღარი, არაპასტერიზებული რძე და რძის პროდუქტები, განსაკუთრებით – ყველი) (Memish et al., 2004; Fiori et al., 2000; Yagupsky et al., 2005; Traxler et al., 2013; Godfroid et al., 2005).

ამრიგად, ბრუცელოზით დაავადების რისკი საკმაოდ მაღალია, განსაკუთრებით განვითარებად ქვეყნებში. განსაკუთრებულ ყურადღებას იმსახურებს *Brucella melitensis*-ის შტამებით გამოწვეული ბრუცელოზი, რომელიც მსოფლიოში ფართოდაა გავრცელებული და აზიანებს როგორც ცხოველის, ისე ადამიანის ჯანმრთელობას. ბრუცელას დანარჩენ სახეობებთან შედარებით *Brucella melitensis* ყველაზე ვირულენტურია ადამიანისთვის და ხასიათდება მძიმე მიმდინარეობით – თითქმის ყველა ორგანოს დაზიანებით. იგი ცნობილია, როგორც მულტიორგანული დაავადება, ცხოველებში კი ძირითადად იწვევს უნაყოფობას და წველადობის შემცირებას (Xavier et al., 2010a).

*B. melitensis*-ით გამოწვეული ბრუცელოზი პრობლემურია განვითარებული ქვეყნებისთვისაც. მიუხედავად ამისა, *B. melitensis* არ კარგავს თავის მნიშვნელობას, როგორც ბიოლოგიური იარაღის შექმნის პოტენციური აგენტი და ამერიკის დაავადებათა კონტროლისა და პრევენციის ცენტრების (CDC) კლასიფიკაციით, მიეკუთვნება ბიოლოგიურად საშიში პათოგენების „ბ“ ჯგუფს (Moreno, Moriyon, 2002; Pappas et al., 2006a; CDC, 2013; Nicoletti, 2010; Rotz et al., 2002; Godfroid et al., 2005, 2011).

*B. melitensis*-ის ბუნებრივი, მთავარი მასპინძელი თხა და ცხვარია. იგი ძირითადად გვხვდება ენდემურ რეგიონებში: ხმელთაშუა ზღვის აუზის სამხრეთ და აღმოსავლეთ სანაპიროებზე, შუა და ახლო აღმოსავლეთში, ცენტრალურ აზიაში, არაბეთის ნახევარკუნძულზე. დაავადება გავრცელებულია ლათინური ამერიკის ქვეყნებშიც, განსაკუთრებით მექსიკაში, პერუში, ჩრდილოეთ არგენტინაში. გვხვდება აფრიკასა და ინდოეთში. კანადა, ჩრდილოეთ ამერიკა, (გარდა მექსიკისა), ისევე, როგორც ჩრდილოეთ ევროპა (გარდა მისი სამხრეთი ნაწილის), სამხრეთ-აღმოსავლეთ აზია, ავსტრალია და ახალი ზელანდია თავისუფალია ამ სახეობისგან (Xavier et al., 2010a; Refai, 2002; Samadi et al., 2010; Anonymous, 1997; Renukaradhya et al., 2002; Alton, 1990; Pappas et al., 2006a,b; Corbel, 1997, 2006; Blasco, 2010; European Commission, 2001).

ევროკავშირის წევრი ქვეყნებიდან *B. melitensis*-ის სახეობისაგან თავისუფალია ბელგია, დანია, ფინეთი, ირლანდია, გერმანია, ავსტრია, ლუქსემბურგი, შვედეთი, ნიდერლანდები, გაერთიანებული სამეფო, საფრანგეთის 17 ადმინისტრაციული ერთეული და ესპანეთის 2 პროვინცია. თუმცა ეს დაავადება ჯერ კიდევ გავრცელებულია ევროპის ზოგიერთ ქვეყანაში (European Commission, 2001).

ყოფილ საბჭოთა კავშირში შემავალი ქვეყნებიდან ბრუცელოზის ხშირი შემთხვევებია ყაზახეთში, აზერბაიჯანში, ყირგიზეთში, ტაჯიკეთში, უზბეკეთში, რუსეთში (Pappas, 2006a,b; Авиллов с соавт, 1999; Таран с соавт, 1996; Белозеров с соавт, 1985).

ბრუცელოზის ახალი შემთხვევების თავიდან ასაცილებლად განვითარებულ ქვეყნებში დიდი ყურადღება ექცევა ბრუცელოზის ერადიკაციის ღონისძიებებს და რისკების ანალიზს. განვითარებად ქვეყნებში, ბრუცელოზის პრევალენტობის შესახებ ინფორმაციის სიმწირის გამო, ვერ ხერხდება არსებული მდგომარეობის ანალიზი და შესაბამისად პროფილაქტიკური ღონისძიებების გატარებაც იშვიათად ხორციელდება.

ბრუცელოზისთვის საქართველო ენდემურ კერას წარმოადგენს. ადამიანთა და ცხოველთა დაავადების შემთხვევები გვხვდება ქვეყნის მთელ ტერიტორიაზე, თუმცა გავრცელების ინტენსივობა არათანაბარია. ბრუცელოზის გავრცელება წვრილფეხა რქოსან პირუტყვში ტერიტორიისა და რეგიონების მიხედვით განსხვავებულია.

მაგალითად, დასავლეთ საქართველოში (აფხაზეთის გარდა) ბრუცელოზი არ იყო რეგისტრირებული თხეებში, ხოლო აღმოსავლეთ საქართველოში დაავადება გვხვდებოდა, როგორც ცხვრებში, ასევე თხეებშიც. აღნიშნული სახეობის ცხოველები ადამიანებისათვის საფრთხის თანაბრად შემცველია (ანთაძე, 1947).

მეცხოველეობის კომპლექსების დაშლამ და ბრუცელოზით დაავადებული ცხოველების კერძო მფლობელობაში გადასვლამ გამოიწვია დაავადების გავრცელების გაფართოება, გართულდა მისი გამოვლენის შესაძლებლობა. მდგომარეობა კიდევ უფრო დაამძიმა 1990 – 2000 წწ. სადიაგნოსტიკო, პროფილაქტიკური და სამკურნალო პრეპარატების სიმცირემ – საკმარისია ითქვას, რომ ყოველი ათი ცხოველიდან 7-8 გამოუკვლეველი რჩებოდა (ლომინეიშვილი, გავაშელი, 2002).

დღეისათვის, არსებობს ტენდენცია ადამიანთა და ცხოველთა დაავადების შემთხვევების მატებისა. აღნიშნულის სავარაუდო მიზეზად შეიძლება ჩაითვალოს ბოლო ათწლეულების განმავლობაში ქვეყანაში ვეტერინარული ზედამხედველობის არასაკმარისი დონე, ვაქცინაციის ჩაუტარებლობა და ცხოველთა არასრული აღრიცხვა.

აღსანიშნავია ის გარემოებაც, რომ ჩვენს ქვეყანაში ბრუცელოზის რეალურ ეპიზოოტოლოგიურ სიტუაციაზე მსჯელობა ჯერ კიდევ ძნელია, ვინაიდან მსხვილი რქოსანი პირუტყვის მასობრივი გამოკვლევა დაიწყო მხოლოდ 2014 წლიდან ეტაპობრივად რიგ რეგიონებში და დღეის მონაცემებით სრულად არ არის მოცული მთელი საქართველო, ხოლო წვრილფეხა პირუტყვში მასიური გამოკვლევები არ ჩატარებულა.

მსოფლიოს მრავალ ქვეყანაში, მათ შორის საქართველოს მოსაზღვრე ქვეყნებში, ბრუცელოზის გავრცელება და არაკეთილსაიმედო კერების არსებობა მიუთითებს ბრუცელოზის საწინააღმდეგო ვეტერინარულ-სანიტარიული ღონისძიებების გატარების აუცილებლობაზე. განსაკუთრებით მნიშვნელოვანია ასეთი ღონისძიებების გატარება საქართველოში, რომელიც ასრულებს სატრანზიტო ქვეყნის როლს რეგიონში, რაც მოითხოვს ბრუცელოზზე, როგორც განსაკუთრებით საშიშ ინფექციურ დაავადებაზე, ბუფერული ზონის შექმნას.

ზემოაღნიშნული მიუთითებს ბრუცელოზთან დაკავშირებული კვლევების განსაკუთრებულ აქტუალურობაზე საქართველოსთვის.

ისტორიულ მონაცემებზე დაყრდნობით ცნობილი იყო, რომ აღმოსავლეთ საქართველოში ცირკულირებდა *B. abortus*, ხოლო დასავლეთ საქართველოში *B. melitensis*-ის სახეობები, თუმცა ეს მონაცემები არ იყო გამყარებული მოლეკულურ-გენეტიკური შესწავლით. ამიტომ, საინტერესო იყო დღეისათვის საქართველოში რეალურად მოცირკულირე ბრუცელოს სახეობების დადგენა, რისთვისაც მიზნად დავისახეთ ბრუცელოს კულტურების გამოყოფა და მათი თანამედროვე (მოლეკულურ-გენეტიკური) მეთოდებით დახასიათება.

სამუშაო გეგმის შედგენისას გათვალისწინებულ იქნა, რომ საქართველოში გამოყოფილი *B. melitensis*-ის შტამების მოლეკულურ-გენეტიკური შესწავლა უნდა განხორციელდებოდა რიგი არსებითი მომენტების გათვალისწინებით: ქვეყანაში ბრუცელოს ეპიზოოტოლოგიური სტატუსი, იზოლირებული კულტურების ტრადიციული მიკრობიოლოგიური მეთოდებით შესწავლა (მორფოლოგიური, კულტურალური, ბიოქიმიური, სეროლოგიური თვისებები; თანამედროვე საიდენტიფიკაციო ტესტებით შესწავლა; აგლუტინაციის მოდიფიცირებული მეთოდის ეფექტურობის შეფასება და სხვ.).

## 1.2 მიზანი და ამოცანები:

სამუშაოს ძირითადი მიზნის ფარგლებში ჩამოყალიბებული იქნა შემდეგი კერძო ამოცანები:

1. საქართველოში ბრუცელოს გავრცელების შესწავლა შინაურ პირუტყვში (2007–2012 წწ.).
2. ბრუცელოზით დაავადებული შინაური პირუტყვის სკრინინგი (როზ-ბენგალის ტესტი). ბრუცელოს გამოვლინება წვრილფეხა შინაურ პირუტყვში (როზ-ბენგალის ტესტი, კონკურენტული იმუნოფერმენტული ანალიზი და ფლუორესცენტული პოლარიზაციის რეაქცია).
3. აგლუტინაციის რეაქციის დაჩქარებული მოდიფიკაციის შემუშავება და მისი სადიაგნოსტიკო ღირებულების შეფასება.
4. ცხოველთაგან ბრუცელოს გამომწვევის კულტურების გამოყოფა და მათი მოლეკულურ-გენეტიკური შესწავლა.
5. საქართველოს რეგიონებში გავრცელებული ბრუცელების შტამების თავისებურებათა განსაზღვრა.

## 2. ლიტერატურის მიმოხილვა

### 2.1 ბრუცელოზი. ვეტერინარიისა და მედიცინის პრობლემა

ბრუცელოზი ერთ-ერთი გავრცელებული და ეკონომიკური თვალსაზრისით ზარალის მომტანი, უძველესი დროიდან ცნობილი ინფექციური დაავადებაა. ბრუცელოზი აღწერილი აქვს ჯერ კიდევ ჰიპოკრატეს (ძვ.წ. 460-377) (Nicoletti, 2002; Pappas et al., 2006a; Nielsen, Yu, 2010; Вершилова, 1972).

მე-18 საუკუნის ბოლოს და მე-19 საუკუნის დასაწყისში, ბრუცელოზი აღწერა მრავალმა მკვლევარმა, მაგრამ ამ დაავადების მეცნიერული შესწავლა დაიწყო მე-19 საუკუნის მეორე ნახევრიდან, რაც მჭიდროდ იყო დაკავშირებული ინგლისელი მკვლევარების მიერ მის საფუძვლიან შესწავლასთან კუნძულ მალტაზე (Wyatt, 2013).

ადამიანის ბრუცელოზი ძველთაგან გეოგრაფიულად დაკავშირებული იყო ხმელთაშუა ზღვის რეგიონთან. სწორედ ამით აიხსნება ბრუცელოზის ადრინდელი სახელწოდებები: ხმელთაშუა ზღვის ცხელება, კრეტეს ცხელება, ნეაპოლიტანური ცხელება, მალტის ცხელება, გიბრალტარის ცხელება და ა.შ. მოგვიანებით ცნობილი გახდა ტერმინები: ტალისებრი ცხელება, ზანგის დაავადება (ლომინეიშვილი, გავაშელი, 2002).

ბრუცელოზი ადამიანებში, როგორც დამოუკიდებელი ნოზოლოგიური ერთეული, დიფერენცირებულ იქნა 1859 წ. კუნძულ მალტაზე J.A. Marston-ის მიერ (Marston, 1861).

ბრუცელოზის შესწავლის უმნიშვნელოვანესი ეტაპი იწყება 1886 წლიდან, როცა ინგლისელმა სამხედრო ექიმმა, David Bruce-მა, კუნძულ მალტაზე გარდაცვლილი ჯარისკაცის ელენტიდან დამზადებული ნაცხების მიკროსკოპირებისას აღმოაჩინა დაავადების გამომწვევი მიკრობი. მანვე, 1887 წელს, გამოყო აღმძვრელის სუფთა კულტურა და უწოდა მალტის მიკროკოკი (*Micrococcus melitensis*) (Bruce, 1887, 1893; Hughes, 1893; Meyer, Shaw, 1920). მოგვიანებით, D. Bruce-მა, მიკროკოკის კულტურით მაიმუნების ექსპერიმენტული დასნებოვნებისას, გამოიწვია მათი დაავადება, რომელიც კლინიკური გამოვლინებით ადამიანის ბრუცელოზის მსგავსი იყო (Вершилова, 1972).

D. Bruce-ს აღმოჩენიდან ათი წლის შემდეგ, ინგლისელებმა A. Wright-მა და F. Smith-მა დაადგინეს, რომ ბრუცელოზით დაავადებული ცხოველის სისხლის შრატს

აქვს თვისება, მოახდინოს მალტის მიკროკოკის კულტურის აგლუტინაცია. აღნიშნული აღმოჩენა დაედო საფუძვლად ბრუცელოზის სეროდიაგნოსტიკას აგლუტინაციის რეაქციის მეშვეობით, რასაც რაიტის რეაქცია ეწოდა (Wright, Smith, 1897).

მალტის ცხელების აღმძვრელის რეზერვუარის შესწავლის აუცილებლობა განაპირობა კუნძულ მალტაზე სპეციალურად ორგანიზებული კომისიის ერთ-ერთი წევრის, T. Zammit-ის მიგნებამ 1904-1907 წწ. (Zammit, 1905), რომელმაც დაადგინა, რომ ექსპერიმენტში მონაწილე 6 თხიდან 5-ის შრატი იძლეოდა მკვეთრად გამოხატულ აგლუტინაციის რეაქციას D. Bruce-ს მიერ აღმოჩენილ და გამოყოფილ მალტის ცხელების აღმძვრელთან, რაც დადასტურდა W.Horrocks-ის გამოკვლევებშიც (Horrocks, 1905, 1906). ამრიგად, გამოიკვეთა კუნძულ მალტაზე თხების ბუნებრივი დაინფიცირება, მიკრობის გამოყოფა რძესთან ერთად და ადამიანების დაავადება თხის უმი რძის საკვებად გამოყენების შედეგად. აღნიშნული შემთხვევის გამო, 1906 წ.-დან მალტაში, სამხედრო გარნიზონებში აიკრძალა უმი რძის საკვებად გამოყენება, რამაც სათანადო შედეგი გამოიღო. დაავადებულთა რაოდენობა საგრძნობლად შემცირდა და მოკლე დროში ის საერთოდ აღარ გამოვლენილა.

ბუნებრივ პირობებში, თხების დაინფიცირების ფაქტების აღმოჩენის შემდეგ, ანალოგიური ინფექციის არსებობა ბუნებრივ პირობებში დადგინდა ერთმანეთისგან სრულიად განსხვავებულ, სხვადასხვა სახეობის ცხოველებში და ფრინველშიც კი. ცნობილი გახდა ძროხების თავისებური დაავადება, რომელიც მკვეთრად გამოვლენილი იწვევდა განუვითარებელი ნაყოფის მოგდებას, ანუ ე.წ. ინფექციურ-ეპიზოოტიურ აბორტს, რაც 1897 წელს დანიელმა მეცნიერებმა B. Bang-მა და V. Stribolt-მა (Bang, 1897) შეისწავლეს და დაადგინეს, რომ ძროხების ინფექციური აბორტის აღმძვრელი იყო განსაკუთრებული ბაცილა (ასე უწოდეს მაშინ), რომელიც მკვლევარებმა პირველებმა აღმოაჩინეს აბორტირებული ძროხის საშვილოსნოსა და სანაყოფე გარსების ექსუდატში, გამოყვეს სუფთა მიკრობული კულტურის სახით და უწოდეს *Bac. abortus bovis* (Meyer, Shaw, 1920).

1914 წელს J. Traum-მა (Traum, 1914), ხოლო მოგვიანებით – 1916 წელს E.S. Good და W.V. Smith-მა (Good, Smith, 1916) აბორტირებული ღორიდან გამოყვეს მიკრობი, რომელიც თავისი თვისებებით ძალიან ახლოს იდგა ბანგის ბაცილასთან. ასე

განისაზღვრა ღორის ინფექციური აბორტის აღმძვრელი – *Bac. abortus suis* (Huddleson, 1929).

1916-1918 წლებში, ამერიკელმა მკვლევარმა A. Evans-მა (Evans, 1918; Meyer, Shaw, 1920) შეისწავლა *Micrococcus melitensis*-ის და *Bac. abortus*-ის მიკრობული კულტურები და მათ შორის დაადგინა მსგავსება მორფოლოგიური, კულტურალური და სეროლოგიური თვისებებით. K. Meier-მა და M. Feusier-მა 1920 წელს დაადასტურეს ივენსის მონაცემები და მალტის ცხელებისა და ინფექციური აბორტის აღმძვრელები გააერთიანეს ბრუცელას ჯგუფში.

C.S. Keefer-მა (Keefer, 1924) 1924 წელს მალტის ცხელებით დაავადებული ადამიანის ორგანიზმიდან გამოყო მიკრობული კულტურა *Bac. abortus*-ი (Bang). ამ აღმოჩენამ, პირველად ბაქტერიოლოგიურად დაამტკიცა, ძროხების ინფექციური აბორტის აღმძვრელის პათოგენობა ადამიანისათვის. ანალოგიურად სარწმუნოდ მიიჩნიეს ღორის ინფექციური აბორტის პათოგენობა ადამიანების მიმართ.

1957 წ. H.G. Stoenner-მა და D.B. Lakman-მა (Stoenner, Lakman, 1957) იუტას შტატში (აშშ) ბუჩქნარის ვირთაგვასაგან გამოყვეს მიკროორგანიზმები, რომელთა თვისებებიც ბრუცელების მსგავსი აღმოჩნდა და დაარეგისტრირეს როგორც ახალი სახეობა *B. neotomae*, ხოლო 1953 წ. ავსტრალიასა და ახალ ზელანდიაში სიმონსმა, ჰოლმა, ბადლიმ და ბოისმა (Cimmons, Hall, Buddle and Boyes) გამოყვეს მიკროორგანიზმი, რომელიც ცხვარში იწვევდა ეპიდდემიის. Buddle-იმ 1956 წელს აღნიშნული მიკრობი მიაკუთვნა ბრუცელას გვარს და უწოდა *B. ovis* (Buddle, 1956; Buddle, Boyes, 1953).

1966 წელს L. Carmichael-მა (Carmichael, Bruner, 1968) მეძებარი ძაღლების აბორტირებული ნაყოფებიდან გამოყო ბრუცელოზის აღმძვრელი, რომელსაც უწოდა *B. canis*. L. Carmichael-ის დაკვირვებებით, *B. canis* შეიძლება გამხდარიყო ადამიანის ბრუცელოზით დაავადების მიზეზი იმ ქვეყნებში, სადაც ეს ინფექცია გავრცელებულია ძაღლებში. 1970 წელს, მექსიკაში ახლადგამოყოფილ მიკროორგანიზმთა შესწავლის საფუძველზე, ტაქსონომიის ქვეკომიტეტმა მიიღო გადაწყვეტილება, რომ *B. ovis* და *B. canis* ჩათვალიათ ბრუცელას ცალკე დამოუკიდებელ სახეობებად და შეეტანათ ტაქსონომიის ცხრილში (Вершилова, 1972).



ბრუცელოზის შესწავლის საქმეში დიდი წვლილი შეიტანეს ს. ვიშელესკიმ, პ.ზდროდოვსკიმ, პ. ვერშილოვამ, მ. იუსკოვეცმა, ე. ორლოვმა, მ. ჟელუდკოვმა და სხვებმა. ქართველი მკვლევარებიდან ბრუცელოზს სწავლობდნენ – ვ. ანთაძე, გ. მარუაშვილი, ი. კვესიტაძე, ვ. შამათავა, მ. თავამაიშვილი, თ. ყოჩიაშვილი, ი. ბარამიძე და სხვები, რომლებმაც გარკვეული სიღრმადე შეიტანეს საქართველოში ბრუცელოზის ეპიზოოტიური და ეპიდემიური სიტუაციის დადგენის საქმეში (ბაბაკიშვილი თანაავტ., 2005).

ბრუცელები ცირკულირებენ ყველა კონტინენტზე. განვითარებულ ქვეყნებში დაავადება კონტროლირებადია, განვითარებადი ქვეყნებისათვის იგი დღემდე პრობლემას წარმოადგენს (Corbel, 1997; Maloney et al; 2004). ოცდამეერთე საუკუნეში იგი ბიოლოგიურ იარაღად მიიჩნეეს. დაავადების გამომწვევი დოზის სიმცირის გამო (10-100 მიკრობული უჯრედი), ის წარმოადგენს ხელსაყრელ საშუალებას აღნიშნული იარაღის დასამზადებლად. ბრუცელოზი აშშ-ის დაავადებათა კონტროლის ცენტრის (CDC) კლასიფიკაციის მიხედვით, მიეკუთვნება B კატეგორიას (მარუაშვილი, 1983; Вершилова, 1961; FAO-WHO-OIE, 1994; Xavier et al., 2010a; Rotz et al., 2002; Pappas et al., 2006a; Godfroid et al., 2011).

ბრუცელოზი შეიძლება აღიძრას წლის ნებისმიერ დროს. მას ახასიათებს ინფექციური პროცესის სტადიურობა, ნაყოფისა და შარდ-სასქესო სისტემების ორგანოების დაინფიცირება, უჯრედშიდა და ორგანოსშიდა პარაზიტიზმი, რაც აისახება იმუნიტეტის არასტერილური, ანუ ინფექციური, და სტერილური, ანუ არაინფექციური ფაზების გამოვლენაში (ლომინიშვილი, გავაშელი, 2002).

საქართველოში არსებული ეპიზოოტიური მდგომარეობა ადამიანთა დაავადების რეალურ საშიშროებას ქმნის.

ჩვენს ქვეყანაში ბრუცელოზი სადღეისოდ ფაქტიურად არაკონტროლირებადი ინფექციაა.

## **2.2 ბრუცელათა სახეობები, მათი გავრცელება და დაავადების მიმდინარეობა**

ბრუცელოზთან ბრძოლის სირთულე განპირობებულია დაავადების აღმძვრელის მრავალი სახეობის არსებობით, გარემო არეში საკმაო გამძლეობით, მაღალი

ვირულენტობით და მათი შესაძლო მიგრაციით ძირითადი მასპინძლიდან /ცხოველი/ – არაძირითადზე; პრაქტიკულად ძუძუმწოვართა თითქმის ყველა სახეობის დაინფიცირებით.

1985 წ-მდე ბრუცელას გვარში დაფიქსირებული იყო 6 დამოუკიდებელი სახეობა: *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. canis*, *B. ovis* და *B. neotomae*. ეს ექვსივე სახეობა გენეტიკურად ძალიან ჰგავს ერთმანეთს. 1985 წელს შემოთავაზებულ იქნა ექვსივე სახეობის ერთ სახეობაში გაერთიანების იდეა *B. melitensis*-ის სახელწოდებით, ხოლო დანარჩენი სახეობები მიჩნეულიყო მის ბიოვარიებად (მაგ: *B. melitensis*-ის ბიოვარი *abortus-1*) (Moreno et al., 2002; Verger et al., 1985). თუმცა, 2003 წ. ბრუცელას ტაქსონომიის ქვეკომიტეტი შეთანხმდა, რომ დაბრუნებოდნენ 1986 წ.-მდე არსებულ ბრუცელების ძველ კლასიფიკაციას, სადაც თითოეულ სახეობას რამდენიმე ბიოვარი შეესაბამებოდა (Osterman, Moriyon, 2006).

2007 წლიდან *Brucella ceti* და *Brucella pinnipedialis* (რომლებიც აინფიცირებენ ვეშაპისნაირებს და ბრტყელტერფა ცხოველებს) ცნობილი გახდნენ, როგორც ბრუცელას ახალი სახეობები (Cloeckert et al., 2001; Ross et al., 1994; Ewalt et al., 1994; Foster et al., 2007; Isidoro-Ayza et al., 2014; Prenger-Berninghoff et al., 2008; Nymo et al., 2011).

2008 წ.-ს კიდევ ორი ახალი სახეობა დადგინდა. პირველად, 2000 წ. ჩეხეთში, ჩვეულებრივი ვირთაგვებისგან, მოგვიანებით 2007 წელს ისევ ჩეხეთში, ნიადაგიდან და ავსტრიაში წითელი მელიებისგან გამოყოფილი *Brucella microti* (*Microtus arvalis*) (Hubalek et al., 2007; Scholz et al., 2008, 2008b, 2009) და შემდგომში *Brucella inopinata* – რომელიც გამოყვეს ბრუცელოზით დაავადებული ადამიანის მკერდის იმპლანტანტიდან (De et al., 2008; Scholz et al., 2010). აღნიშნული ერთადერთი სახეობაა, რომელიც ცხოველისგან არ გამოუყვიათ. თუმცა, აღსანიშნავია რამდენიმე იზოლატის გამოყოფა ბაყაყებისგან, რომლებიც ძალიან გვანან *Brucella inopinata*-ს, რის დასადასტურებლადაც მიმდინარეობს მათი მთლიანი გენომის შესწავლა ბრუცელას კლასიკურ სახეობებთან შედარების მიზნით (Eisenberg et al., 2012). ასევე, ბრუცელას ახალი შტამები გამოიყო ავსტრალიაში ვირთაგვების ადგილობრივი სამი სხვადასხვა სახეობისგან და სხვადასხვა ქვეყნებში მაიმუნებისგან, ადამიანისგან, ამფიბიებისგან, რომლებიც ჯერ ბრუცელას გვარში როგორც ახალი სახეობები

ოფიციალურად შეტანილი არაა (Tiller et al., 2010a; Al Dahouk et al., 2012, 2013; Tiller et al., 2010b; Fischer et al., 2012; Hofer et al., 2012; Scholz et al., 2013, Whatmore et al., 2014, 2015). ბრუცელას, დღეისათვის ცნობილი 10 სახეობის ძირითადი მასპინძელი და მათი ადამიანისთვის პათოგენობა მოცემულია #1 ცხრილში (Godfroid et al., 2011).

**ცხრილი 1. ბრუცელას სახეობები, მათი ძირითადი მასპინძლები და ადამიანისთვის პათოგენობა**

#	ბრუცელას სახეობები	ბიოვარი	ძირითადი მასპინძელი	ადამიანისთვის პათოგენობა
1	<i>B. melitensis</i>	1,2,3	ცხვარი, თხა	მაღალპათოგენური
2	<i>B. abortus</i>	1,2,3,4,5,6,9	მსხვილფეხა რქოსანი პირუტყვი	მაღალპათოგენური
3	<i>B. suis</i>	1,3	ღორი	მაღალპათოგენური
		2	გარეული ღორი, კურდღელი	არაპათოგენური <sup>ა</sup>
		4	ჩრდილოეთის ირემი, კანადის ირემი	მაღალპათოგენური
		5	მღრღნელები	არაპათოგენური
4	<i>B. neotomae</i>	-	უდაბნოს ტყის ვირთაგვა	არაპათოგენური
5	<i>B. ovis</i>	-	ყოჩი	არაპათოგენური
6	<i>B. canis</i>	-	ძაღვი	ზომიერად პათოგენური
7	<i>B. ceti</i>	-	ვეშაპისნაირები	უცნობია <sup>ბ</sup>
8	<i>B. pinnipedialis</i>	-	ბრტყელტერფა ცხოველები	უცნობია <sup>ბ</sup>
9	<i>B. microti</i>	-	ნიადაგი, ვირთაგვა, მელია	უცნობია
10	<i>B. inopinata</i>	-	უცნობია	მაღალპათოგენური

**შენიშვნა:**

a – საფრანგეთში აღწერილია *B. suis* ბიოვარი 2-ით იმუნიტეტდაქვეითებული მონადირის დაავადების ერთი შემთხვევა.

b – ინგლისში აღწერილია ლაბორატორიული დაინფიცირების ერთი და ბუნებრივად დაინფიცირების ორი შემთხვევა, თუმცა ინფიცირების წყარო არ უკავშირდება ზღვის ძუძუმწოვრებს.

ამრიგად, ბრუცელას გვარი შედგება 10 სახეობისგან: *B. melitensis* 1-3 ბიოვარი, *B. abortus* 1 - 6, 9 ბიოვარი, *B. suis* 1-5 ბიოვარი, *B. canis*, *B. ovis*, *B. neotomae*, *B. maris* - *B. pinnipediae* და *B. cetaceae*; *B. microti*, *B. inopinata* (Godfroid et al., 2011; Nicoletti, 2010), რომელიც სქემატურად შემდეგნაირად შეიძლება წარმოვიდგინოთ:

- კლასი - Alphaproteobacteria

- რიგი - Rhizobiales
  - ოჯახი - Brucelaceae
    - ❖ გვარი- *Brucella*
      - სახეობა - *B. melitensis* 1-3 ბიოვარი
      - სახეობა - *B. abortus* 1-6, 9 ბიოვარი
      - სახეობა - *B. suis* 1-5 ბიოვარი
      - სახეობა - *B. canis*
      - სახეობა - *B. ovis*
      - სახეობა - *B. neotomae*
      - სახეობა - *B. pinnipediae*
      - სახეობა - *B. cetaceae*
      - სახეობა - *B. microti*
      - სახეობა - *B. inopinata*

როგორც #1 ცხრილიდან ჩანს *B. melitensis*-ის ძირითადი მასპინძელია წვრილი რქოსანი პირუტყვი (ცხვარი და თხა), *B. abortus*-ის – მსხვილი რქოსანი პირუტყვი (ძროხა, კამეჩი, გარეული ხარი), *B. canis*-ის – ძაღლი, *B. ovis*-ის – ცხვარი (ყოჩი), *B. neotomae*-ის – მღრღნელები, *B. maris* – ზღვის ძუძუმწოვრები (*B. pinnipediae*-ის – სელაპი, ზღვის ლომი, ლომვეშაპი და *B. cetaceae*-ს კი – ვეშაპი, დელფინი). *B. suis* ხასიათდება მასპინძლების შედარებით მაღალი მრავალფეროვნებით. მაგ: ბიოვარი-1, 2 და 3 გვხვდება ღორში, ბიოვარი-2 ასევე გვხვდება ევროპულ კურდღელში, ბიოვარი- 4 ძირითადად გვხვდება ჩრდილოეთის და კანადის ირემში და არა ღორში, ხოლო ბიოვარი-5 კი – მღრღნელებში.

სხვადასხვა სახეობის ბრუცელებისათვის დამახასიათებელია მორფოლოგიური მსგავსება. ისინი მცირე ზომის პოლიმორფული მიკრობებია, აქვთ კოკისმაგვარი, ოვოიდური ან ჩხირისებრი ფორმა. მათი ზომები 0,5-0,7 X 0,6-1,5 მკმ-ია. სპორასა და კაფსულას არ წარმოქმნიან, უძრავი და გრამუარყოფითებია. ლაგდებიან იზოლირებულად, წყვილ-წყვილად ან გროვებად. ბრუცელების ფიქსირებულ ნაცხს ღებავენ გრამის, კოზლოვსკის წესით, სტემპის (მოდიფიცირებული ცილ-ნილსენის) მეთოდით და სხვ. ღორის ბრუცელოზის აღმძვრელი ჩხირისებრია, ხოლო მსხვილფეხა და წვრილფეხა რქოსანი პირუტყვის აღმძვრელები – კოკისმაგვარი (European Commission, 2001; Banai, Corbel, 2010).

ბრუცელას გვარის სახეობები მაღალი ჰომოლოგიურობით ხასიათდებიან. მათი გენომების >95% ერთმანეთის იდენტურია. სახეობების უმრავლესობის გენომის საშუალო მოლეკულური მასა  $3.3 \times 10^5$  bp ფუძე წყვილია, ხოლო GC კი 57-59%-ია

(Bohlin et al., 2010; DelVecchio et al., 2002; Paulsen et al., 2002; Corbel, 1997). 16S-rRNA-ის ნუკლეოტიდური თანმიმდევრობის და GC – 56-59%-ის შემცველობის მიხედვით განისაზღვრება ბრუცელას ახალი სახეობების ამა თუ იმ გვარისადმი მიკუთვნება (Banai, Corbel, 2010). ამ მახასიათებლების მიხედვით Alphaproteobacteria-ს კლასს ასევე მიეკუთვნება შემდეგი გვარები: *Ochrobactrum*, *Rhizobium*, *Rhodobacter*, *Agrobacterium*, *Bartonella* და *Rickettsia*, რომლებიც ყველაზე ახლოს დგანან ბრუცელას გვართან (Moreno et al., 2002; Banai, Corbel, 2010; Lopes et al., 2010; DelVecchio et al., 2002). *Ochrobactrum anthropi*-ს გენომმა აჩვენა 99.8% იდენტურობა ბრუცელას გვარის სახეობებთან (Banai, Corbel, 2010).

*B. melitensis*-ის გენომი წარმოდგენილია ორი ცირკულარული ქრომოსომით. ამათგან I ქრომოსომა დიდია II-სთან შედარებით – 2.1 და 1.2 (Mbp) მეგა ფუძე წყვილს შეადგენს და მასში GC-ის შემცველობა შესაბამისად 57.1% და 57.3%-ია (DelVecchio et al., 2002; Banai, Corbel, 2010; Chain et al., 2005; Halling et al., 2005; Lopez-Goni, Moriyon, 2005).

ბრუცელები მიეკუთვნებიან Alphaproteobacteria-ს კლასს, რიგი – Rhizobiales, ოჯახი – Brucelaceae, გვარი – *Brucella*. ობლიგატური აერობებია. ზოგი მიკროაეროფილია (*Brucella abortus*), რის გამოც გამოსაკვლევია მასალის ერთი ნაწილის კულტივირებას ახდენენ ჩვეულებრივ აერობულ პირობებში (*B. melitensis*), ხოლო მეორე ნაწილისას (*Brucella abortus* ზოგიერთი ბიოვარის) თავდაპირველად ექსიკატორში ანაერობულ პირობებში (5-10% CO<sub>2</sub>-ით), ხოლო პირველადი გენერაციის მიღების შემდეგ, გამოზრდას ჩვეულებრივ აერობულ პირობებში ახდენენ (Banai, Corbel, 2010; European Commission, 2001; ნათიძე თანაავტორებთან., 2014).

ბრუცელას სახეობებისათვის დამახასიათებელია შერჩევითი პათოგენობა შესაბამისი სახეობის ცხოველის მიმართ, თუმცა აღინიშნება მათი მიგრაცია სხვა სახეობის ცხოველებშიც.

ადამიანის ბრუცელოზის ეპიდემიოლოგიაში ძირითადი როლი ეკუთვნის წვრილ რქოსან პირუტყვს (ცხვარი და თხა) (European Commission, 2001).

მნიშვნელოვანია *B. melitensis*-ის მიგრაცია სხვა სახეობის ცხოველებში. მიგრაციას ხელს უწყობს ცხოველთა ერთად შენახვა ან ერთად ძოვება. ყველაზე მეტად საშიშია *B. melitensis*-ის მიგრაცია მსხვილფეხა რქოსან პირუტყვში,

რამდენადაც მის პროდუქციას (რძე და რძის პროდუქტები) ფართოდ მოიხმარს მოსახლეობა (Corbel, 1997, 2006; Вершилова, 1961).

აღწერილია ძროხიდან *B. melitensis* და *B. suis*-ის გამოყოფის ფაქტები. ზოგჯერ ადგილი აქვს *B. abortus*-ის მიგრაციას სხვადასხვა სახეობის შინაურ პირუტყვში. არსებობს ასევე ძაღლის *Brucella melitensis REV-1* სავაქცინე შტამით დაინფიცირების ფაქტი (Вершилова, 1961; Godfroid et al., 2005; Hinic et al., 2010; Corbel, 1997; Xavier et al., 2010a; Diaz-Aparicio, 2013; Luchsinger, Anderson, 1979; Cook, Noble, 1984; Norton, Thomas, 1979; Verger, 1985; Lopes et al., 2010).

ბრუცელოზის მიმართ ამთვისებელია შინაური და გარეული ცხოველების ფართო წრე: ხერხემლიანი ცხოველების 60-მდე სახეობა (ძუძუმწოვრები, რეპტილიები, ამფიბიები, აგრეთვე თევზები), ფრინველები, ადამიანი და პარაზიტული ფეხსახსრიანები (El-Tras, et al., 2010; Corbel, 2006; Ременцова, 1962; Вышелесский, 1955; Харлампович, 1955; Орлов, 1962).

დასკვნის სახით შეიძლება ითქვას, რომ ბრუცელა ტიპური ზოონოზია, რადგანაც ადამიანებში მისი განვითარება ან ინციდენტობის ზრდა ეპიზოოტიურ მდგომარეობაზეა დამოკიდებული (ნავდარაშვილი, 2008).

ადამიანში ბრუცელოზს იწვევს ძირითადად *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis* (ბიოვარი 1-4) იშვიათად *B. canis*, *B. cetaceae* და *B. pinnipediae*, ხოლო *B. ovis*, *B. neotomae* და *B. suis* ბიოვარი-5-ით ადამიანთა დაავადების შემთხვევები არ არის ცნობილი (Lopes et al; 2010). თუმცა, მეცნიერთა უმრავლესობისთვის სადავო თემას წარმოადგენს ზღვის ძუძუმწოვრების პათოგენობა ადამიანებისთვის (McDonald et al., 2006; Sohn et al., 2003; Brew et al., 1999; Whatmore et al., 2008; Hernandez-Mora et al., 2013).

ბრუცელას სხვადასხვა სახეობით გამოწვეული ეპიდემიური პროცესი ერთ-მანეთისაგან განსხვავდება. *B. melitensis* ობლიგატურად პათოგენურია ადამიანის მიმართ და იწვევს ეპიდემიურ აფეთქებებს, *B. abortus*, *B. suis* კი ნაკლებად პათოგენურნი არიან და იწვევენ დაავადების სპორადულ შემთხვევებს.

დღეისათვის *B. melitensis*-ის არსებული სამი ბიოვარიდან, ბიოვარი-3 დომინირებს ხმელთაშუა ზღვის ქვეყნებში და შუა აღმოსავლეთში, მაშინ როდესაც ბიოვარი-1 დომინირებს ლათინურ ამერიკაში. ბიოვარი-1 და ბიოვარ-2-ის

შემთხვევები დაფიქსირებულია სამხრეთ ევროპის ქვეყნებში (European Commission, 2001).

ახლო აღმოსავლეთის ქვეყნებიდან თურქეთში და საუდის არაბეთში გავრცელებულია *B. melitensis*-ის ბიოვარი-2, თურქეთში, ეგვიპტეში, ტუნისში, იორდანიაში, ისრაელში – ბიოვარი-3, ლიბიაში, ომანში, ისრაელში – ბიოვარი-1, პალესტინაში – ბიოვარი-1 და 3. ბრუცელოზით ადამიანების დაავადება ხდება ძირითადად *B. melitensis* ბიოვარი-3-ით, ინფექციის ძირითად წყაროს წვრილფეხა და მსხვილფეხა რქოსანი პირუტყვი წარმოადგენს (Refai, 2002).

რაც შეეხება *B. abortus*-ის 7 ბიოვარიდან ყველაზე ფართოდ გავრცელებულია ბიოვარები: 1, 2, 3, 4 და 9. მათგან, ბიოვარი 1, 2 და 4 ყველაზე მეტად გავრცელებულია ლათინური ამერიკის ქვეყნებში, ბიოვარი-3 – აფრიკაში, თურქეთში, ირანში, რუსეთში, ბიოვარი-3 და 9 – ირანში (Diaz-Aparicio, 2013; Mathew et al., 2015; Ica et al., 2012; Hollender et al., 2013; Lucero et al., 2008; Zowghi et al., 1990; Яковлев с соавт., 2002)

მსოფლიო სტატისტიკით სასოფლო-სამეურნეო ცხოველებიდან ბრუცელოზით დაავადების მხრივ, პირველ ადგილზეა მსხვილი რქოსანი პირუტყვი, შემდეგ მოდის ცხვარი და თხა, ღორებში კი ინფექცია შეზღუდულად ვრცელდება; გამონაკლისია ამერიკა, სადაც 30 სახელმწიფოდან ღორის ბრუცელოზი დიაგნოსტირებულია 9-ში, მსხვილი რქოსნისა – 8-ში, ხოლო წვრილი რქოსნისა – მხოლოდ 2-ში (ლომინეიშვილი, გავაშელი, 2002).

ინფექციის გენერალიზაციის პირობებში, ბრუცელები განსაკუთრებით დიდი რაოდენობით გროვდებიან ცხოველის შინაგან ორგანოებში: ელენთაში, ღვიძლში, ცურში, ძვლის ტვინსა და ლიმფურ ჯირკვლებში. ინფექციის დასაწყისში, აბორტის ან მშობიარობის შემდეგ 1-3 თვის განმავლობაში ბრუცელოზით დაავადებული დასაკლავი ცხოველები, განსაკუთრებით ცხვრები და თხები, წარმოადგენენ ინფექციის საშიშ წყაროს, პირველ რიგში, სასაკლაოებისა და ხორცის წარმოებარეალიზაციის მუშაკებისათვის, ხოლო შემდგომ – მომხმარებლისათვის (ნავდარაშვილი, 2008).

დიდი ეპიზოოტოლოგიური და ეპიდემიოლოგიური მნიშვნელობა აქვს ცხოველთა აბორტებს. მკვდარი ნაყოფის გარსები, სანაყოფე სითხეები და პლაცენტა

შეიცავს დიდი რაოდენობით ბრუცელებს. ენდემურ კერებში, დაავადების ქრონიკულ ფორმაში გადასვლის შედეგად, ხშირად ვერ ხერხდება მისი დროული დიაგნოსტიკა (Xavier et al., 2010a).

არსებობს ლიტერატურული მონაცემები ადამიანიდან ადამიანზე ბრუცელების სქესობრივი გზით გადაცემის შესახებ, თუმცა ეს ბოლომდე დამტკიცებული არაა (Бессели, 1936; Глухова, 1951; Степанов, 1951; Ruben et al., 1991; Palanduz et al., 2000; Meltzer et al., 2010).

საქართველოში ადამიანთა შორის ბრუცელოზი აღწერილია 1921 წ. რაც ამ პერიოდისათვის ავადმყოფი ცხოველების არსებობის მაჩვენებელია (ბაბაკიშვილი თანაავტ., 2005).

ბრუცელოზი უპირატესად გვხვდება იმ რაიონებში, სადაც პირუტყვის მთაბარული შენახვაა გავრცელებული. ასეთ ტერიტორიებზე გადის პირუტყვის გადასარეკი ტრასები; მათი ტერიტორია გამოყენებულია საზაფხულო სამოვრებად. საზაფხულო სამოვრებზე პირუტყვის გადარეკვისას ყოველთვის არ იცავენ ვეტერინარულ-სანიტარიულ წესებს, ამიტომაც გამორიცხული არ არის გადაირეკოს ბრუცელოზზე არაკეთილსაიმედო მეურნეობის პირუტყვი, რომელიც აინფიცირებს ტრასას, წყალს, საზაფხულო სამოვრებს (ბაბაკიშვილი თანაავტ., 2005).

ცხოველთა დაინფიცირება შეიძლება მოხდეს ინფექციის გამომწვევი მიკრობების მცირე დოზებით, თანდათანობითი დაგროვებით, რომელიც ინფექციური პროცესის პირველ ეტაპზე მიმდინარეობს იმუნური სისტემის გაღიზიანების გარეშე. შესაძლებელია აღმძვრელის დიდი რაოდენობით ერთდროული მოხვედრა, რასაც მოსდევს იმუნური პასუხის გამოვლინება, დაინფიცირებიდან პირველსავე კვირაში.

ინფექციის შეჭრის მთავარ გზებს წარმოადგენს ზედა სასუნთქი გზების და ორო-ფარინგეალური ლორწოვანი გარსები და კონიუქტივა, ასევე მდებარე ცხოველებში სასქესო გზებიც. ბრუცელები ორგანიზმში შეჭრის შემდეგ, გადალახავენ მასპინძელი ორგანიზმის უჯრედულ ბარიერს და ლიმფური სადინრების გზით აღწევენ უახლოეს ლიმფურ ჯირკვლებში. ორგანიზმში შეჭრილი მიკრობების თავიდან აცილებას უზრუნველყოფს ორგანიზმის უჯრედული დამცველობითი ძალები, უმთავრესად: მაკროფაგები, T-ლიმფოციტები და სპეციფიკური



ანტისხეულები. დაავადების გამოსავალი დამოკიდებულია ინფიცირებული ცხოველის სახეობაზე, ასაკზე, იმუნურ სტატუსზე, მაკეობაზე, ორგანიზმში მოხვედრილი ბრუცელას მიკრობების რაოდენობაზე და ვირულენტობაზე.

ბრუცელებისთვის მთავარ სამიზნე უჯრედებს, როგორც ექსპერიმენტულ ცხოველებში, ისე ბუნებრივ მასპინძლებში, წარმოადგენენ რეტიკულოენდოთელური სისტემის ფაგოციტური და არაფაგოციტური უჯრედები: ტროფობლასტის უჯრედები, მაკროფაგები და დენდრიტული უჯრედები.

პათოგენების პროცესი არაფაგოციტურ ეპითელურ უჯრედებში საკმაოდ კარგადაა შესწავლილი. ეპითელურ უჯრედებში ბრუცელოზის პათოგენები ფაგოციტებში მიმდინარე პროცესის მსგავსია.

არაოფსონირებული (არასენსიბილიზირებული) ბრუცელები, ოფსონირებული ბრუცელებისგან განსხვავებით, არ განიცდიან ფაგოციტოზს, გადარჩებიან და მრავლდებიან უჯრედის შიგნით, ხოლო ფაგოციტოზის შემთხვევაში, მაკროფაგში მოხვედრილი მიკრობი ერწყმის ლიზოსომას და მასში არსებული ჟანგბადის თავისუფალი რადიკალების, აზოტის ოქსიდის ბაქტერიოციდული მოქმედებით, მიკრობთა უმეტესობა განიცდის დაშლას, თუმცა ნაწილი გადარჩება (მხოლოდ 15-30%) და გადაინაცვლებს ენდოპლაზმურ ბადეში, სადაც განაგრძობენ გამრავლებას, რის შემდეგაც ხდება მათი მოთესვა მთელს ორგანიზმში ლიმფის გზით და ვითარდება ინფექციის გენერალიზებული ფორმა.

მაკროფაგებისგან განსხვავებით, დენდრიტულ უჯრედებში უფრო ხშირად ხდება ბრუცელების შეჭრა, მათი უმეტესი ნაწილი გადარჩება და მრავლდება, რადგან ბრუცელებს აქვთ უნარი დენდრიტული უჯრედების ანტიგენის დასუსტებით მოახდინონ მათი მომწიფების ინჰიბირება (Xavier et al., 2010a).

ბრუცელების გამრავლება ცხოველის მაკეობის ბოლო ტრიმესტრში ტროფობლასტებში უფრო ინტენსიურად მიმდინარეობს სტეროიდული ჰორმონების და ერითრიტოლის მაღალი კონცენტრაციის გამო, რაც იწვევს პლაცენტის და ჩანასახის ერთიანობის დარღვევას – აბორტს, ან სუსტი შთამომავლობის მოცემას.

ბრუცელას ყველაზე ვირულენტურ სახეობებს, როგორცაა: *B. melitensis*, *B. abortus* და *B. suis*, უჯრედის გარეთა მემბრანაზე გააჩნიათ გლუვი ლიპოპოლი-საქარიდული შრე (S-LPS), რომელიც შეიცავს O პოლისაქარიდს (OPS). *B. ovis* და *B.*

*canis* ლიპოპოლისაქარიდულ შრეში ნაკლებად შეიცავენ O პოლისაქარიდს (OPS) და მის ნაცვლად (R-LPS) უჯრედის გარეთა მემბრანაზე გააჩნიათ ხორკლიანი პოლისაქარიდული შრე. O პოლისაქარიდის (OPS) ნაკლებობის გამო (R-LPS) ხორკლიანი პოლისაქარიდის შრის მქონე სახეობები უფრო იმუნოგენურებია მასპინძელ უჯრედში შეჭრისას. ცნობილია, რომ გლუვ ლიპოპოლისაქარიდს შეუძლია თავიდან აიცილოს იმუნიტეტის საპასუხო რეაქცია და ნაკლებად გაააქტიუროს ანთებითი ციტოკინები. ყველა ეს რეაქცია ხელს უწყობს ბაქტერიის გადარჩენას მასპინძლის ორგანიზმში.

ბუნებრივად დაინფიცირებული მაკე თხების ორ მესამედში ვითარდება სარძევე ჯირკვლების ანთება და მიკრობის გამოყოფა გრძელდება ლაქტაციის შემდგომ პერიოდშიც, რადგან ცური წარმოადგენს *B. melitensis*-ის საარსებო და გამრავლების საუკეთესო გარემოს, რაც წველადობის შემცირების ერთ-ერთი მთავარი ფაქტორია. გასათვალისწინებელია, რომ ხშირად მასტიტის კლინიკური ნიშნები შეუმჩნეველია. *B. ovis*-ით გამოწვეული ბრუცელოზი უმეტესად დამახასიათებელია განვითარებული მეცხვარეობის ქვეყნებში (ავსტრალია, ახალი ზელანდია, ჩრდილოეთ და სამხრეთ ამერიკა, სამხრეთ აფრიკა და ბევრი ევროპული ქვეყანა) და ძირითადად იწვევს ეპიდიდმიტს სქესობრივად მომწიფებულ ცხვრებში და სპონტანურ აბორტებს ნერბებში (Xavier et al., 2010a; Вершилова с соавт, 1974).

## 2.3 ცხოველებში ბრუცელოზის ლაბორატორიული დიაგნოსტიკა

ბრუცელოზის დიაგნოსტიკა საკმაოდ კომპლექსურია და დამყარებულია დაავადების გამოვლინებაზე (კლინიკაზე), ეპიზოოტოლოგიურ მონაცემებზე და მრავალფეროვან ლაბორატორიულ გამოკვლევაზე (სეროლოგიური, ბაქტერიოლოგიური, ალერგიული და მოლეკულური მეთოდები).

### 2.3.1 სეროლოგიური ტესტები

მე-19 საუკუნის მიწურულს რაიტმა და სმიტმა ბრუცელოზის სადიაგნოსტიკოდ შემოგვთავაზეს აგლუტინაციის რეაქცია (Wright, Smith, 1897). მას შემდეგ

ბრუცელოზის დიაგნოსტიკის გაუმჯობესების მიზნით არაერთი მიდგომა შემუშავდა, თუმცა სეროლოგიური მეთოდი დღესაც წამყვან ადგილზეა.

სეროლოგიაში ორი ტიპის სადიაგნოსტიკო ტესტი არსებობს: სასკრინინგო და დამადასტურებელი. სასკრინინგო ტესტები იაფი, ხელმისაწვდომი, სწრაფი და მაღალმგრძობიარეა, მაგრამ ხასიათდება დაბალი სპეციფიკურობით. დამადასტურებელი ტესტების უმრავლესობა კი მაღალსპეციფიკურია, მაგრამ ძვირადღირებული და რთულად შესასრულებელი, რომელიც სასურველია იყოს უფრო მაღალმგრძობიარე (Poester et al., 2010; Stemshorn et al., 1985; Gall, Nielsen, 2004; Corbel, 2006) (ცხრილი 2).

**ცხრილი 2. ბრუცელოზის სადიაგნოსტიკოდ არსებული სეროლოგიური ტესტების მგრძობიარეობის, სპეციფიკურობის და შესრულების ინდექსის მაჩვენებლები (Poester et al., 2010)**

ტესტის დასახელება	მგრძობიარეობა %	სპეციფიკურობა %	შესრულების ინდექსი (მინ-მაქს.)
სტანდარტული აგლუტინაცია	29.1-100	99.2 – 100	128.3 – 200
როზ-ბენგალის ტესტი	21.0-98.3	68.8 – 100	89.8 – 198.3
მიკროაგლუტინაცია	75.4-99.9	90.6 – 100	166.0 – 199.9
კომპლემენტის ფიქსაციის რეაქცია	23.0-97.0	30.6 – 100	53.6 – 197.0
არაპირდაპირი იმუნოფერმენტული ანალიზი	92.0-100	90.6 – 100	182.6 – 199.8
კონკურენტული იმუნოფერმენტული ანალიზი	97.5-100	99.7 – 99.8	197.3 – 199.8
ფლუორესცენტული პოლარიზაციის რეაქცია	99.0-99.3	96.9 - 100	195.9 – 199.3

**შენიშვნა:** შესრულების ინდექსი გულისხმობს ტესტის მგრძობიარეობის და სპეციფიკურობის ჯამურ მაჩვენებელს, რაც ტესტის სიზუსტეზე მიუთითებს.

სასკრინინგო ტესტებს მიეკუთვნება მიკროაგლუტინაცია (მინაზე აგლუტინაცია მაგ. როზ-ბენგალის ტესტი RBPT, მოდიფიცირებული როზ-ბენგალის ტესტი modified RBPT), არაპირდაპირი ენზიმ შეკავშირებული იმუნოსორბენტული ანალიზი (I-ELISA) და რძის რგოლური რეაქცია. კომპლემენტის ფიქსაციის რეაქცია (CFT), სინჯარული აგლუტინაცია (რაიტის რეაქცია ანუ სტანდარტული აგლუტინაცია SAT), კონკურენტული ენზიმ შეკავშირებული იმუნოსორბენტული ანალიზი (C-ELISA) და ფლორესცენტული პოლარიზაციის რეაქციები (FPA) მეცხოველეობაში გამოიყენება როგორც დამადასტურებელი სეროლოგიური ტესტები (Alton et al., 1988; Hill, 1963; Nielsen, 2002; Baum et al., 1995; Garin-Bastuji, Blasco, 1997; Nielsen et al., 1989, 2004; Robinson, 2003; MacMillan et al., 1990; Jacques et al., 1998; Poester et al., 2010; Zowghi, Ebadi, 1985; Farina, 1985; ECD, 1991; OIE, 2004b, 2008c; Garin-Bastuji et al., 1998; FAO/WHO, 1986; Blasco et al., 1994b; Nielsen et al., 2010).

**ჰედლსონის რეაქცია (მინაზე აგლუტინაცია, მიკროაგლუტინაცია)** 1926 წელს ჰედლსონმა (Huddleson, 1929) მოგვაწოდა საკმაოდ მგრძნობიარე და მარტივი აგლუტინაციის რეაქცია, რომელიც დღეისათვის წარმატებით გამოიყენება მედიცინაში. მისი უპირატესობა, რაიტის რეაქციასთან შედარებით, გამოიხატება რეაქციის სისწრაფეში. იგი როზ-ბენგალის ტესტის მსგავსად, იდგმება სასაგნე მინაზე და შედეგების შეფასება ხდება რეაქციის დადგმიდან  $\approx 4$  წუთის განმავლობაში.

**როზ-ბენგალის ტესტი (რბტ)** როზ-ბენგალის ტესტი მჟავა არეში მიმდინარე აგლუტინაციის რეაქციაა ბენგალის ვარდისფერი საღებავით შეფერილ ანტიგენტან (*B. abortus*-ის 1119-3 და 99 შტამები). როზ-ბენგალის ტესტი ხასიათდება მაღალი სპეციფიკურობით, ტექნიკურად მარტივია და შეიძლება ჩატარდეს ნებისმიერ პირობებში. სიზუსტის თვალსაზრისით, უახლოვდება კომპლემენტის ფიქსაციის რეაქციას.

როზ-ბენგალის ტესტი 20 წელზე მეტია, რაც დამუშავდა ამერიკაში და პრაქტიკაში დაინერგა მსხვილფეხა რქოსან პირუტყვში ბრუცელოზის სადიაგნოსტიკოდ. მიუხედავად მწირი და ზოგჯერ შეუთავსებადი ინფორმაციისა (Trap, Gaumont, 1975; Farina, 1985; MacMillan, 1990; Blasco et al., 1994a,b; Alton et al., 1990), ის ითვლება საერთაშორისოდ მიღებულ ტესტად წვრილფეხა რქოსან პირუტყვში (FAO/WHO, 1986; Garin-Bastuji, Blasco, 1997). თეორიული და პრაქტიკული

თვალსაზრისით, მნიშვნელოვან პრობლემას წარმოადგენდა ანტიგენის სტანდარტიზაცია წვრილფეხა პირუტყვში ტესტის მგრძნობელობის გაუმჯობესების მიზნით (Blasco et al., 1994a,b). ზოგიერთი მკვლევარის (Alton et al., 1988; Blasco et al., 1994a) მონაცემებით, როზ-ბენგალის ტესტით მიღებული უარყოფითი შედეგები, კომპლემენტის ფიქსაციით გამოკვლევისას, დადებითი აღმოჩნდა ცხვარსა და თხაში. როზ-ბენგალის ტესტის მგრძნობელობის გაუმჯობესების მიზნით, ცხოველთა ჯანმრთელობის მსოფლიო ორგანიზაციის (OIE) რეკომენდაციის შესაბამისად მოხდა ტესტის მოდიფიკაცია. კერძოდ, მოწოდებული იქნა საკვლევი შრატის და ანტიგენის გამოყენება 3:1 თანაფარდობით მსხვილფეხა საქონელში გამოყენებული 1:1 თანაფარდობის ნაცვლად (Blasco et al., 1994a,b; OIE, 2004b; Alton et al., 1988, 1975; OIE, 2008a,b; Ferreira et al., 2003; Angus, Barton, 1984; Nicoletti, 1967; Morgan et al., 1969; Davies, 1971; Corbel, 2006; ლომინეიშვილი, გავაშელი, 2002; Дегтяренко с соавт, 1978; Абиджанов с соавт, 1980). აღნიშნული ცვლილების შედეგად, მოიმატა ტესტის მგრძნობელობამ სპეციფიკურობის შეცვლის გარეშე, რაც განსაკუთრებით მნიშვნელოვანია დამადასტურებელი ტესტის გამოყენებლობის შემთხვევაში.

*სინჯარული აგლუტინაციის (რაიტის) რეაქცია (სტანდარტული აგლუტინაციის რეაქცია – SAT)* ეს ტესტი აღწერა და შემოგვთავაზა რაიტმა და სმიტმა 1897 წელს (Wright, Smith, 1897), მალტის ცხელების სადიაგნოსტიკოდ. თავდაპირველად, რეაქცია იდგმებოდა მარტივად, ბრუცელას უჯრედების დამატებით საკვლევ შრატებზე, არ ხდებოდა შრატის ტიტრაცია და სხვადასხვა განზავებებში რეაქციის დადგმა. დღეისათვის რაიტის რეაქცია ბრუცელოზის სადიაგნოსტიკოდ ცხოველთა ჯანმრთელობის მსოფლიო ორგანიზაციის მიერ მოწოდებული არაა ჯვარედინი რეაქციების და ცრუ დადებითი შედეგების გამო და გამოიყენება მხოლოდ ალტერნატიული მეთოდების არარსებობის შემთხვევაში (Corbel et al., 1984; Corbel, 2006; OIE, 2000a, 2009; Nielsen, 2002; Nicoletti, 2010; Poester et al., 2010).

*კომპლემენტის ფიქსაციის რეაქცია (კვრ)* გამოიყენება ბრუცელოზის სადიაგნოსტიკოდ როგორც მსხვილფეხა რქოსან პირუტყვში, ისე ცხვარსა და თხაში, თუმცა უფრო ეფექტურია და საკონფირმაციო ტესტად მოწოდებულია წვრილფეხა რქოსან პირუტყვში (Burgess et al., 1982; Farina, 1985; Stemshorn et al., 1985; FAO/WHO,

1986; MacMillan, 1990; Alton, 1990; OIE, 2009). ბრუცელოზზე დადებითი და უარყოფითი შრატების გამოკვლევით, ზოგ შემთხვევაში კომპლემენტის ფიქსაციის რეაქციის, როზ-ბენგალ ტესტის და იმუნოფერმენტული რეაქციების მგრძობელობა მსგავსი აღმოჩნდა (Diaz-Aparicio et al., 1994), ზოგჯერ კი შედარებით დაბალი (88,6%), ვიდრე როზ-ბენგალის (92,1%) და არაპირდაპირი იმუნოფერმენტული რეაქციის (100%) (Blasco et al., 1994a,b). აღნიშნულის გარდა, კომპლემენტის ფიქსაციის რეაქციისთვის დამახასიათებელია უარყოფითი მხარეები: შესრულების სირთულე, შრომატევადობა, მაღალი დანახარჯები, პროზონი მაღალ განზავებებში, ჰემოლიზური შრატის შემთხვევაში დიაგნოსტიკის სირთულე და დაბალ ტიტრებში შედეგების რთული ინტერპრეტაცია (Nicoletti, 2010). ბრუცელოზზე კეთილსაიმედო კერაში ფარას გამოკვლევებისთვის საკმარისია მხოლოდ როზ-ბენგალ ტესტის გამოყენება, ხოლო ცალკეული ინდივიდების სკრინინგისთვის სასურველია, როგორც სასკრინინგო (როზ-ბენგალის), ისე დამადასტურებელი (კომპლემენტის ფიქსაციის) ტესტების ჩატარება. თუმცა REV-1 ვაქცინით იმუნიზაციისას ტესტების სპეციფიკურობა საგრძობლად მცირდება (Fensterbank et al., 1982; Jiménez de Bagüés et al., 1992; Díaz-Aparicio et al., 1994; Nielsen et al., 2010). მრავალ ლიტერატურულ წყაროზე დაყრდნობით, კომპლემენტის ფიქსაციის რეაქცია არ არის მაღალ-მგრძობიარე, მაგრამ საკმაოდ მაღალ სპეციფიკურ ტესტად ითვლება და ცხოველთა ჯანმრთელობის მსოფლიო ორგანიზაციის მიერ მოწოდებულია საერთაშორისო ბაზრისთვის განკუთვნილი ცხოველების გამოსაკვლევად (McGiven et al., 2003; Nielsen, 2002; Ramirez-Pfeiffer et al., 2006; Gall et al., 2001; OIE, 2009).

*კონკურენტული (ენზიმ შეკავშირებული იმუნოსორბენტული) იმუნოფერმენტული ანალიზი (C-ELISA)* მაღალმგრძობიარე და მაღალსპეციფიკური რეაქციაა. ტესტი მსხვილფეხა რქოსან პირუტყვში მოწოდებულია, როგორც სავალდებულო საერთაშორისო ბაზარზე გასინჯვისას, ხოლო ღორების გამოკვლევისას წარმოადგენს ალტერნატიულ ტესტს (OIE, 2000a,d, 2008a, 2009; Nielsen, 2002; Nielsen et al., 2008). კონკურენტული ენზიმ შეკავშირებული იმუნოსორბენტული ანალიზი (C-ELISA) უფრო მაღალი სპეციფიკურობით ხასიათდება არაპირდაპირ ენზიმ შეკავშირებულ იმუნოსორბენტულ რეაქციასთან (I-ELISA) შედარებით. კონკურენტულმა იმუნოფერმენტულმა ანალიზმა (C-ELISA) მაქსიმალურად შეამცირა ჯვარედინი

რეაქციების შემთხვევები და ბევრად უფრო სწრაფი აღმოჩნდა კომპლემენტის ფიქსაციის რეაქციასთან შედარებითაც. აღნიშნული ტესტით შესაძლებელია *B. abortus* S-19 ვაქცინაციის შედეგად წარმოქმნილი ანტისხეულების დიფერენცირება ბუნებრივი ინფიცირების დროს წარმოქმნილი ანტისხეულებისგან (Gall, Nielsen, 2004; MacMillan et al., 1990). თუმცა, არც ეს ტესტი აღმოჩნდა პრაქტიკულად ფინანსურად ხელმისაწვდომი, რამაც საჭირო გახადა ფლუორესცენტული პოლარიზაციის რეაქციის დანერგვა (FPA) (Nielsen et al., 1996, 1999; OIE, 2009). იგი ზოგჯერ გამოიყენება, როგორც სასკრინინგო ტესტი (Etman et al., 2014; Nielsen et al., 1995; Weynants et al. 1996., Al Dahouk et al., 2003).

*არაპირდაპირი (ენზიმ შეკავშირებული იმუნოსორბენტული) იმუნოფერ-მენტული რეაქცია (I-ELISA)* ცხოველთა ჯანმრთელობის მსოფლიო ორგანიზაციის მიერ, ბრუცელოზის სკრინინგისთვის მოწოდებულია ასევე მაღალმგრძობიარე არაპირდაპირი ენზიმ შეკავშირებული იმუნოსორბენტული რეაქცია, რომელიც პირველად შეიმუშავა H. Carlsson-მა ადამიანებში ბრუცელოზის სადიაგნოსტიკოდ (Carlsson et al., 1976). ამჟამად, ეს ტესტი გამოიყენება მსხვილფეხა რქოსან პირუტყვშიც ბრუცელოზის სკრინინგისთვის, ხოლო ღორების გამოკვლევისას წარმოადგენს ალტერნატიულ ტესტს (Gall et al., 2003; Diaz-Aparicio et al., 1994; Blasco et al., 1994b; Samartino et al., 1999; OIE, 2000a,d). ცხვრისა და თხის გამოკვლევისას საერთაშორისო ბაზარზე ეს ტესტი არაა მოწოდებული არასაკმარისი სტანდარტულობის და იმის გამო, რომ ვერ ხერხდება ვაქცინირებულების და ბუნებრივად ინფიცირებულების განსხვავება (OIE, 2008b). აღნიშნული ტესტის მსხვილფეხა პირუტყვში გამოყენების დროსაც, ადგილი აქვს ჯვარედინ რეაქციებს და ხშირად რთულია ვაქცინირებულების და ბუნებრივად ინფიცირებულების განსხვავება (OIE, 2000d; Havas, 2011).

*ფლუორესცენტული პოლარიზაციის რეაქცია (FPA)* მაღალმგრძობიარე და მაღალსპეციფიკური რეაქციაა, რომელიც შეიძლება შესრულდეს მოკლე დროში სავლე პირობებშიც და შესაძლებელს ხდის სავაქცინე და სავლე შტამების გარჩევას. აღნიშნული რეაქცია დამუშავდა 1996 წ. (Nielsen et al., 1996a) და მას შემდეგ გაიარა ვალიდაციების მთელი რიგი. ფლუორესცენტული პოლარიზაციის რეაქცია დაფუძნებულია მოლეკულების როტაციის პრინციპზე, სადაც როტაციის სიჩქარე

მოლეკულის ზომის უკუპროპორციულია. პატარა ზომის მოლეკულები უფრო სწრაფად მოძრაობენ, ვიდრე დიდი ზომის. ბრუცელოზის შემთხვევაში, ანტიგენებად გამოიყენება ფლუორესცენტული იზოთიოციანატით მონიშნული მცირე მოლეკულური წონის ოლიგოპოლისაქარიდის ნაწილაკები. ფლუორესცენტული პოლარიზაციის რეაქცია სწრაფი, ჰომოგენური რეაქციაა და არ საჭიროებს ზედმეტ მანიპულაციებს. ის შეიძლება დაიდგას, როგორც 96 ფოსოიან პლანშეტზე, ისე ცალკეულ სინჯარაშიც. ეს უკანასკნელი, უფრო მოსახერხებელია საველე პირობებში სწრაფი ტესტის დასადგმელად (Poester et al., 2010; Nielsen, Gall, 2001). ფლუორესცენტული პოლარიზაციის რეაქცია ამჟამადაც გადის მთელ რიგ პროცედურებს ბრუცელოზის სხვადასხვა ეროვნულ რეფერალურ ლაბორატორიებში აღიარების მოსაპოვებლად, რადგან მას მთელი რიგი უპირატესობები გააჩნია (შედარებით იაფია, ადვილად შესასრულებელი სხვა, უკვე აღიარებულ ტესტებთან შედარებით) და დღეისათვის მოწოდებულია საერთაშორისო ბაზარზე შესამოწმებლად და წარმოადგენს ალტერნატიულ ტესტს მსხვილფეხა რქოსან პირუტყვში და ღორში სადიაგნოსტიკოდ (Dajer et al., 1999; Nielsen et al., 1999; Gall et al., 2000; McGiven et al., 2003; OIE, 2000a,d, 2009; Nielsen, Yu, 2010; Nielsen et al., 2000, 2001; Samartino et al., 1999a; Nielsen, 2002; Gall, Nielsen, 2004; Bahn et al., 2005; Minas et al., 2005; Nielsen et al., 2005; Ramirez-Pfeiffer et al., 2006, 2007, 2008; Silva et al., 2004; Stournara et al., 2007; Montagnaro et al., 2008; Gall et al., 2000; Havas, 2011).

*რძის რგოლური რეაქცია* ძირითადად გამოიყენება მსხვილფეხა რქოსანი პირუტყვის სკრინინგისთვის. მიუხედავად ცხვარსა და თხაში გამოყენების ფაქტებისა, ცხოველთა ჯანმრთელობის მსოფლიო ორგანიზაციის მიერ იგი ცხვარსა და თხაში ბრუცელოზის სადიაგნოსტიკოდ მოწოდებული არაა მრავალი ცრუ დადებითი შედეგის გამო (Alton et al., 1975; Hunter et al., 1972; OIE, 2000a, 2009).

*ალერგიული სინჯი* ბრუცელინის კანის სინჯი წვრილფეხა რქოსან პირუტყვში გამოიყენება როგორც ბრუცელოზზე სასკრინინგო ან დამატებითი ტესტი, რომელსაც გააჩნია მაღალი მგრძნობელობა და სპეციფიკურობა სეროლოგიურ რეაქციებთან შედარებით, ვინაიდან არ იძლევა ჯვარედინ რეაქციებს სხვა ბაქტერიებთან (Saegerman et al., 1999; Bercovich et al., 1993; OIE, 2008b). თუმცა, ერთ-ერთი ექსპერიმენტის დროს დადებითი რეაქცია აღინიშნა, როგორც *B. abortus*-ის



შტამით ვაქცინირებულ, ისე სხვა ბაქტერიებით დაინფიცირებულ ცხოველებში (Bercovich, 2000). Rev-1 ვაქცინის გამოყენების შემთხვევაში იძლევა დადებით რეაქციას წლების განმავლობაში, რის გამოც იგი წარმოადგენს საუკეთესო სასკრინინგო ტესტს არავაქცინირებული ფარას გამოკვლევისას (Robinson, 2003; FAO/WHO, 1986; Garin-Bastuji et al., 1998).

ადამიანებში, ბრუცელოზზე კანის ალერგიული სინჯი შემოგვთავაზა ბიურნემ (Burnet, 1922), რომელიც შემდეგ გამოყენებული იყო ცხოველებშიც. იგი ვარგისია არავაქცინირებულ ცხოველებში ბრუცელოზის გამოსავლენად. ბრუცელინი სტერილური ბიოლოგიური პრეპარატია, რომელიც შეიცავს ბრუცელების სპეციფიკური ცხოველმყოფელობის პროდუქტებს. პრეპარატი შეჰყავთ კანქვეშ, ქვედა ქუთუთოში 0.1 მლ. დაავადებულ ცხოველებს ალერგენის შეყვანის ადგილზე უვითარდებათ ანთებითი რეაქცია შემუშების სახით და სიწითლე. რეაქცია იკითხება 48 საათის შემდეგ ვიზუალური დათვალიერებით და პალპაციით. დადებითი პასუხის შემთხვევაში ვითარდება  $\approx 2$  მმ დიამეტრის შემუშება და კანის სიწითლე. ხილული სიმპტომების არქონისას დიაგნოზის დასმა პალპაციით გასინჯვისას რთულია, ხოლო ყოველგვარი ცვლილებების გარეშე – რეაქცია უარყოფითია (OIE, 2008b).

ცხოველთა ჯანმრთელობის მსოფლიო ორგანიზაციის მიერ მსხვილფეხა და წვრილფეხა რქოსან პირუტყვში სადიაგნოსტიკოდ მოწოდებულია შემდეგი ტესტები: როზ-ბენგალის ტესტი, მოდიფიცირებული როზ-ბენგალის ტესტი, კომპლემენტის ფიქსაციის რეაქცია, არაპირდაპირი და კონკურენტული იმუნოფერმენტული რეაქციები და ფლუორესცენტული პოლარიზაციის რეაქცია. წვრილფეხა შინაური პირუტყვის გამოკვლევისას ალტერნატიულ ტესტს წარმოადგენს ბრუცელინის ტესტი (კანის ალერგიული სინჯისთვის) (Farina, 1985; MacMillan, 1990; European Council Directive (ECD), 1991; OIE, 2008, 2004b). ღორის ბრუცელოზის შემთხვევაში არაპირდაპირი იმუნოფერმენტული რეაქცია გამოიყენება, როგორც სავალდებულო, ხოლო როზ-ბენგალის და ფლუორესცენტული პოლარიზაციის რეაქციები – როგორც ალტერნატიული ტესტები (OIE, 2008).

სკრინინგის შედეგად გამოვლენილი დადებითი და საეჭვო დადებითი შრატები საჭიროებენ დადასტურებას უფრო მაღალსპეციფიკური ტესტებით ცრუ

დადებითი შედეგების გამოსარიცხად. დამადასტურებელ ტესტებს მიეკუთვნება: კომპლემენტის ფიქსაციის რეაქცია, კონკურენტული იმუნოფერმენტული ანალიზი, ფლუორესცენტული პოლარიზაციის რეაქცია (Davies, 1971; Alton et al., 1988; Hill, 1963; Garin-Bastuji, Blasco, 1997; Nielsen et al., 1989; MacMillan, 1990; Jacques et al., 1998; Poester et al., 2010).

სეროლოგიური ტესტები ცალ-ცალკე ფარას გამოკვლევისას ეფექტურ სადიაგნოსტიკო საშუალებას წარმოადგენს, თუმცა ცალკეული სულის გამოკვლევის შემთხვევაში ხდება დაავადებულთა მხოლოდ 70%-ის გამოვლენა (Nicoletti, 1969; Fensterbank, 1986), ამიტომ რეკომენდებულია სასკრინინგო და საკონფირმაციო ტესტების კომპლექსური გამოყენება (Garin-Bastuji et al., 1998; FAO/WHO, 1986; Blasco et al., 1994b).

დღეისათვის, ცხოველთა ბრუცელოზის სადიაგნოსტიკოდ როზ-ბენგალის ტესტი, იმუნოფერმენტული ანალიზი და ფლუორესცენტული პოლარიზაციის რეაქციები წარმოადგენენ ძირითად სადიაგნოსტიკო ტესტებს საერთაშორისო ბაზარზე, როგორც მაღალმგრძნობიარე და სპეციფიკური ტესტები. თუმცა, არაპირდაპირი, კონკურენტული იმუნოფერმენტული და ფლუორესცენტული პოლარიზაციის რეაქციები ჯერ კიდევ საჭიროებენ გარკვეულ სტანდარტიზაციას და ვალიდაციას მასიურ გამოკვლევებში გამოყენებამდე (Godfroid et al., 2010; Nielsen et al., 2010).

### **2.3.2 ბაქტერიოლოგიური დიაგნოსტიკა**

ბრუცელოზის დიაგნოსტიკის ერთ-ერთი მნიშვნელოვანი მეთოდია აღმძვრელის გამოყოფა, რაც ბრუცელოზის დადასტურებული დიაგნოზის დასმის საშუალებას იძლევა და ბრუცელოზის დიაგნოსტიკაში „ოქროს სტანდარტს“ წარმოადგენს. სავარაუდო დიაგნოზი შეიძლება დაისვას პლაცენტის, აბორტირებული ნაყოფის და ვაგინალური ტამპონიდან დამზადებული ნაცხების გრამის წესით შეღებვის და შემდგომ მიკროსკოპში დაკვირვებით, შესაძლოა ბრუცელოზის სავარაუდო შემთხვევის გამოვლენა, თუმცა, მორფოლოგიურად მსგავსი სხვა ორგანიზმების (*Brucella ovis*, *Chlamydophila abortus*, *Coxiella burnetii*)

არსებობამ შესაძლებელია შეცდომაში შეგვიყვანოს. ამიტომ, ყველაზე უტყუარ მეთოდს წარმოადგენს აღმძვრელის გამოყოფა (OIE, 2001; Alton et al., 1988).

**ბაქტერიოლოგიური გამოკვლევა:** ბრუცელას შტამების გამოსაყოფად ცხოველებში საუკეთესო მასალას წარმოადგენს ცხოველის სიცოცხლეში მოგდებული ნაყოფი და მისი ორგანოები, კოტილედონები და პლაცენტის დანეკროზებული უბნები, ამნიონის სითხე, ვაგინალური ტამპონები და რძე საუკეთესო მასალაა წვრილფეხა და მსხვილფეხა პირუტყვიდან აღმძვრელის გამოსაყოფად, ხოლო ცხოველის დაკვლის შემდგომ – ელენტა და ლიმფური ჯირკვლები (Alton et al., 1988, 1975; Garin-Bastuji et al., 2006; Marin et al., 1996a,b; Poester et al., 2010). მნიშვნელოვანია ნიმუშების სწორად აღება და ლაბორატორიაში დროულად მიტანა, შესაბამისი პირობების დაცვით.

*B. melitensis*-ი ზრდისთვის არ საჭიროებს განსაკუთრებულ პირობებს, როგორცაა ნიადაგზე შრატის დამატება ან CO<sub>2</sub>-იანი გარემო. ის იზრდება ჩვეულებრივ მყარ საკვებ ნიადაგზეც 37°C-ზე აერობულ პირობებში, მაგრამ ხშირად დაბინძურებული მასალის შემთხვევაში საჭიროა გაითესოს სელექტიურ ნიადაგზე.

ფარელის სელექტიური ნიადაგი (Farrell, 1974) შემუშავდა *B. abortus*-ის გამოსაყოფად, თუმცა რეკომენდებულია *B. melitensis*-ის გამოსაყოფადაც, მაგრამ ნიადაგში საჭირო კონცენტრაციებით დამატებული ნალიდიქსინის მჟავა და ბაციტრაცინი თრგუნავს *B. melitensis*-ის ზოგიერთი ბიოვარის ზრდას, რისთვისაც პარალელურად გამოიყენება აგრეთვე მოდიფიცირებული თაიერ-მარტინის ნიადაგიც, რომლის გამოყენების შემთხვევაშიც მიკრობის გამოყოფის შესაძლებლობა საგრძნობლად იზრდება (Marin et al., 1996a,b; OIE, 2001; Alton et al., 1988; Garin-Bastuji, Blasco, 2004). კულტივირება სპეციფიკური მეთოდია და მისი მგრძნობელობა დამოკიდებულია საკვლევ ნიმუშში არსებული ბრუცელას მიკრობების სიცოცხლის უნარიანობაზე, ნიმუშის ტიპზე და ერთი და იგივე ცხოველიდან აღებული ნიმუშების რაოდენობაზე (Hornitzky, Searson, 1986; Marin et al., 1996b). აღმძვრელის გამოყოფა საკმაოდ დიდ დროს საჭიროებს და საკვლევ ნიმუშში მცირე რაოდენობით არსებობის შემთხვევაში შესაძლებელია ვერც მოხერხდეს (Garin-Bastuji et al., 2006). აღმძვრელის გამოყოფის გაუმჯობესების მიზნით, ხშირად სისხლი და ქსოვილური სითხეები ითესება თხევად ნიადაგში. თხევად ნიადაგად შეიძლება გამოვიყენოთ

როგორც ორფაზიანი Castañeda (1947), ისე ერთფაზიანი ნიადაგები (BD Bactec blood culture collection system, Sparks, Maryland, USA). სხვა დანარჩენი ნიმუშების გათესვა კი ხდება ბრუცელას მიმართ სელექტიურ (ფარელის, მოდიფიცირებული თაიერ-მარტინის აგარი) და არასელექტიურ მყარ საკვებ ნიადაგზე (ცხვრის სისხლიანი აგარი, შოკოლადისებური აგარი). აღსანიშნავია, რომ ბრუცელას სახეობების უმრავლესობა უკეთესად იზრდება საკვებ ნიადაგში 5–10% ცხენის ან ხარის შრატის თანაობისას (Marin et al., 1996a,b; Poester et al., 2010).

გამოყოფილი კულტურების დადასტურება ხდება შემდეგი ბიოქიმიური ტესტებით (ცხრილი 3).

ცხრილი 3. ბრუცელას სახეობათა ბიოქიმიური ტესტირება

ბრუცელას სახეობები	გრამით შეღებვა	კოლონიის ფორმა	პოლიკლონური შრატით აგლუტინაცია ( <i>B. melitensis</i> , <i>B. abortus</i> )	აკრიფლავინის ტესტი	ოქსიდაზას ტესტი	კატალაზას ტესტი	ურეაზას ტესტი	H <sub>2</sub> S გამომუშავება	TSI	თიონინი (1: 100 000)	ფუქსინი (1:100 000)	ფაგისადმი მგრძობელობა
<i>B.abortus</i>	უარყოფითი	გლუვი	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+
<i>B.melitensis</i>	უარყოფითი	გლუვი	+	-	+	+	++	-	-	+	+	-
<i>B.suis</i>	უარყოფითი	გლუვი	+	-	+	+	+++	+	-	+	-	+/-
<i>B.ovis</i>	უარყოფითი	ხორკლიანი	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-
<i>B.canis</i>	უარყოფითი	ხორკლიანი	-	+	+	+	++++	-	-	+	-	-
<i>B.neotomae</i>	უარყოფითი	გლუვი	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+/-
<i>B.microti</i>	უარყოფითი	გლუვი	+	-	-	_(+)	+	_(+)	-	+	+	+/-

### 2.3.3 მოლეკულური დიაგნოსტიკა

ჩვეულებრივ, ბრუცელოზის დიაგნოზი დამყარებულია კლინიკური ნიმუშებიდან ან პათოლოგიური მასალიდან ბრუცელას შტამის გამოყოფაზე ან სეროლოგიურად, ბრუცელას საწინააღმდეგო ანტისხეულების აღმოჩენაზე. ბრუცელას კულტურის მიღება უტყუარი დასტურია ორგანიზმში ამ ინფექციის არსებობისა, თუმცა კულტურის გამოყოფის პროცესი საკმაოდ ხანგრძლივია და რამდენიმე კვირას საჭიროებს. სეროლოგიური ტესტები სწრაფია, მაგრამ შესაძლოა აჩვენოს ცრუ დადებითი შედეგი ანტიგენ-ანტისხეულის არასპეციფიური დაკავშირების ან ვაქცინირებულ ცხოველში, ვაქცინის საწინააღმდეგო ანტისხეულების დიდი რაოდენობით გამომუშავების შედეგად. ყოველივე ამის გათვალისწინებით, ბრუცელოზის ზუსტი დიაგნოსტიკისთვის სასურველია უფრო სწრაფი, მგრძობიარე და სპეციფიური ტესტების შემუშავება.

თანამედროვე დიაგნოსტიკაში მნიშვნელოვან ადგილზეა მოლეკულურ დონეზე ჩატარებული ტესტები, კერძოდ, პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქცია (PCR), რომელიც წარმატებით გამოიყენება მრავალი მიკრობის დნმ-ის აღმოსაჩენად (Henderson et al., 1994; Romero et al., 1995a; Bricker, 2002; Herman et al., 1992; Qin et al., 2003). არაერთი ნაშრომი აღწერს და გვთავაზობს სუფთა კულტურაში მაღალმგრძობიარე PCR-მეთოდს, ბრუცელას დნმ-ის სხვადასხვა უბნის, ანუ სამიზნე მოლეკულური მარკერის (16S rRNA, bscp31, IS 6501/711) აღმოჩენისთვის (Gee et al., 2004; Bricker, 2002; Quahrani et al., 1993; Halling et al., 1993; Fekete et al., 1990; Baily et al., 1992; Matar et al., 1996; Herman, De Ridder, 1992; Romero et al., 1995a,b; Da Costa et al., 1996). ამასთანავე, მრავალი მკვლევარი შეეცადა კულტურის გამოყოფის გარეშე, პირდაპირ კლინიკურ და საველე ნიმუშებში ბრუცელას პათოგენის აღმოჩენისთვის PCR-მეთოდის შემუშავებას, თუმცა ეს უკანასკნელი ჯერ კიდევ საჭიროებს დახვეწას, რათა იქცეს კლინიკურად სარწმუნო სადიაგნოსტიკო ტესტად (Kattar et al., 2007; Fekete et al., 1992; Debeaumont et al., 2005; Romero et al., 1995b; Queipo-Ortuno et al., 2006; Navarro et al., 2002; Leal-Klevezas et al., 1995; Gupta et al., 2006; Ilhan et al., 2008a,b; Al Dahouk et al., 2013; Elfaki et al., 2005; Cloeckaert et al., 2000; O'Leary et al., 2006; Xavier et al., 2010b; Yu, Nielsen, 2010). ამასთანავე, კლინიკური და საველე ნიმუშების გამოყენებით ჩატარებული კვლევების მხოლოდ მცირე ნაწილშია მოხსენიებული

PCR-მეთოდი, როგორც სადიაგნოსტიკო ტესტი (Fekete et al., 1992; Cloeckaert et al., 2000; Romero et al., 1995a; Leal-Klevezas et al., 1995). ამჟამად, PCR მეთოდი წარმატებით გამოიყენება არა მხოლოდ ბრუცელას საეჭვო კულტურების დასადასტურებლად, არამედ, სახეობების დასადგენადაც.

**AMOS PCR** ფართოდ გამოიყენება ბრუცელას სახეობის დასადგენად. ეს პირველი მულტიპლექს PCR მეთოდი აღწერილი იყო Bricker და Halling-ის მიერ 1994 წელს (Bricker, Halling, 1994). ამ ტესტის სამიზნეა IS711 ელემენტი, რომელიც ბრუცელას ყველა სახეობას ქრომოსომის სხვადასხვა, მისთვის უნიკალურ ადგილას გააჩნია. AMOS PCR-ში გამოიყენება 5 პრაიმერის ნარევი, რომელთაგან ოთხი სპეციფიკური ფორვარდ პრაიმერი განასხვავებს ბრუცელას ოთხ სახეობას. ტესტის სახელწოდებაც აღნიშნული სახეობების აბრევიატურას წარმოადგენს: *A-abortionus*, *M-melitensis*, *O-ovis*, *S-suis*. მისი საშუალებით შესაძლებელი გახდა: *B. abortus* 1, 2 და 4 ბიოვარის, *B. melitensis*-ის სამივე ბიოვარის, *B. ovis* და *B. suis* 1 ბიოვარის დადგენა. ეს ის სახეობებია, რომლებიც იმ პერიოდისთვის ამერიკაში ძირითადად მსხვილფეხა რქოსან საქონელში ცირკულირებდნენ. მოგვიანებით, 2000 წ.-ს ჩატარებული კვლევის მიხედვით, აღნიშნული რეაქციის მოდიფიკაციის შედეგად (სავაქცინე შტამების სახეობა-სპეციფიკური პრაიმერების დამატება სარეაქციო არეში) შესაძლებელი გახდა S19 და RB51 ვაქცინირებული ცხოველების დიფერენცირება ბუნებრივად ინფიცირებულისგან (Bricker, Halling 1995; Bricker et al., 2003). AMOS PCR-ის ნაკლი იმაში მდგომარეობს, რომ შეუძლებელია ბრუცელას ყველა სახეობის და ამასთანავე ზემოთ აღნიშნული ოთხი სახეობის ზოგიერთი ბიოვარის დადგენაც (Bricker, Halling, 1994; Ewalt, Bricker, 2000).

**Bruce-ladder - PCR** ბრუცელას სახეობების იდენტიფიკაციის გაუმჯობესების მიზნით, 2006 წელს D. Garcia-Yoldi-ის და მისი კოლეგების მიერ დამუშავდა და გამოქვეყნდა Bruce-ladder PCR, რომელმაც შემდგომ წარმატებით ჩაანაცვლა AMOS - PCR და დღესაც წარმატებით გამოიყენება მსოფლიოს მრავალ ლაბორატორიაში (Garcia-Yoldi et al., 2006). *Bruce-ladder*-PCR წარმოადგენს ერთ-ერთ პირველ მულტიპლექსურ რეაქციას რვა წყვილი პრაიმერის გამოყენებით, რომლითაც შესაძლებელი გახდა ბრუცელას ცნობილი სახეობების ტიპირება სავაქცინე შტამების ჩათვლით. მოგვიანებით, აღნიშნული მეთოდი უფრო დაიხვეწა და დღეისათვის შესაძლებელია ბოლო წლებში გამოყოფილი ახალი სახეობების, *B. microti* და *B.*

*inopinata*-ს იდენტიფიცირებაც (Lopez-Goni et al., 2008; Meyer-Scholl et al., 2010; Weiner et al., 2011).

**SNP (Single Nucleotide Polymorphism)** ერთ-ნუკლეოტიდური პოლიმორფიზმი ერთ-ნუკლეოტიდური პოლიმორფიზმი (SNP) ეწოდება დნმ-ის თანმიმდევრობის პოლიმორფიზმს, რომელიც წერტილოვანი (ერთ-ნუკლეოტიდური) მუტაციების შედეგად წარმოიქმნება. SNP ევოლუციურად სტაბილურ მარკერს წარმოადგენს, რაც ფილოგენეტიკური დიდი დაჯგუფებების და ასევე ახალი განშტოებების განსაზღვრის საშუალებას იძლევა. SNP მრავლად გვხვდება ბაქტერიულ გენომში და ფართოდ გამოიყენება პათოგენური ბაქტერიების, მათ შორის ბრუცელას გენოტიპირებასა და ფილოგენეტიკურ კვლევებში. ბრუცელას შტამების სახეობა-სპეციფიკური SNP ტიპირებისთვის, ბრუცელას 160 იზოლატის 4,396 bp ზომის ლოკუსის სეკვენსის საფუძველზე შეირჩა სამი გენის (*glk*, *omp*, *trp*) გენეტიკური მარკერები მათში არსებული ერთ-ნუკლეოტიდური პოლიმორფიზმების ანალიზის მიხედვით. ეს მარკერებია: *omp151F*, *glk196R*, *glk427R*, *omp239F*, *glk255R*, *trp290R* (Scott et al., 2007; Whatmore et al., 2007).

ბრუცელოზის დიაგნოსტიკაში SNP წარმოადგენს შედარებით ახალ მეთოდს, რომელიც შესაძლებელს ხდის სამი გენის 6 ლოკუსში, ერთ-ნუკლეოტიდური პოლიმორფიზმის ალტერნატიული ვარიანტების კომბინაციით, ბრუცელას სახეობების დადგენას.

ვინაიდან ბრუცელას შტამები გენეტიკურად საკმაოდ სტაბილურია, ერთ-ნუკლეოტიდური პოლიმორფიზმები მნიშვნელოვან როლს თამაშობენ ამ პათოგენის გენოტიპირებაში და აგრეთვე შტამების გეოგრაფიული წარმომავლობის დადგენაში (Scott et al., 2007; Whatmore et al., 2007; Foster et al., 2009, 2012; Gopaul et al., 2008).

**MLVA (Multiple Locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis)** მრავლობითი ლოკუსების ტანდემურად განმეორებადი თანმიმდევრობების ცვლადი რაოდენობის ანალიზი ბაქტერიული დნმ-ის ტიპირების ერთ-ერთი მეთოდია, რომელიც ხასიათდება შტამების მაღალი გარჩევადობით და საშუალებას გვაძლევს ერთმანეთისგან განვასხვავოთ ერთი სახეობის გენეტიკურად ახლო მდგომი შტამები. ეს მეთოდი დაფუძნებულია გენომში გარკვეული, ტანდემურად განმეორებადი ნუკლეოტიდური თანმიმდევრობების (VNTR), ლოკუსების, ალელების რაოდენობის დადგენაზე.



ტანდემურად განმეორებადი ლოკუსების ანუ მარკერების იდენტიფიკაცია შესაძლებელია გენომური თანმიმდევრობის ანალიზით. ამასთან, აღსანიშნავია, რომ ზოგიერთი ტანდემური განმეორება არ არის პოლიმორფული და ეპიდემიოლოგიურად საინტერესო, ზოგიერთი კი, ცვალებადობის წყალობით ეპიდემიოლოგიურად მნიშვნელოვანია. დამოუკიდებლად აღებული მარკერები არ არის საკმარისად ინფორმატიული, ისინი ან ძალზე ვარიაბელურია ან აჩვენებს მაღალ ჰომოპლაზიას და შესაბამისად არასაკმარისია კლასიფიკაციისათვის. ამიტომ, MLVA ტიპირებისას უნდა მოხდეს მრავალფეროვანი, ზომიერად მდგრადი მარკერების შერჩევა. კარგად შერჩეული ლოკუსების კომბინაცია შესაძლებელია აღმოჩნდეს მაღალი გარჩევადობის, რაც საშუალებას გვაძლევს თვალი გავადევნოთ იზოლატების წარმომავლობას, დავადგინოთ აფეთქების წყარო და ხელი შევუწყოთ ეპიდემიოლოგიურ კვლევას.

ტიპირების ასეთ მეთოდს ბრუცელას შტამებისათვის განეკუთვნება 15-16 ლოკუსის ტანდემურად განმეორებადი თანმიმდევრობების ცვლადი რაოდენობის ანალიზი (MLVA-16 და MLVA 15) (Le Fleche et al., 2006; Tiller et al., 2009; De Santis et al., 2009; Huynh et al., 2008; Ferreira et al., 2012; Kattar et al., 2008; Maquart et al., 2009; Kilic et al., 2011; Al Dahouk et al., 2012; Jiang et al., 2013; Scholz et al., 2013). ეს მეთოდი შტამებს შორის ყველაზე მაღალი გარჩევადობის უნარით ხასიათდება, გვიჩვენებს ბრუცელას სახეობების და ბიოვარების შიდა ფილოგენეტიკურ კავშირებს და კლასიფიკაციის საფუძველს.

ტანდემური განმეორებები არაერთხელ გამოიყენეს ისეთი ბაქტერიების საიდენტიფიკაციოდ, როგორცაა: *Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis* და *M. tuberculosis* (Frothingham, Meeker-O'Connell, 1998; Keim et al., 2000; Klevytska et al., 2001).

დღეისათვის MLVA ბრუცელას შტამებს შორის მრავალფეროვნების აღმოჩენის ერთ-ერთი საუკეთესო მეთოდია. იგი სხვა მეთოდებთან შედარებით ერთ-ერთი ყველაზე მაღალი გარჩევადობის უნარით გამოირჩევა და მაღალ-კონსერვატიული ბრუცელას სახეობების ქვეჯგუფების კლასიფიკაციის, პოპულაციის სტრუქტურისა და ნაწილობრივ ფილოგენეტიკური კავშირების სურათის დადგენის ერთ-ერთი საუკეთესო საშუალებაა. თუმცა, მისი კომპლექსურობისა და ვარიაბელურობის გამო შესაძლებელია, რომ ფილოგენეტიკურად ახლოს მდგომ შტამებს საკმაოდ განსხვავებული MLVA პროფილები ჰქონდეთ და პირიქით, ერთმანეთისაგან ფრიად

დაშორებული და ამავედროულად მსგავსი ევოლუციური წარსულის მქონე შტამები მხოლოდ MLVA ტიპირებაზე დაყრდნობით, ერთ ან ახლო მდგომ ჯგუფებში მოხვდნენ, რაც ჰომოპლაზიის სახელწოდებითაა ცნობილი (Scholz et al., 2013; Le Fleche et al., 2006; Huynh et al., 2008).

2009-2011 წლებში, დაავადებათა კონტროლის ეროვნულ ცენტრში აშშ-ს თავდაცვის საფრთხის შემცირების სააგენტოს (DTRA) ერთობლივი ბიოლოგიური კვლევის GG-17 პროექტის ფარგლებში დაინერგა მულტიპლექსური MLVA-8 სისტემა, რომლის სამიზნედ 8 მინისატელიტური, ნაკლებად ვარიაბელური მარკერი შეირჩა (Huynh et al., 2008).

#### **2.4 საქართველოში ბრუცელოზის გავრცელების დინამიკა შინაურ პირუტყვში 2007-2012 წწ.**

ჯანმრთელობის მსოფლიო ორგანიზაციისა და საერთაშორისო ეპიზოოტიური ბიუროს მონაცემებით, ცხოველთა ბრუცელოზი გვხვდება მთელს მსოფლიოში. ის უფრო მეტად გვხვდება მსხვილფეხა პირუტყვში, მეორე პოზიციაზეა ცხვრისა და თხის ბრუცელოზი, ღორებში ინფექცია შეზღუდულად ვრცელდება (ლომინეიშვილი, გავაშელი, 2002).

საქართველო ერთ-ერთი ენდემური კერაა ბრუცელოზისთვის. საქართველოში ძირითადად გავრცელებულია წვრილი გლეხური მეურნეობები (ცხოველთა საშუალო რაოდენობა სადგომში მ.პ. 5-10 სული, ცხვარი 100-300 და თხა 5-10). მსხვილ ფერმებში ძირითადად ცხოველების შენახვის ბაგური ტიპია, მათ უმეტესად გააჩნიათ შემოსაზღვრული საკუთარი საძოვრები და არ ხდება კონტაქტი წვრილი გლეხური მეურნეობების ცხოველებთან. რაც შეეხება წვრილ გლეხურ ფერმებს, ცხოველთა შენახვა ძირითადად ხდება სანახირე ან/და მომთაბარე სისტემით, რა დროსაც ცხოველებს უხდებათ კონტაქტი (ხშირად რამდენიმე სოფლის ნახირის/ფარის) საერთო, შემოუღობავ საძოვარზე და, ამასთან, ცხოველებისთვის საერთოა დარწყულების ადგილიც. მომთაბარეობის შემთხვევაშიც ცხოველების გადარეკვა ხდება შორ მანძილზე სეზონურ საძოვრებზე, რაც დაკავშირებულია სხვა რეგიონის ცხოველების საძოვრების გამოყენებასთან. ამიტომ არ არის გამორიცხული ადგილობრივ ცხოველებთან კონტაქტი. ზამთრის და ზაფხულის პერიოდში,

შესაძლებელია წვრილი გლეხური ფერმების რამდენიმე მეპატრონის მიერ ცხოველების ერთად, ერთ სადგომში შენახვა. ყოველივე აღნიშნულის გათვალისწინებით, საკმაოდ მაღალია ინფექციური დაავადებების გავრცელების რისკი (ბრუცელოზის კვლევის პირველი ფაზა 2011, სურსათის ეროვნული სააგენტო).

2007-2012 წლების სოფლის მეურნეობის სამინისტროს ლაბორატორიული კვლევის მონაცემებზე დაყრდნობით, დადგენილია წვრილფეხა პირუტყვში დაავადების გამოვლინების შემთხვევები: ქვემო ქართლში, სამცხე-ჯავახეთში, თბილისის მუნიციპალიტეტში შემავალ სოფლებში (აგარაკი, სოფ. დილომი, ვაშლიჯვარი, ვეძისი, ლისი, დიდგორი, თხინვალა, თელოვანი, შინდისი, წავკისი, ტაბახმელა, ოქროყანა, დაბა კოჯორი, დაბა კიკეთი, ზემო ფონიჭალა, ქვემო ფონიჭალა, წყნეთი, ბეთანია, ახალდაბა, გლდანი, მუხიანის აგარაკები, ავჭალა, თბილისის ზღვის დასახლება, ლოტკინი, ზაჰესი, გიორგიწმინდა, დიდი ლილო, ნასაგური, წინუბანი, ორხევი, „აფრიკა“, სადგური ველი, პატარა ლილო, ვარკეთილის მეურნეობა, დამპალოს დასახლება, აეროპორტი, 31-ე ქარხნის მიმდებარე ტერიტორია, ლილოს დასახლება, ლითონკონსტრუქციების ქარხნის დასახლება (ზმკ), ალექსეევკა), კახეთში, მცხეთა-მთიანეთში, ერთეული შემთხვევები შიდა ქართლსა და იმერეთში. 2008-2013 წლებში წვრილფეხა პირუტყვის გამოკვლევა ხორციელდებოდა არაგემიურად, ცხოველის მეპატრონის სურვილის შემთხვევაში ან იძულებითი ღონისძიების ფარგლებში.

2007 – 2012 წწ. წვრილფეხა პირუტყვის ბრუცელოზით დაავადების დინამიკა შემდეგი მაჩვენებლებითაა წარმოდგენილი: 2007 წელს დაავადებული წვრილფეხა პირუტყვი შეადგენს გამოკვლეულთა 14%-ს (21/148), 2008 წელს – 1.5%-ს (3/216), 2009 წელს – 0.5%-ს (142/28755), 2010 წელს – 0.3%-ს (438/124234) და 2012 წელს – 0.05%-ს (1/2031). 2011 წლის მონაცემები არ გვაქვს.

სურსათის ეროვნული სააგენტოს მიერ 2011 წ. დაიგეგმა და ჩატარდა კვლევა, რომელიც განხორციელდა მსოფლიო ბანკის კონსულტანტის, ვალერიე რაგანის რეპორტის – „ბრუცელოზის კონტროლის სტრატეგიის განვითარება საქართველოში“ მიხედვით, რომლის საფუძველზეც, ცხოველთა ჯანმრთელობის ეროვნული პროგრამის სამეთვალყურეო ჯგუფის მიერ, შემუშავდა 10 პუნქტიანი სამოქმედო გეგმა. პროექტის დაფინანსების წყაროები გახლდათ: სსიპ სურსათის ეროვნული

სააგენტო (NFA), თავდაცვის საფრთხის შემცირების სააგენტო (DTRA), ამერიკის შეერთებული შტატების სოფლის მეურნეობის სამინისტრო (USDA).

მიმდინარე პროგრამის პირველ ფაზაში შეისწავლეს დაავადების გავრცელების დონე წვრილფეხა და მსხვილფეხა პირუტყვში, რაც განაპირობა აღნიშნული ცხოველების მაღალმა ამთვისებლობამ დაავადების მიმართ, მათგან მიღებული ცხოველური პროდუქტების ფართოდ გამოყენებამ და ცხვარზე საექსპორტო მოთხოვნების გაზრდამ.

კვლევის პირობების მიხედვით, სოფელი ითვლება ბრუცელოზზე „არაკეთილ-საიმედოდ“, მასში თუნდაც ერთი დადებითად მორეაგირე ცხოველის აღმოჩენის შემთხვევაში.

ბრუცელოზზე ცხოველთა სეროლოგიური გამოკვლევა განხორციელდა საქართველოს მთელ ტერიტორიაზე (დროებით ოკუპირებულის გარდა). გამოსაკვლევი სოფლებისა და ცხოველების რაოდენობის დასადგენად უცხოელი ექსპერტების მიერ რეკომენდებული იქნა ეპიდემიოლოგიური მეთოდი (“presence or absence“ calculator from Cannon, 2001), რომელიც უზრუნველყოფს შერჩეული სოფლებისა და ცხოველების წარმომადგენლობითობას. სოფლის მეურნეობის სამინისტროს ლაბორატორიაში როზ-ბენგალის ტესტით სულ 17327 გამოკვლეული სინჯიდან 227 სინჯი აღმოჩნდა დადებითი, რომლებიც შემდგომში გადამოწმდა ფლუორესცენტული პოლარიზაციის ტესტით (FPA), რის შედეგადაც 197 სინჯი დადასტურდა – როგორც დადებითი, 12 – როგორც უარყოფითი და 18 – საექვო/განუსაზღვრელი. წვრილფეხა პირუტყვისთვის ბრუცელოზით დაინფიცირებული სოფლები აღმოჩნდა საქართველოს 6 რეგიონში. არსებული მონაცემებიდან გამომდინარე, საქართველოში წვრილფეხა პირუტყვის ბრუცელოზით ინფიცირებული სოფლების რაოდენობა შეადგენს 8.1% (სარწმუნოობის დონე – (სდ) 95% 16.1; 0.1). დაინფიცირებული სოფლები 20%-ზე მეტია ქვემო ქართლში, თბილისის მუნიციპალიტეტსა და აჭარის ა/რესპუბლიკაში, 16,67% – მცხეთა-მთიანეთში, 6.67% – კახეთში და 3.3% – სამცხე-ჯავახეთში. დანარჩენ რეგიონებში დაფიქსირდა 0%, რაც პოტენციურად დაავადების პრევალენტობის 10%-ზე ნაკლებობაზე მიუთითებს. ბრუცელოზით წვრილფეხა პირუტყვის დაავადების შედარებით მაღალი დონეებია მომთაბარე შენახვის და ცხოველთა გადასარეკად გამოყენებული ტრასების მქონე რეგიონებში: ქვემო ქართლში, აჭარის ა/რ, მცხეთა-

მთიანეთის რეგიონებში, ხოლო მსხვილფეხა პირუტყვისთვის დაინფიცირებული სოფლები აღმოჩნდა 9 რეგიონში, რაც შეადგენს 16.3% (სდ 95% 28.4; 4.2). 30%-ზე მეტი „დაინფიცირებული“ სოფელი აღმოჩნდა კახეთში, მცხეთა-მთიანეთში და თბილისში. 19%-ზე მეტი – ქვემო ქართლსა და სამცხე-ჯავახეთში, ხოლო 7%-ზე ნაკლები – შიდა ქართლში, იმერეთში, სამეგრელო-ზემო სვანეთში და აჭარის ა/რ-ში. დაინფიცირებული სოფლების 0% იქნა მიღებული რაჭა-ლეჩხუმსა და გურიის რეგიონებში, რაც ასევე პოტენციურად დაავადების პრევალენტობის 10%-ზე ნაკლებობის არსებობაზე მიუთითებს (ბრუცელოზის კვლევის პირველი ფაზა 2011, სურსათის ეროვნული სააგენტო).

ჩატარებული კვლევის მონაცემები მიუთითებს, რომ მეცხოველეობის მომთაბარე სისტემა და განსხვავებული მოვლა-შენახვის კულტურა, დაავადების უსიმპტომო მიმდინარეობა, მეპატრონეთა მხრიდან ცხოველების არასისტემატური გამოკვლევა და დაავადების შესახებ მოსახლეობის ცოდნის დაბალი დონე, მნიშვნელოვანწილად განაპირობებს დაავადების გავრცელების ტენდენციას, მითუმეტეს, ქვეყანაში არსებობს ბრუცელოზის ისტორიულად არაკეთილსაიმედო ზონები. ცხოველთა მფლობელების მიერ შეუმოწმებელი პირუტყვის ფარულად გაყიდვის ფაქტები, ერთი სოფლიდან მეორე სოფელში და სხვა რეგიონში, პირადი მოხმარებისათვის ვეტერინარული ზედამხედველობის გარეშე ცხოველთა ეზოებში დაკვლა, აბორტირებულ, ინფიცირებულ პირუტყვთან ერთად, სადგომში სხვა ცხოველების შენახვა და სხვა ფაქტორები, ერთობლივად განაპირობებს დაავადების გავრცელებას.

ყოველივე აღნიშნული მიუთითებს, რომ ქვეყანაში ბრუცელოზის ინციდენტობის შემცირება საკმაოდ დიდ სირთულეებს უკავშირდება. საჭიროა აქტიური ზედამხედველობის სისტემის გაძლიერება და ჯანდაცვის და ვეტერინარული სამსახურების მჭიდრო თანამშრომლობა.

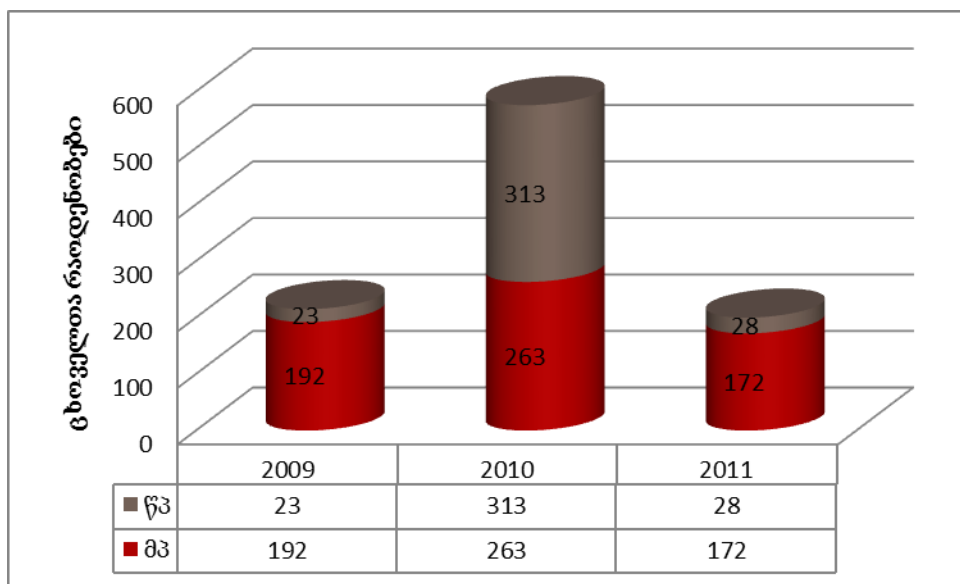
### 3. მასალა და მეთოდები

#### 3.1 გამოკვლევითი მასალა

თემით გათვალისწინებული კვლევითი სამუშაოები ჩატარდა საქართველოს დაავადებათა კონტროლისა და საზოგადოებრივი ჯანმრთელობის ეროვნულ ცენტრში, შეზღუდული პასუხისმგებლობის საზოგადოება „იმუნოგენ“-ში და სოფლის მეურნეობის სამინისტროს ლაბორატორიაში.

კვლევის ყველა ეტაპი ტარდებოდა თანამედროვე მეთოდების გამოყენებით და ბიუსაფრთხოების სტანდარტების დაცვით. *Brucella*-ს გვარის წარმომადგენლები განსაკუთრებით საშიში პათოგენების ჯგუფშია გაერთიანებული და ამის გამო, პროცედურები ინფექციურ მასალასთან მიმდინარეობდა ბიუსაფრთხოების მეორე დონის (BSL-2+) კაბინეტში პირადი დაცვის აღჭურვილობის (PPE) თანხლებით. სამუშაოები ტარდებოდა ჯანმრთელობის მსოფლიო ორგანიზაციის (WHO), ცხოველთა ჯანმრთელობის მსოფლიო ორგანიზაციის (OIE) და აშშ თავდაცვის საფრთხის შემცირების სააგენტოს (DTRA) რეკომენდაციების საფუძველზე შემუშავებული ალგორითმის მიხედვით.

**საკვლევი მასალა:** კვლევის ფარგლებში, სამი წლის განმავლობაში (2009-2011 წწ.) სულ შევაგროვეთ და გამოვიკვლიეთ 991 (627 მსხვილფეხა და 364 წვრილფეხა რქოსანი) პირუტყვის 1656 ნიმუში (სურათი 1). ნიმუშები შევაგროვეთ ძირითადად აღმოსავლეთ საქართველოს რეგიონების სხვადასხვა რაიონების (მარნეული, გარდაბანი, ასპინძა, დმანისი, დუშეთი, მესტია, მცხეთა, საგარეჯო, შუახევი, თბილისი, თეთრიწყარო, წალკა, ნინოწმინდა, დედოფლისწყარო, ბოლნისი, გურჯაანი, კასპი) მოსახლეობის კერძო საკუთრებაში მყოფი საქონლიდან და კერძო ფერმებიდან. ჯამში შეგროვდა მსხვილი რქოსანი პირუტყვის 336 სისხლი, 627 სისხლის შრავი, 75 რძე, 25 ვაგინალური ნაცხი და 25 ყბისქვეშა ლიმფური ჯირკვალი; ცხვრის 127 სისხლი, 333 სისხლის შრავი, 74 რძე, თხის 3 სისხლი და 31 სისხლის შრავი (ცხრილი 4).



სურათი 1. მსხვილფეხა და წვრილფეხა პირუტყვის განაწილება წლების მიხედვით

ცხრილი 4. შეგროვებული ნიმუშები, ნიმუშის ტიპის, რეგიონისა და წლების მიხედვით

წელი	რეგიონი	მთლიანი სისხლი (მრპ/წრპ)	შრატის (მრპ/წრპ)	რძე (მრპ/წრპ)	ყბისქვეშა ლიმფური ჯირკვალის (მრპ/წრპ)	ვაგინალური ნაცხის (მრპ/წრპ)	სულ
2009	ქვემო ქართლი	214 (192/22)	215 (192/23)				429
2010	ქვემო ქართლი	104 (20/84)	270 (120/150)	55 (16/39)			429
	მცხეთა-მთიანეთი	101 (101/0)	126 (101/25)	25 (25/0)	25 (25/0)	25 (25/0)	302
	სამცხე-ჯავახეთი	4 (4/0)	61 (0/61)	1 (0/1)			66
	შიდა ქართლი		33 (0/33)				33
	კახეთი		44 (0/44)	1 (0/1)			45
	აჭარა	3 (3/0)	3 (3/0)				6
	სამეგრელო ზემო-სვანეთი		39 (39/0)				39
	თბილისი	1 (1/0)		5 (5/0)			6
2011	თბილისი	33 (9/24)	32 (9/23)	31 (9/22)			96
	ქვემო ქართლი	6 (6/0)	112 (112/0)	17 (6/11)			135
	კახეთი		49 (44/5)	14 (14/0)			63
	სამცხე-ჯავახეთი		7 (7/0)				7
სულ		466	991	149	25	25	1656

**მასალის აღება:** ნიმუშების შეგროვება მიმდინარეობდა სეზონურად, გაზაფხულსა და შემოდგომაზე დაავადებათა კონტროლის ეროვნული ცენტრის და აშშ თავდაცვის საფრთხის შემცირების სააგენტოს (NCDC/DTRA) ერთობლივად შემუშავებული და დამტკიცებული სტანდარტული სამოქმედო პროცედურების გათვალისწინებით (SOP). ბაქტერიოლოგიური კვლევისათვის, ასეპტიკის წესების დაცვით ცხოველის (ძროხა, ცხვარი, თხა) საუღლე ვენიდან 5–10 ml სისხლს ვაგროვებდით ანტიკოაგულანტიან სინჯარაში, ხოლო სეროლოგიური კვლევისთვის 3–5 ml სისხლს – შრატის გამომყოფ სინჯარაში. მ.რ.პ-ის ლიმფურ ჯირკვლებს ვათავსებდით მშრალ სტერილურ მინის ჭურჭელში. მ.რ.პ-ის საშოდან სტერილური ტამპონით აღებულ ნაცხს ვათავსებდით სატრანსპორტო ნიადაგში (სოიოს ბულიონი). რძის ნიმუშებს ვაგროვებდით ცენტრიფუგის პოლიპროპილენის სტერილურ სინჯარებში. თითოეულ სინჯს ვნომრავდით, ვალაგებდით სითხეგაუმტარ ჭურჭელში და აღნიშნულ ნიმუშებს ცივი ყუთით ლაბორატორიაში ვაგზავნიდით.

**საკვები ნიადაგების მომზადება:** ბრუცელას სელექტიური ნიადაგი: საკვებ ნიადაგს ვამზადებდით ბრუცელა აგარის (Brucella agar – BD Becton Dickinson and Company, Sparks, Maryland, USA) და ბრუცელას სელექტიური დანამატის (Brucella Selective Supplement, Oxoid Inc.) გამოყენებით, მწარმოებლის მიერ მოწოდებული ინსტრუქციის მიხედვით. 50°C-მდე გაგრილებულ ავტოკლავირებულ ბრუცელას აგარს ვამატებდით წინასწარ მომზადებული ბრუცელას სელექტიური დანამატის ხსნარს და ცხენის 5-10% ინაქტივირებულ სტერილურ შრატს. მომზადებულ ნიადაგს ვანაწილებდით პეტრის სტერილურ ფინჯნებზე 20-25 ml-ის ოდენობით თითო ფინჯანზე, რომლებსაც სტერილობაზე შესამოწმებლად ვათავსებდით თერმოსტატში 37°C 24 სთ-ით. მომზადებულ სტერილურ ფინჯნებს ვინახავდით 4°C-ზე მაცივარში და ვიყენებდით 1 თვის განმავლობაში.

ასევე ვამზადებდით ფუძე ფუქსინისა და თიონინის სამი განზავების (1:25 000; 1:50 000; 1:100 000) საღებავიან ნიადაგებს 50°C-მდე გაგრილებულ ავტოკლავირებულ სოიოს აგარზე (Tryptic Soy agar – BD Becton Dickinson and Company, Sparks, Maryland, USA) წინასწარ მომზადებული თიონინის და ფუძე ფუქსინის (Fuchsin, Fluka, Sigma-Aldrich; Thionin acetate salt, Standard Fluka, Sigma-Aldrich) საღებავების 0.1%-იანი ხსნარების დამატებით. მომზადებულ ნიადაგს ანალოგიურად ვანაწილებდით პეტრის სტერილურ ფინჯნებზე 20-25 ml-ის ოდენობით თითო ფინჯანზე, რომლებსაც



სტერილობაზე შესამოწმებლად ვათავსებდით თერმოსტატში 37°C 24 სთ-ით. მომზადებულ სტერილურ ფინჯნებს ვინახავდით 4°C-ზე მაცივარში და ვიყენებდით 1 თვის განმავლობაში.

### 3.2 ბაქტერიოლოგიური გამოკვლევა

ლაბორატორიაში შემოსულ პათოლოგიურ მასალას (სისხლი, რძე, ლიმფური ჯირკვლები, ვაგინალური ნაცხები) ვათავსებდით -20°C-ზე, რაც ხელს უწყობს სისხლის ფორმიანი ელემენტებიდან ბაქტერიული უჯრედების გამოთავისუფლებას. 24-48 სთ-იანი ინკუბაციის შემდეგ ვაღობდით და ვამზადებდით ნიადაგზე დასათესად: ვავორტექსებდით და ვთესავდით, როგორც სელექტიურ (ბრუცელას სელექტიური ფარელის აგარი (Farrell's medium – Eliava media production) და მოდიფიცირებული თაიერ-მარტინის აგარზე (Thyer-martin agar), ისე არასელექტიურ (შოკოლადისებური აგარი (Chocolate agar – Eliava media production); 5% ცხვრის სისხლიან აგარზე (5% Sheep Blood Agar - Eliava media production).

**სისხლის და რძის ნიმუშების გამოკვლევა:** *B. melitensis* იზოლატების გამოსაყოფად დადებითი და უარყოფითი შრატების სისხლის ნიმუშებს 100-100 µl-ის მოცულობით, ხოლო რძის ნიმუშებს – 200-250 µl-ის რაოდენობით ვთესავდით არასელექტიურ (შოკოლადისებურ (Chocolate agar), 5%-იან ცხვრის სისხლიან (SBA)) და სელექტიურ ნიადაგებზე (ფარელის (Farrell's medium) და თაიერ-მარტინი (Thyer-martin)), რისთვისაც, რძის ნიმუშებს ვაცენტრიფუგირებდით 7000x გ-ზე 15 წთ და შემდეგ ვთესავდით, როგორც ნაღებს, ისე ნალექს (თითოს ორ ფინჯანზე) ბრუცელას სელექტიურ და არასელექტიურ ნიადაგზე სტერილური შპადელით ან მარყუქით მთელ ზედაპირზე განაწილებით. ნათესების ინკუბაციას ვახდენდით თერმოსტატში 37°C-ზე, 5-10%-იან CO<sub>2</sub> გარემოში (5-10% CO<sub>2</sub> წარმოქმნისთვის ვიყენებდით პაკეტებს GENbox, bioMerieux). შედეგებს აღვრიცხავდით 28-დღიანი ინკუბაციის განმავლობაში. თავდაპირველად ინკუბაციიდან მე-4-5 დღეს და შემდეგ ყოველ 3 დღეში ერთხელ. იზოლატების იდენტიფიკაციის სარწმუნოობას ვადგენდით კულტურალური, მორფოლოგიური, ბიოქიმიური და სეროლოგიური ტესტებით (Alton et al., 1988). ასევე, სეროლოგიურად დადებითი სისხლის ნიმუშებს ვთესავდით თხევად საკვებ ნიადაგში (BD Bactec Blood Culture Systems, Sparks, MD, USA) და ყოველ

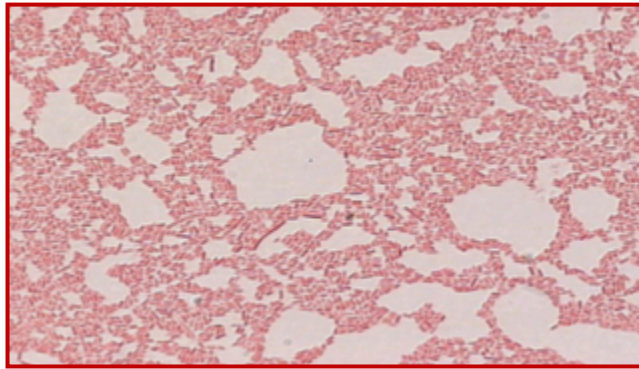
მე-10 დღეს, ამოვთესავდით ზემოთ აღნიშნულ მყარ საკვებ ნიადაგებზე ერთი თვის განმავლობაში. ნათესებს ვაინკუბირებდით 37°C-ზე, 5-10%-იან CO<sub>2</sub> გარემოში. ყოველი ამოთესვის შედეგებს აღვრიცხავდით 5-10 დღის განმავლობაში.

**ლიმფური ჯირკვლების გამოკვლევა:** ლაბორატორიული გამოკვლევისათვის, საკვლევ მასალას სტერილური მაკრატილით ვაქუცმაცებდით და ნიმუშის 1 გ-ს ვამატებდით 10 ml სტერილურ დისტილირებულ წყალს ან 0.85%-იან ფიზიოლოგიურ ხსნარს. როდინის გამოყენებით ვახდენდით მასალის ემულგირებას. ვაყოვნებდით 15-20 წუთის განმავლობაში და შემდეგ პიპეტის საშუალებით ვიღებდით სითხის 100-150 µl-ს და ვთესავდით შესაბამის საკვებ არეებზე. ნათესებს ვათავსებდით 37°C-ზე, 5-10%-იან CO<sub>2</sub> გარემოში და შედეგებს აღვრიცხავდით 28-დღიანი ინკუბაციის განმავლობაში სისხლის და რძის ნიმუშების ანალოგიურად.

**ვაგინალური ნაცხების გამოკვლევა:** ლაბორატორიაში შემოსულ ვაგინალურ ნაცხებს 24 საათით ვათავსებდით მაცივარში 4°C-ზე და შემდეგ ვთესავდით ტამპონით სელექტიური და არასელექტიური საკვები ნიადაგების მთელ ზედაპირზე დაშტრიხვის მეთოდით. ნათესებს ვათავსებდით და შედეგებს აღვრიცხავდით ზემოთ აღწერილი წესით 28 დღის განმავლობაში.

### **3.2.1 მორფოლოგიური თვისებების შესწავლა**

**მორფოლოგიური თვისებების შესწავლა:** გამოყოფილი შტამების მორფოლოგიის დასადგენად ვიყენებდით მიკროსკოპის მეთოდს. მეთანოლში ფიქსირებულ ნაცხებს ვღებავდით გრამის წესით (BD Becton Dickinson and Company, Sparks, Maryland, USA) მწარმოებლის მითითების მიხედვით. ფიქსირებულ ნაცხებს ვღებავდით გენციან-ვიოლეტით 1-2 წთ-ის განმავლობაში და ვრეცხავდით სტერილური წყლით. ვამატებდით ლუგოლის ხსნარს 1-2 წთ-ით და კვლავ ვრეცხავდით წყლით. შემდეგ, 20 წმ-ით ვამატებდით 96<sup>0</sup>-იან სპირტს, ვრეცხავდით წყლით და ვღებავდით საფრანინით 1-2 წთ. ბოლოს, კვლავ ვრეცხავდით და შეღებილ ნაცხებს ვიკვლევდით მიკროსკოპში (Westover scientific, biological microscope) იმერსიული სისტემით 100X გადიდების ობიექტივით. პრეპარატში აღინიშნებოდა ბრუცელასთვის დამახასიათებელი ტიპური, გრამ-უარყოფითი, წითელ ფერში შეღებილი, წვრილი, მრგვალი კოკობაცილები (სურ. 2).



სურათი 2. გრამ-უარყოფითი ბრუცელები

**აგლუტინაცია ბრუცელას პოლიკლონურ შრატთან და აკრიფლავინთან:**  
ბრუცელას გრამ-უარყოფითი ბაქტერია შეიცავს O – პოლისაქარიდის გვერდითი ჯაჭვის შემცველი ლიპოპოლისაქარიდის მოლეკულას (გლუვი) და ლიპოპოლისაქარიდის მოლეკულას, რომელიც არ შეიცავს O – პოლისაქარიდის გვერდით ჯაჭვს (ხორკლიანი). *B. melitensis*; *B. abortus*; *B. suis* და *B. neotomae* შეიცავენ O – პოლისაქარიდს, ხოლო *B. canis* და *B. ovis* ხორკლიანი კოლონიების წარმომქმნელი მიკროორგანიზმებია. O – პოლისაქარიდის გვერდითი ჯაჭვის არსებობის შემთხვევაში, ანტისხეულისა და ანტიგენის ურთიერთქმედება განაპირობებს აგლუტინაციას. გლუვი კოლონიების წარმომქმნელი მიკროორგანიზმები აგლუტინირდება O – პოლისაქარიდ სპეციფიკურ პოლიკლონურ შრატთან, მისგან განსხვავებით ხორკლიანი მიკროორგანიზმები რჩებიან სუსპენზირებულ მდგომარეობაში. *B. abortus*, *B. melitensis* *B. suis* და *B. neotomae* არიან გლუვი მიკროორგანიზმები, რომლებიც აგლუტინირდებიან შრატის არსებობისას, ხოლო *B. canis* და *B. ovis* რჩება სუსპენზიის სახით O – პოლისაქარიდ სპეციფიკური შრატის არსებობისას.

აკრიფლავინის ტესტი გამოიყენება გლუვი და ხორკლიანი კოლონიების წარმომქმნელი მიკროორგანიზმების დიფერენცირებისათვის. ხორკლიანი კოლონიების წარმომქმნელი მიკროორგანიზმები ნეიტრალური აკრიფლავინის არსებობისას განიცდიან აგლუტინაციას თავიანთი გარე მემბრანის ჯამური მუხტის გამო. *B. canis* და *B. ovis* ხორკლიანი კოლონიების წარმომქმნელი მიკროორგანიზმებია, რომლებიც განიცდის აგლუტინაციას აკრიფლავინის არსებობისას; ხოლო *B. abortus*, *B. melitensis* *B. suis* და *B. neotomae* არ განიცდიან აგლუტინაციას. აკრიფლავინის ტესტის ჩასატარებლად ვამზადებდით 1:1000–თან განზავებულ აკრიფლავინის ხსნარს (Acriflavine Sigma-Aldrich inc. USA).

### 3.2.2 ბიოქიმიური აქტივობის შესწავლა

გამოყოფილი კულტურები შევისწავლეთ შემდეგი ბიოქიმიური ტესტების საშუალებით: დექსტროზას, ლაქტოზას, საქაროზას მეტაბოლიზმი (TSI); გოგირდწყალბადის გამომუშავება (H<sub>2</sub>S); ოქსიდაზას ტესტი (oxidase); ურეაზას ტესტი (urease); კატალაზას ტესტი (catalase).

სახეობების ტიპირებისთვის ვიყენებდით ფუძე ფუქსინის და თიონინის საღებავიან ნიადაგებზე მგრძნობელობის განსაზღვრას და აგლუტინაციას ბრუცელას დადებით პოლიკლონურ შრატთან (Brucella Positive Control Antiserum (AMS), BD Becton, Dickinson and Company Sparks, Maryland 21152 USA) და აკრიფლავინთან (Acriflavine, Sigma-Aldrich inc. St. Louis, Mo USA).

**ოქსიდაზას ტესტი:** ოქსიდაზას ტესტის საშუალებით, ვახდენდით ფერმენტ ციტოქრომ ოქსიდაზას არსებობის აღმოჩენას. ტესტი ჩვეულებრივ გამოიყენება გრამ-უარყოფითი ბაქტერიების ბიოქიმიური თვისებების შესწავლისთვის. ციტოქრომ ოქსიდაზას არსებობის დროს, რეაქციის პროდუქტები ურთიერთქმედებენ ინდოფენოლის ლურჯთან. *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis* და *B. neotomae* არიან ოქსიდაზა დადებითი, ხოლო *B. canis* და *B. ovis* არიან ოქსიდაზა უარყოფითი მიკროორგანიზმები.

სტერილური ტამპონით ვიღებდით 2-3 იზოლირებულ კოლონიას და ვაწვეთებდით 2-3 წვეთ ოქსიდაზას რეაქტივს (Oxidase, Biomerieux) უშუალოდ ტამპონზე დატანილ ბაქტერიაზე. მიკროორგანიზმები, რომლებსაც გამოხატული აქვთ ოქსიდაზური აქტივობა, 30 წამის განმავლობაში იძლევიან მუქ-ლურჯ შეფერილობას. საკვლევი იზოლატების პარალელურად ტესტებს ვდგამდით ATCC (American Type Culture Collection) ეტალონურ შტამებთან (*E. coli* ATCC 25922 - უარყოფითი კონტროლი; *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 - დადებითი კონტროლი).

**კატალაზას ტესტი:** სტერილურ სასაგნე მინაზე ვაწვეთებდით 2-3 წვეთ 3%-იან წყალბადის ზეჟანგს (Catalase BD Beckton Dickinson and Company Sparks, Maryland, USA) რომელშიც სტერილური მარყუქით ან ჩხირით ვხსნიდით ბრუცელას 2-3 იზოლირებულ კოლონიას. მიკროორგანიზმები, რომლებსაც ახასიათებთ კატალაზური აქტივობა, კულტურის შეტანისთანავე წარმოქმნიან ბუშტუკებს. ბრუცელას

ყველა სახეობა კატალაზა დადებითი მიკროორგანიზმია. დადებით კონტროლად ვიყენებდით – *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; უარყოფით კონტროლად – *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615 შტამებს.

**ურეაზას ტესტი:** გამოიყენება მიკროორგანიზმის მიერ შარდოვანას ჰიდროლიზის უნარის დასადგენად. ქრისტენსენის შარდოვანა შეიცავს ინდიკატორს – ფენოლის წითელს, რომელიც მჟავე გარემოში ყვითელი შეფერილობისაა; ტუტე გარემოში ინდიკატორი იცვლის ფერს მოვარდისფრო-მოწითალოსაკენ. ქრისტენსენის ირიბ აგარიან სინჯარაში (Urease – Eliava media production, Tbilisi, Georgia) ვთესავდით ბრუცელას კულტურას და თავსახურს ვარგებდით ისე, რომ შესაძლებელი ყოფილიყო აერაცია. სინჯარებს ვათავსებდით თერმოსტატში 37°C-ზე და შედეგებს ვკითხულობდით 24-48 საათის შემდეგ. აღნიშნული ტესტის დროს დადებით და უარყოფით კონტროლებად ვიყენებდით: *E. coli* ATCC 25922 – უარყოფითი კონტროლი; *Yersinia pseudotuberculosis* ATCC 6902 – დადებითი კონტროლი.

*B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. neotomae* და *B. canis* ურეაზა დადებითებია. ბრუცელების სახეობაზე დამოკიდებულებით შეფერილობა იცვლება შემდეგი ინტენსივობით: *B. suis* და *B. canis* რეაგირებს დაუყოვნებლივ, *B. abortus*-ი ფერს იცვლის სუსტად, ხოლო *B. ovis*-ის ფერი არ იცვლება (ურეაზა უარყოფითია).

**გოგირდწყალბადის წარმოქმნა და შაქრების მეტაბოლიზმი:** ბრუცელას სახეობათა იდენტიფიკაციისთვის გამოიყენება გოგირდწყალბადის წარმოქმნისა და შაქრების მეტაბოლიზმის ტესტი. ბრუცელას სახეობების ნაწილი H<sub>2</sub>S დადებითია, ნაწილი – H<sub>2</sub>S უარყოფითი.

სამშაქრიანი რკინის აგარის (Triple Sugar Iron – TSI) მეშვეობით ხდება დექსტროზას, ლაქტოზას და საქაროზას ფერმენტაციის დეტექცია. აგარის ფერი განიცდის ცვლილებას – მჟავების პროდუცირებისას იფერება ყვითლად, ხოლო ტუტეს წარმოქმნისას ფერი რჩება უცვლელი – წითელი. ფერმენტაციის დროს შესაძლებელია აირების წარმოქმნა. ბრუცელას სახეობები TSI უარყოფითი მიკროორგანიზმებია. დადებით კონტროლად ვიყენებდით – *Salmonella typhimurium* ATCC 13311 შტამს.

ბაქტერიათა მიერ გოგირდწყალბადის წარმოქმნის აღმოსაჩენად გამოიყენება ტყვიის აცეტატის ტესტ-სტრიპები. გოგირდწყალბადი შეიძლება პროდუცირებულ

იქნას ზოგიერთი ბრუცელას მიერ გოგირდის შემცველი ამინომჟავებისაგან. ამ პროცესს ვახორციელებდით ბაქტერიათა კულტურების ჩათესვით კარბოჰიდრატთან საკვებ ნიადაგზე, მაგალითად, დექსტროზას, ლაქტოზას და საქაროზას შემცველ აგარზე (TSI). გოგირდწყალბადი შედის რა კონტაქტში ტყვიის აცეტატის სტრიპთან, წარმოქმნის შავ პრეციპიტატს, რაც სტრიპზე შავი ფერის წარმოქმნით გამოისახება. *B. abortus*, *B. suis* და *B. neotomae* გოგირდწყალბად დადებითებია, ხოლო *B. melitensis*, *B. canis* და *B. ovis* უარყოფითი მიკროორგანიზმები.

დექსტროზას, ლაქტოზას და საქაროზას შემცველ (TSI) ირიბ აგარიან სინჯარაში ვთესავდით ბრუცელას კულტურას. ტყვიის აცეტატთან სტრიპს ვათავსებდით სინჯარის თავსახურსა და შიდა ზედაპირს შორის და სინჯარას თავსახურს ვარგებდით ოდნავ მოშვებულ მდგომარეობაში აერაციისათვის. ირიბ აგარიან გათესილ სინჯარებს ვათავსებდით თერმოსტატში 37°C-ზე და შედეგებს ვკითხულობდით 24-48 საათიანი ინკუბაციის შემდეგ. დადებითი პასუხის შემთხვევაში ტყვიის აცეტატთან სტრიპები შეიფერება რუხ ან შავ ფერში, ხოლო უარყოფითის შემთხვევაში ფერის შეცვლა არ აღინიშნება. ATCC კონტროლებად ვიყენებდით: *E.coli* ATCC 25922 – უარყოფითი კონტროლი; *Salmonella typhimurium* ATCC 13311 – დადებითი კონტროლი.

### **3.2.3 მგრძობელობა საღებავების მიმართ**

ბრუცელას სახეობათა იდენტიფიკაციისათვის გამოიყენება თიონინისა და ფუძე ფუქსინის საღებავიანი ნიადაგები. როგორც ზემოთ აღვნიშნეთ, ვამზადებდით სამი განზავების (1 : 25 000; 1 : 50 000 და 1 : 100 000-იანი) ფუძე ფუქსინის და თიონინის ნიადაგებს, რომლებზეც ზრდის მიხედვით ვადგენდით ბრუცელას სახეობებს ბიოვარების დონეზე. საღებავის ოპტიმალურ განზავებად ითვლება 1 : 50 000. *B. melitensis*, *B. canis*, *B. suis* და *B. ovis* სახეობათა წარმომადგენლები იზრდებიან თიონინის შემცველ ნიადაგზე, მაშინ როდესაც *B. neotomae*-სა და *B. abortus*-ზე თიონინს მაინჰიბირებელი მოქმედება გააჩნია. ფუძე ფუქსინის შემცველ ნიადაგებზე ზრდა ახასიათებთ *B. melitensis* და *B. abortus*, ხოლო ბრუცელათა სხვა სახეობების ზრდა აღნიშნული საღებავის ზეგავლენით ითრგუნება.

### 3.2.4 ანტიბიოტიკომგრძობელობის შესწავლა

ანტიბიოტიკორეზისტენტობის პრობლემის აქტუალობიდან გამომდინარე, საკვლევ კულტურები შევისწავლეთ ანტიბიოტიკების მიმართ მგრძობელობაზე. გამოვიყენეთ ანტიბიოტიკების დისკები (BD BBL™ Sensi-Disc™ Antimicrobial Susceptibility Test Discs Becton, Dickinson and Company Sparks, Maryland 21152 USA) (ცხრილი 5). ძირითადად შეირჩა ის ანტიბიოტიკები, რომლებიც გამოიყენება ადამიანთა სამკურნალოდ, ჯანმრთელობის მსოფლიო ორგანიზაციის სახელმძღვანელოს მიხედვით (FAO/WHO, 1986; Corbel, 2006).

ფინჯანზე ნაზარდ 24-48 სთ-იან კულტურას ვასუსპენზირებდით 4-5 ml 0.85%-იან სტერილურ ფიზიოლოგიურ ხსნარში მაკფარლანდის სტანდარტის მიხედვით (Mcfarland 0.5, BioMerieux) და მიღებული სუსპენზიის 100 µl-ს სტერილური შპადელით ვანაწილებდით პეტრის ფინჯნებზე ჩამოსხმული შოკოლადისებური აგარის მთელ ზედაპირზე. ნათესებს ვაყოვნებდით გასაშრობად 5 წთ, რის შემდეგაც, აგარის ზედაპირზე ვათავსებდით ანტიბიოტიკების დისკოებს (ერთ ფინჯანზე არაუმეტეს 5 ანტიბიოტიკისა); შედეგებს აღვრიცხავდით 24 სთ-ის ინკუბაციის შემდეგ და ვსაზღვრავდით დისკოს ირგვლივ ინჰიბირების (ნაზარდის ზრდის შეფერხების) ზონას. შედეგებს ვაფასებდით CLSI/NCCLS (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2009) სტანდარტის მიხედვით (ცხრილი 5).

ცხრილი 5. ბრუცელოზის სამკურნალო ანტიბიოტიკების შეფასების ზონები

##	ანტიბიოტიკის დისკოები	რეზისტენტული (mm)	შუალედური ზღვარი (mm)	მგრძობიარე (mm)
1	პენიცილინი	<14	14-28	≥28
2	კანამიცინი	<13	14-17	≥18
3	რიფამპიცინი	<16	17-19	≥20
4	გენტამიცინი	<12	13-14	≥15
5	ციპროფლოქსაცინი	<15	16-20	≥21
6	სტრეპტომიცინი	<11	12-14	≥15

##	ანტიბიოტიკის დისკოები	რეზისტენტული (mm)	შუალედური ზღვარი (mm)	მგრძნობიარე (mm)
7	ტეტრაციკლინი	<14	15-18	≥19
8	ერითრომიცინი	<13	14-22	≥23
9	ტრიმეტროპრიმ სულფო	<10	11-15	≥16
10	ტობრამიცინი	<12	13-14	≥15
11	ქლორამფენიკოლი	<12	13-17	≥18
12	ოფლოქსაცინი	<16	16-21	≥22
13	დოქსიციკლინი	<12	13-15	≥16

### 3.3 სეროლოგიური გამოკვლევა

ცხოველების სიცოცხლეში, ბრუცელოზზე გამოსაკვლევად ვეტერინარიაში გამოიყენება შემდეგი იმუნოლოგიური ტესტები: როზ-ბენგალის ტესტი (რბტ); აგლუტინაციის (რაიტის) რეაქცია; რძის რგოლური რეაქცია; კომპლემენტის ფიქსაციის რეაქცია (კფრ); არაპირდაპირი და კონკურენტული იმუნოფერმენტული ანალიზი (ELISA); ფლუორესცენტული პოლარიზაციის რეაქცია (FPA) და სხვ.

დაავადებული ცხოველის ორგანიზმში ანტისხეულების გამომუშავება სხვადასხვა ინტენსივობით ხდება. ასე მაგალითად, ზოგიერთი ცხოველი დაინფიცირებიდან უკვე მეშვიდე დღეს იძლევა დადებით რეაქციას სეროლოგიური ტესტებით გამოკვლევისას. რიგ შემთხვევებში, ანტისხეულების დადგენა ზოგიერთი ცხოველის ორგანიზმში აღმკვრელის მოხვედრიდან, მხოლოდ რამდენიმე თვის შემდეგ ხდება შესაძლებელი.

#### 3.3.1 როზ-ბენგალის ტესტი (რბტ)

როზ-ბენგალის ტესტის დასადგმელად სასაგნე მინაზე ან არაადსორბირებადი მყარი ბარათის ცრემლის ფორმის მქონე ფოსოზე დაგვქონდა 30  $\mu$ l (0,03 ml) გამოსაკვლევ სისხლის შრატის და ამავე მოცულობის ვარდისფერი ანტიგენი (Brucellosis Card Test, BD, Becton Dickinson and Company, USA) მსხვილფეხა პირუტყვის შემთხვევაში, ხოლო წვრილფეხა პირუტყვის შემთხვევაში კი – 75  $\mu$ l (0,075



ml) საკვლევი შრატის და 25  $\mu$ l (0,025 ml) ანტიგენი. შრატს და ანტიგენს სტერილური ხის ჩხირით ერთმანეთში ვურევდით ერთგვაროვანი სითხის მიღებამდე და რეაქციის შედეგებს აღვრიცხავდით 4 წუთის განმავლობაში შეუიარაღებელი თვალით. პარალელურად, რეაქციის შედეგების სარწმუნოებისთვის, ანალოგიური პრინციპით ვდგამდით რეაქციას წინასწარ ცნობილ ბრუცელას დადებით და უარყოფით საკონტროლო შრატებთან. ნიმუშებს ვაფასებდით საკონტროლო შრატების შედეგებთან შედარებით.

დადებითი რეაქციის შემთხვევაში, ანტიგენ-ანტისხეულის ურთიერთქმედების შედეგად წარმოიქმნებოდა აგლუტინატი ვარდისფერი ფიფქების სახით. ხოლო უარყოფითი რეაქციის დროს წვეთი რჩებოდა ჰომოგენური.

### ***3.3.2 სინჯარული აგლუტინაცია (რაიტის რეაქცია)***

აგლუტინაციის (რაიტის) რეაქცია ბრუცელოზის საწინააღმდეგო ანტისხეულების სადიაგნოსტიკო ტიტრის დადგენის ერთ-ერთ ტესტს წარმოადგენს. რეაქცია იდგმება 1 ml-ის მოცულობით. საკვლევ შრატს ვანზავებდით 1:12,5 (ამ განზავებით გამოიყენება შემდეგი სახეობის ცხოველებში: ცხვარი, თხა, კამეჩი, ირემი, ძაღლი) 0.9%-იან ფიზიოლოგიურ ხსნარში და განზავებული 0.5 ml შეგვქონდა 1 და მე-2 სინჯარებში. მე-2, 3 და 4 სინჯარებში წინასწარ შეგვქონდა 0.5 ml ფიზიოლოგიური ხსნარი. შემდეგ, სერიული განზავების/გატიტრისთვის მეორე სინჯარიდან დაწყებული 0,5 ml სითხე გადაგვქონდა ყოველ მომდევნო სინჯარაში, ბოლო სინჯარიდან ვღვრიდით 0.5 ml. რის შემდეგაც ყველა სინჯარას ვამატებდით 0.5 ml წინასწარ 1:10-ზე განზავებულ ჰედლსონის ანტიგენს და ვღებულობდით შემდეგ განზავებებს: 1:25; 1:50; 1:100 და 1:200. პარალელურად ვდგამდით შრატის და დიაგნოსტიკუმის კონტროლებს, რისთვისაც სინჯარებში შეგვქონდა 0.5 ml ფიზიოლოგიური ხსნარი და ვამატებდით 0.5 ml განზავებულ შრატს და ანტიგენს შესაბამის სინჯარებში. სინჯარებს ვათავსებდით 37°C-ზე. რეაქციას ვკითხულობდით 24 სთ-ში.

მიღებულ შედეგებს ვაფასებდით შემდეგი კრიტერიუმებით:

4+ სითხის სრული გამჭვირვალობა, ანტიგენის მიკრობული სხეულები ქოლგის სახითაა სინჯარის ძირზე (100%-იანი აგლუტინაცია).

3+ სითხის არასრული გამჭვირვალობა და კარგად გამოხატული ქოლგა (75%-იანი აგლუტინაცია).

2+ სითხის გამჭვირვალობა. გამოხატულია ქოლგა (50%-იანი აგლუტინაცია).

1+ სითხის შესამჩნევი გამჭვირვალობა. ქოლგა სუსტადაა გამოხატული.

– გამჭვირვალობა და ქოლგა არ შეინიშნება. სინჯარის ძირზე შეინიშნება პატარა ნალექი.

შრატის კონტროლში ფიფქების, ერითროციტების და სხვა უცხო მინარევების არსებობის შემთხვევაში რეაქციას არ ვკითხულობდით. დადებით ტიტრად ითვლებოდა >1:25 (ნათიძე თანაავტ., 2011; 2014).

### **3.3.3 კონკურენტული (ენზიმ შეკავშირებული იმუნოსორბენტული) იმუნოფერმენტული ანალიზი (C-ELISA)**

კონკურენტული იმუნოფერმენტული ანალიზი ტარდებოდა (SVANOVIR® Brucella-Ab C-ELISA, Sweden) ნაკრების გამოყენებით, მწარმოებლის მიერ მოწოდებული ინსტრუქციის მიხედვით. 96 ფოსოიანი პლანშეტის თითოეულ ფოსოში, რომელიც ამოფენილი იყო *Brucella abortus*-ის ანტიგენით (გლუვი ლიპოპოლისაქარიდით S-LPS) შეგვქონდა 1:10-ზე განზავებული ნიმუშები (5 µl საკვლევი/საკონტროლო შრეტი + 45 µl ბუფერი) და კონტროლები შესაბამის ფოსოებში (დადებითი, სუსტად დადებითი და უარყოფითი კონტროლები). კონიუგატ-კონტროლის (Cc) ფოსოში შეგვქონდა 50 µl ნიმუშის განსაზავებელი ბუფერი. ამის შემდეგ საკონტროლო და ძირითად ფოსოში შეგვქონდა 50 µl თავის «Mab»-ხსნარი (მონოკლონური ანტისხეულები). პლანშეტს ვანჯღრევდით 5 წთ-ის განმავლობაში და ინკუბაციისთვის ვტოვებდით 30 წთ ოთახის ტემპერატურაზე. (კონტროლ/ნიმუშის და «Mab»-ხსნარის დამატებებს შორის დროის სხვაობა არ აღემატებოდა 10 წთ-ს). ინკუბაციის შემდეგ პლანშეტს ვრეცხავდით დაყოვნების გარეშე 4-ჯერ PBS-Tween (PBS/0.1% Tween-20) ბუფერით (250 µl-ის შეტანით თითოეულ ფოსოში), ვაშრობდით და თითოეულ ფოსოს ვამატებდით თხის, თავის საწინააღმდეგო IgG ანტისხეულების 100 µl კონიუგატის ხსნარს და ინკუბაციისათვის ვტოვებდით ოთახის ტემპერატურაზე 30 წთ. შემდეგ ეტაპზე განმეორებით ვრეცხავდით 4-ჯერ PBS-Tween-20 ბუფერით და თითოეულ ფოსოში კვლავ

ვამატებდით 100  $\mu$ l სუბსტრატის ხსნარს და ინკუბაციისათვის ვტოვებდით 10 წთ-ის განმავლობაში. შემდეგ, თითოეულ ფოსოს ვამატებდით 50  $\mu$ l შემაჩერებელ ხსნარს, ვურევდით და ვკითხულობდით რეაქციას 450 ნმ-ზე ELISA წამკითხავში. სამუშაო პლანშეტის საილუსტრაციოდ იხილეთ ცხრილი #6.

**ცხრილი 6. C-ELISA პლანშეტის საილუსტრაციო გეგმა**

ნიმუშები	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	C++	1	5	9	13	17	21	25	29	33	37	41
B	C++	1	5	9	13	17	21	25	29	33	37	41
C	C+	2	6	10	14	18	22	26	30	34	38	42
D	C+	2	6	10	14	18	22	2	30	34	38	42
E	C-	3	7	11	15	19	23	27	31	35	39	43
F	C-	3	7	11	15	19	23	27	31	35	39	43
G	Cc	4	8	12	16	20	24	28	32	36	40	44
H	Cc	4	8	12	16	20	24	28	32	36	40	44

**შენიშვნა:**

- C++ = დადებითი კონტროლი
- C+ = სუსტად დადებითი კონტროლი
- C- = უარყოფითი კონტროლი
- Cc = კონიუგატ კონტროლი

ცხრილში მოცემული ციფრები წარმოადგენენ დანომრილ ტესტის ნიმუშებს დუბლი-კატებში. კონიუგატ კონტროლის გარდა, ყველა ფოსოში შეგვექონდა 1:10-ზე განზავებული შრატები და კონტროლები.

ბრუცელოზით დაავადებული ცხოველის შრატის დამატებისას, მიმდინარეობს ანტისხეულების დაკავშირება ფოსოში წინასწარ ამოფენილ ანტიგენტთან. დაუკავშირებელ მასალას ვაცილებდით გარეცხვით სუბსტრატის ხსნარის დამატებამდე. ფერის წარმოქმნა (მომწვანო-მოლურჯო) ხდებოდა კონიუგატის მიერ სუბსტრატის კონვერსიის შედეგად. თავის მიმაგრებული «Mab»-ის აღმოჩენა ხდება პირშუშხას პეროქსიდაზასთან კონიუგირებული თხის, თავის საწინააღმდეგო IgG ანტისხეულების მეშვეობით. ანტისხეულები, რომელთა დაკავშირება არ განხორციელდა,

სუბსტრატის ხსნარის დამატებამდე რეცხვისას მოშორდება. სუბსტრატის/ქრომოგენის ინკუბაციის შემდეგ ვაკვირდებით ფერის წარმოქმნას.

კონკურენტული იმუნოფერმენტული ანალიზის შედეგების ინტერპრეტაციისთვის ვზომავდით თითოეული კონტროლისა და ნიმუშის ოპტიკურ სიმკვრივეებს (OD) და ვითვლიდით ინჰიბიციის პროცენტს (PI) KC4 პროგრამაში შემდეგი ფორმულით:

$$\text{ინჰიბიციის პროცენტი} = 100 - \frac{(\text{ნიმუშის/კონტროლის OD საშ. არითმეტიკ.}) \times 100}{(\text{კონიუგატ კონტრ. OD საშ. არითმეტიკ.})}$$

მიღებული შედეგების სანდოობის მიზნით პირველ რიგში ვახდენდით ჩატარებული ტესტის ვალიდაციას, რისთვისაც კონტროლების სიდიდეები უნდა ჩამჯდარიყო შემდეგ ფარგლებში:

OD Cc	0.75-2.0
PI დადებითი კონტროლი	85-110
PI სუსტად დადებითი კონტროლი	30-60
PI უარყოფითი კონტროლი	(-10)-15

წარუმატებელი ტესტის შემთხვევაში ტესტს ხელახლა ვიმეორებდით.

საკვლევი ნიმუშის სტატუსს შემდეგნაირად ვსაზღვრავდით:

PI სტატუსი

< 30% უარყოფითი

> 30% დადებითი

### **3.3.4 აგლუტინაციის დაჩქარებული რეაქცია**

ჩვენს მიერ შემუშავებულ აგლუტინაციის დაჩქარებულ რეაქციას ვდგამდით განზავების მეთოდით, რისთვისაც ვიყენებდით 96-ფოსოიან პლანშეტს.

ამ მიზნით საკვლევ შრატებს ვაზავებდით 1:12,5-ზე. პლანშეტის თითოეული რიგის მეორე, მესამე და მეოთხე ფოსოებში შეგვქონდა 100 µl ფენოლიზირებული (0,5%-იანი) NaCl-ის 0.9%-იანი ხსნარი. ძირითადი განზავებიდან ვიღებდით 200 µl-ს, საიდანაც 100 µl შეგვქონდა პირველ, ხოლო 100 µl მეორე ფოსოში. პირველ ფოსოში

შრატის განზავებაა 1:12,5-ზე, ხოლო მეორე ფოსოში – 1:25-ზე. აღნიშნული თანმიმდევრობის დაცვით 100  $\mu$ ლ გადაგვქონდა მესამე ფოსოში, მესამედან მეოთხეში, ხოლო მეოთხედან ზედმეტ 100  $\mu$ ლ-ს ვღვრიდით. შემდეგ თითოეულ ფოსოში ვამატებდით 100  $\mu$ ლ ანტიგენს (ყოველი 1 ml შეიცავს 500 მლნ მიკრობულ უჯრედს), რის შედეგადაც შრატის განზავება ფოსოებში ორმაგდება და შეადგენს 1:25-ზე; 1:50-ზე; 1:100-ზე და 1:200-ზე (სქემა 1, 2).

ძირითადი (გამოსაკვლევ შრატი) რეაქციის პარალელურად ვდგამდით კონტროლებს: ა) უარყოფით შრატთან იმავე განზავებაში; ბ) ბრუცელოზის დადებით შრატთან (ზავდება ზღვრულ ტიტრამდე); გ) 100  $\mu$ ლ NaCl-ის ხსნარი + 100  $\mu$ ლ დიაგნოსტიკუმი. საკონტროლო ფოსოებში: ა) რეაქცია უარყოფით შრატთან უარყოფითია; ბ) დადებით შრატთან დადებითი; გ) ანტიგენისა და NaCl-ის ხსნარის ნარევეთან უარყოფითი.

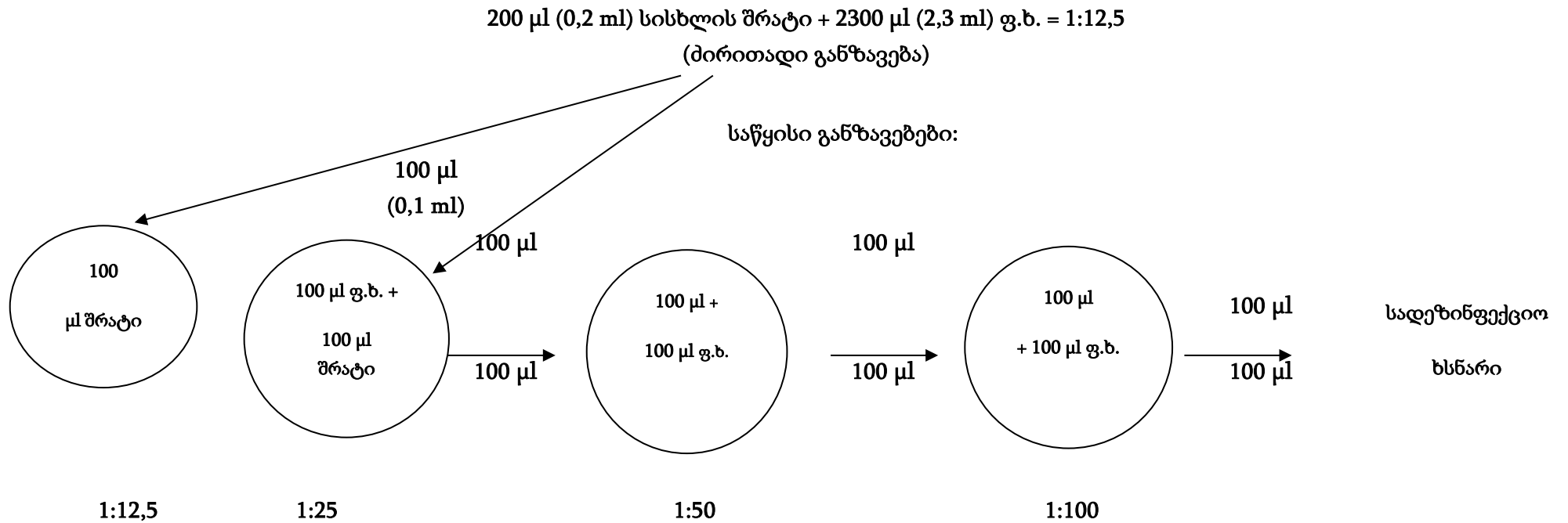
შედეგების შეფასება ხორციელდება 5-6 წუთში ვიზუალურად შეუიარაღებელი თვალით შემდეგი სქემით:

- 100%-იანი აგლუტინაცია (4 ჯვარი) – სითხე აბსოლუტურად გამჭვირვალეა, მარცვლები ან ფიფქები მსხვილი ან წვრილმარცვლოვანია – მკვეთრი დადებითი რეაქცია.
- 75%-იანი აგლუტინაცია (3 ჯვარი) – სითხე თითქმის სრულიად გამჭვირვალეა, კარგად გამოხატული მარცვლები ან ფიფქები – რეაქცია დადებითია.
- 50%-იანი აგლუტინაცია (2 ჯვარი) – სითხე უმნიშვნელოდ გამჭვირვალეა, მარცვლები ან ფიფქები შესამჩნევია – რეაქცია დადებითია.
- 25%-იანი აგლუტინაცია (1 ჯვარი) – სითხე გამჭვირვალეა, მარცვლები ან ფიფქები ოდნავ შესამჩნევია – რეაქცია საეჭვოა.
- 0 – სითხე თანაბრად შემღვრეულია და ჰომოგენურია – რეაქცია უარყოფითია.

ღორისთვის, ცხვრისთვის, თხისთვის, კამეჩისთვის, ირმისა და ძაღლისთვის სადიაგნოსტიკო ტიტრია 1:50-ზე /50 ს.ე./ და მეტი, საეჭვო 1:25-ზე /25 ს.ე./; მსხვილფეხა პირუტყვის, აქლემისა და ცხენისთვის სადიაგნოსტიკო ტიტრია 1:100 /100 ს.ე./ და უფრო მაღალი, საეჭვო 1:50-ზე /50 ს.ე./

რეაქციაში დიაგნოსტიკუმად გამოვიყენეთ ადგილობრივად დამზადებული ფერადი ანტიგენი.

სქემა 1. აგლუტინაციის დაჩქარებული რეაქცია (ა).



ფოსოებში დაემატოს 100  $\mu$ l (0,1 ml ანტიგენი) 500 მლნ მიკრობული უჯრედი (ml-ში)  
საბოლოო განზავებები



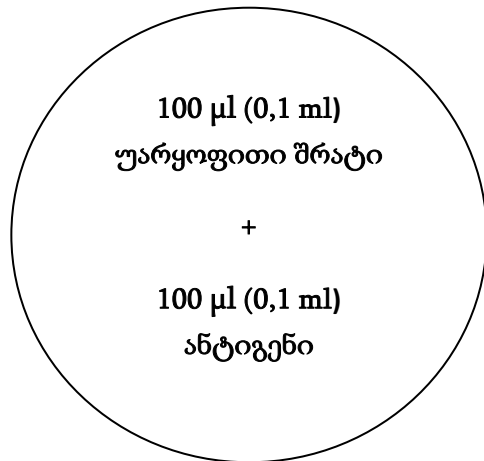
შედეგების აღრიცხვა ( $36 \pm 1^\circ\text{C}$ ). მაქსიმალური დრო 5-6 წუთი.

შენიშვნა: ფ.ბ. – ფიზიოლოგიური ხსნარი;  $\mu$ l – მიკროლიტრი; ml - მილილიტრი.

სქემა 2. აგლუტინაციის დაჩქარებული რეაქცია (ბ)

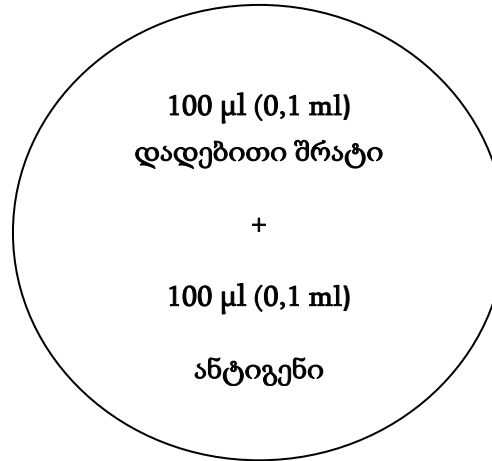
## კონტროლები

1



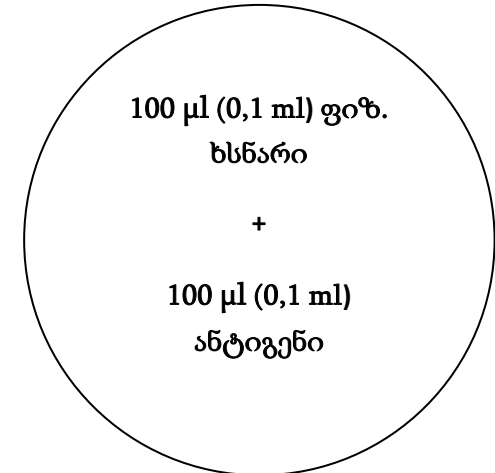
უარყოფითი რეაქცია

2



დადებითი რეაქცია

3



უარყოფითი რეაქცია

**3.3.5 ფლუორესცენტული პოლარიზაციის რეაქცია – FPA (Fluorescence polarization assay) (ერთი სინჯარის ტესტირების პროცედურა)**

აღნიშნული რეაქციის დადგმას ვახორციელებდით შემდეგი ეტაპების მიხედვით:

ერთჯერადი სინჯარის ინსტრუმენტში მოთავსების სწორი ორიენტაციისათვის აღვნიშნავდით მის ზედა ნაწილს. 10×75 mm ზომის ბოროსილიკატის შუშის სინჯარაში შეგვქონდა 1ml 1:25 განზავებული ბუფერი (25X Reaction buffer concentrate), ვამატებდით 10µl უარყოფით კონტროლს, ვავორტექსებდით, ვაინკუბირებდით ოთახის ტემპერატურაზე 5 წთ, შემდეგ სინჯარას ვათავსებდით FPA ინსტრუმენტში და ვკითხულობდით ბუფერის და ნიმუშის ფონურ მაჩვენებელს (Blank reading). საწყისი წაკითხვის შემდეგ სინჯარაში შეგვქონდა 10µl ფლუორესცენტული საღებავით მონიშნული კონიუგატი, ვავორტექსებდით, ვაინკუბირებდით სინჯარას ოთახის ტემპერატურაზე 5 წთ და განმეორებით ვკითხულობდით FPA ინსტრუმენტში. შედეგებს აღვნიშნავდით mP (mP – მილი პოლარიზაციის ერთეული) ერთეულში. აღწერილ ეტაპებს უარყოფითი კონტროლის შემთხვევაში ვიმეორებდით კიდევ 2-ჯერ და შემდეგ ვანგარიშობდით სამი უარყოფითი კონტროლის mP საშუალო არითმეტიკულს. დადებითი კონტროლის და საკვლევი ნიმუშების შემთხვევაში 10 µl-ის ოდენობით ყველა საფეხურის განმეორებით ვზომავდით mP მაჩვენებელს.

**შენიშვნა:** ყოველი 50 ნიმუშის ტესტირების ან/და ტესტირების დაწყებიდან ყოველი 1 სთ-ის გასვლის შემდეგ საჭიროა 10 µl სამი უარყოფითი კონტროლის გაშვება შემდგომი ნიმუშების სტატუსის შესაფასებლად.

მიღებული შედეგების ინტერპრეტირებისთვის პირველ რიგში ვახდენდით ტესტის ვალიდაციას.

**ტესტის ვალიდაცია**

1. დადებითი კონტროლის მაჩვენებლის დასაშვები ზღვარი 120-250 mP.
2. უარყოფითი კონტროლის საშუალო არითმეტიკული 70-95 mP.
3. დადებითი და უარყოფითი კონტროლის მაჩვენებლების დასაშვები ზღვარის გადაცილების შემთხვევაში ვახდენდით ინსტრუმენტის კალიბრაციას.



მოცემული ტესტის შედეგების ინტერპრეტაციას ვახდენდით შემდეგი ცხრილის მიხედვით (ცხრილი 7):

**ცხრილი 7. ფლუორესცენტული პოლარიზაციის რეაქციის შედეგების ინტერპრეტაცია**

უარყოფითი	საექვო	დადებითი
< (უარყ. კონტრ. საშ. არითმეტიკ. +10 mP)	(უარყ. კონტრ. საშ. არითმეტიკ. +10mP) – (უარყ. კონტრ. საშ. არითმეტიკ. +20mP)	> (უარყ. კონტრ. საშ. არითმეტიკ. +20 mP)

უარყოფითი კონტროლის საშუალო არითმეტიკულს + 10 და 20 mP ერთეული გვიჩვენებს mP მაჩვენებლის ზღვრებს, რომლის ფარგლებშიც ნიმუში ითვლება საექვოდ. უარყოფითი კონტროლის საშუალო არითმეტიკულს + 10 mP გვიჩვენებს საექვო ნიმუშის მაჩვენებლის ქვედა ზღვარს, რომლის ქვევითაც ნიმუში ითვლება უარყოფითად, ხოლო უარყოფითი კონტროლის საშუალო არითმეტიკულს + 20 mP გვიჩვენებს საექვო ნიმუშის მაჩვენებლის ზედა ზღვარს, რომლის ზევითაც ნიმუში ითვლება დადებითად.

საექვო და დადებითი შედეგების მიღების შემთხვევაში განმეორებით ვიკვლევდით ნიმუშებს დუბლიკატში, 20 µl ნიმუშის გამოყენებით. შედეგებს ვაფასებდით შემდეგი კრიტერიუმით: თუ ორივე დუბლიკატში mP მაჩვენებელი < უარყოფითი კონტროლის საშუალო არითმეტიკულს + 10 mP, ნიმუში ითვლება უარყოფითად. თუ ორი დუბლიკატიდან რომელიმე ნიმუშის mP მაჩვენებელი უარყოფითი კონტროლის საშუალო არითმეტიკულს + 10 mP და უარყოფითი კონტროლის საშუალო არითმეტიკულს + 20 mP შედეგებს შორისაა, ნიმუში ითვლება საექვოდ. თუ ორივე განმეორებითი ტესტირების შედეგი > უარყოფითი კონტროლის საშუალო არითმეტიკულს + 20 mP, ნიმუში ითვლება დადებითად.

### 3.4 მოლეკულური დიაგნოსტიკა

მორფოლოგიურად და ბიოქიმიურად შესწავლილ შტამებს შემდგომში ვიკვლევდით მოლეკულურ-გენეტიკური მეთოდებით, რათა დაგვედასტურებინა აღნიშნული შტამების კუთვნილება ბრუცელას გვარისადმი. ასევე დაგვედგინა, იყო

თუ არა გენეტიკური განსხვავება ერთი სახეობის შტამებს შორის და დაგვეხასიათებინა ისინი მოლეკულურ დონეზე.

### **3.4.1 ბრუცელას შტამების ინაქტივაცია**

საკვლევ მასალას პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქციით (PCR) ვიკვლევდით სამ ეტაპად: დნმ-ის გამოყოფა, ამპლიფიკაცია და დეტექცია. დნმ-ის ექსტრაქციისთვის ვიყენებდით ქლოროფორმით ინაქტივირებულ კულტურას. ამ მიზნით 500  $\mu$ ლ სტერილურ/დისტილირებულ წყალში შეგვექონდა 1  $\mu$ ლ-იანი სტერილური მარყუჭით სავსე კულტურა, ვამატებდით 500  $\mu$ ლ ქლოროფორმს. 1 სთ-ის განმავლობაში ვტოვებდით ინკუბაციაზე და ყოველ 15 წთ-ში ვავორტექსებდით კარგად შერევის მიზნით. 1 სთ-ის შემდეგ სითხის ზედა ნაწილი (სუპერნატანტი) გადაგვექონდა ახალ კრიო სინჯარაში და დნმ-ის გამოყოფამდე ვამოწმებდით სტერილობაზე, რისთვისაც, სითხის 30  $\mu$ ლ – 50  $\mu$ ლ ვაწვეთებდით შოკოლადისებურ აგარზე და ვაინკუბირებდით 37°C 72 სთ-ის განმავლობაში. აღნიშნული დროის გასვლის შემდეგ, ფინჯანზე ნაზარდის არარსებობის შემთხვევაში სითხის ზედა ნაწილს (სუპერნატანტს) ვიყენებდით დნმ-ის ექსტრაქციისთვის (დნმ-ის ექსტრაქციამდე სუპერნატანტს ვინახავდით +4°C-ზე).

### **3.4.2 დნმ-ის ექსტრაქცია**

ამ მიზნით გამოვიყენეთ დნმ-ის გამომყოფი ნაკრები – DNA Mini Kit, (Qiagen Inc). პროცედურას ვატარებდით ნაკრების მწარმოებლის ინსტრუქციის შესაბამისად: კერძოდ, 200  $\mu$ ლ საკვლევ ნიმუშის და 200  $\mu$ ლ ლიზის (AL) ბუფერის ნარევის ვამატებდით 20  $\mu$ ლ პროტეინაზა K-ს, ვავორტექსებდით კარგად შერევის მიზნით და ინკუბაციაზე ვათავსებდით თერმობლოკში 56°C-ზე 10 წთ. შემდეგ, ნიმუშებს ვამატებდით 200  $\mu$ ლ (96%) ეთანოლს, ვავორტექსებდით და ვაცენტრიფუგირებდით. ამის შემდეგ მთელი სითხე გადაგვექონდა 2 ml-იან მემბრანაან სვეტში (QIAamp Mini spin column) და ვაცენტრიფუგირებდით 8000 ბრ/წთ 1 წთ. რის შედეგადაც საკვლევ ნიმუშის დნმ უკავშირდებოდა სვეტის მემბრანას. ლიზატის მინარევებისგან გაწმენდის მიზნით ნიმუშს ვრეცხავდით 500  $\mu$ ლ (AW1) და (AW2) გამრეცხი

ბუფერებით და ვაცენტრიფუგირებდით 8000 ბრ/წთ 1 წთ და მაქსიმალურ, 14000 ბრ/წთ სიჩქარეზე 3 წთ, შესაბამისად. შემდეგ, მემბრანის გაშრობის მიზნით ცარიელ სვეტს კვლავ ვაცენტრიფუგირებდით მაქსიმალურ სიჩქარეზე (14000 ბრ/წთ) 1 წთ და შემდეგ ვამატებდით 200 µl ელუციის ბუფერს, ვტოვებდით ინკუბაციაზე ოთახის ტემპერატურაზე 5 წთ და გახსნილ დნმ-ს ვაცენტრიფუგირებდით 8000 ბრ/წთ 1 წთ. მიღებულ დნმ-ს შემდგომი კვლევისთვის ვინახავდით -20°C-ზე.

### 3.4.3 პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქცია რეალურ დროში (*real-time PCR*)

პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქცია რეალურ დროში, რომელიც გამოიყენება *Brucella*-ს გვარის დეტექციისთვის (*Brucella* spp. Detection Kit, Idaho Technology, Target 1) ემყარება ჰიბრიდიზაციული ზონდების პრინციპს. რეაქცია მიმდინარეობდა რეალური დროის PCR აპარატში Light Cycler 2.0 Roche, ექვსი ფლოუორესცენტული ოპტიკური არხით. სადიაგნოსტიკო ნაკრების ლიოფილიზირებულ სარეაქციო არეს ვამატებდით 40 µl საკვლევ დნმ-ს. ნარევს თანაბრად ვანაწილებდით ორ კაპილარში (19-19 µl), ვაცენტრიფუგირებდით 15 წმ და ვათავსებდით ამპლიფიკატორში. ამპლიფიკაცია მიმდინარეობდა შემდეგი სარეაქციო პირობებით (ცხრილი 8):

ცხრილი 8. *real-time PCR*-ის პირობები (Idaho Technology, *Brucella*, T1)

პროგრამა	ტემპერატურა (°C)	დრო (წმ)
დნმ-ის დენატურაცია	94	120
ამპლიფიკაცია (45 ციკლი)	94	0
	60	20
არხი	640/530	

შედეგებს ვაფასებდით კომპიუტერული პროგრამის “LightCycler@software 4.0”-ის საშუალებით. რეაქცია მიმდინარეობდა საშუალოდ 25-30 წთ.

### 3.4.4 AMOS PCR

ბრუცელას სახეობების საიდენტიფიკაციოდ გამოიყენება მულტიპლექს AMOS (*A-abortus*, *M-melitensis*, *O-ovis*, *S-suis*) PCR მეთოდი. რეაქციის დასადგმელად

საჭიროა 5 პრაიმერის ნარევი, რომელიც შედგება: ერთი საერთო ბრუცელას გვარისთვის დამახასიათებელი IS711 ფორვარდ (F) პრაიმერის და ოთხი თითოეული სახეობისთვის სპეციფიკური რევერს (R) პრაიმერების ნარევისგან (Bricker, Halling 1994).

F IS711 პრაიმერი: 5' – TGCCGATCACTTAAGGGCCTTCAT – 3'

R *B.abortus* პრაიმერი: 5' – GACGAACGGAATTTTTCCAATCCC – 3'

R *B.melitensis* პრაიმერი: 5' – AAATCGCGTCCTTGCTGGTCTGA – 3'

R *B.ovis* პრაიმერი: 5' – CGGGTTCTGGCACCATCGTCCG – 3'

R *B.suis* პრაიმერი: 5' – GCGCGGTTTTCTGAAGGTTTCAGG – 3'

პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქციის დასადგმელად ვიყენებდით 12,5 µl Taq PCR Master Mix Kit, Qiagen ნაკრების 2X ბუფერს (Qiagen PCR 2X buffer), რომელიც შეიცავდა: Taq-დნმ პოლიმერაზას (Taq DNA Polymerase), 3 mM Mg<sup>2+</sup> იონებს (MgCl<sub>2</sub>) და ნუკლეოტიდების ნარევის (dNTPmix-dATP/dCTP/dGTP/dTTP – თითოეულის კონცენტრაცია 400 µM). ბუფერს ვამატებდით 1 µl 5 პრაიმერის ნარევის (თითოეულის საბოლოო კონცენტრაცია შეადგენდა 0.2 µM *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. ovis*, *B. Suis* სპეციფიკური პრაიმერებისათვის და 1 µM IS711 სპეციფიკური პრაიმერისათვის) და 1 µl საკვლევ დნმ-ს. სარეაქციო არეს საბოლოო მოცულობა ივსებოდა წყლით და შეადგენდა 25 µl-ს.

რეაქცია მიმდინარეობდა თერმოციკლერში შემდეგი ტემპერატურული პრობებით (ცხრილი 9):

**ცხრილი 9. მულტიპლექს AMOS PCR-ით ტიპირების პრობები**

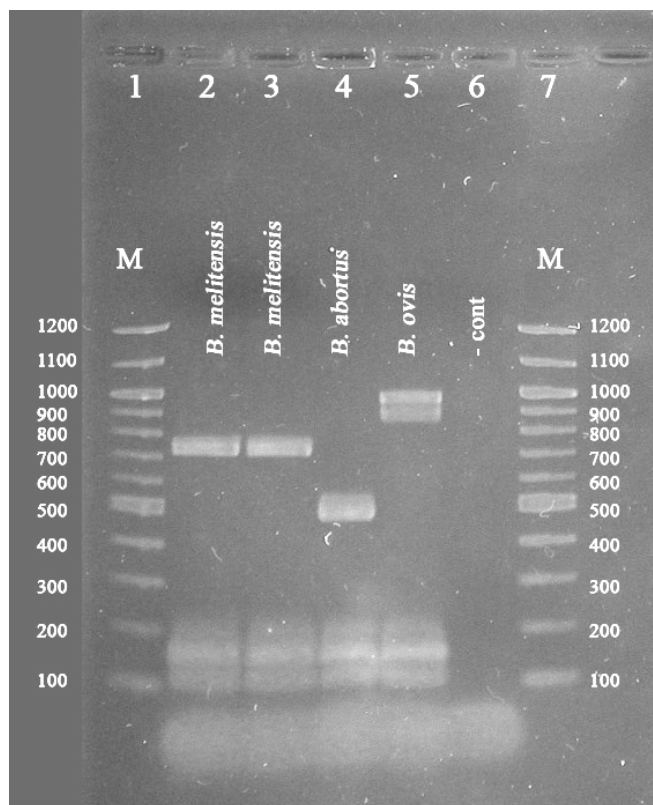
პროგრამის დასახელება	ტემპერატურა (°C)	დრო	
საწყისი დენატურაცია	95	5 წთ	
დენატურაცია	95	30 წმ	35 ციკლი
ჰიბრიდიზაცია	55.5	30 წმ	
ელონგაცია	72	1 წთ	
საბოლოო ელონგაცია	72	5 წთ	
დაყოვნება	4	∞	

რეაქციის დამთავრების შემდეგ რეაქციის პროდუქტს გამოწმბდით 1.2%-იანი აგაროზის გელზე. 10  $\mu$ l რეაქციის პროდუქტს ვამატებდით 2  $\mu$ l საღებავს (Gel Loading Solution, 6x concentrate, Sigma) და მიღებული ნარევის 10  $\mu$ l შეგვქონდა წინასწარ ჩამოსხმული, 1.2%-იანი აგაროზის გელის ფოსოებში (სტანდარტული აგაროზა + 1X Tris-Borate-EDTA (TBE) (Tris 130 mM; EDTA 2.5 mM; ბორის მჟავა 45 mM)) გელის პირველ და ბოლო ფოსოში შეგვქონდა 2  $\mu$ l სტანდარტული, 100 bp (ფუძე წყვილი - (ფწ)) (NEB - New England BioLabs, DNA 100bp Ladder, 0.50  $\mu$ g) მოლეკულური წონის მარკერი. ფორები მიმდინარეობდა 100 ვოლტი ძაბვის პირობებში 45 წთ. ელექტროფორეზის დასრულების შემდეგ გელს ვღებავდით ეთიდიუმ-ბრომიდით (100  $\mu$ l/L) და ვრეცხავდით 3-ჯერ დისტილირებულ წყალში 10-10 წთ.

დნმ-ის ფრაგმენტების ეთიდიუმ ბრომიდით შეღებვის შემდეგ ტრანსლუმინატორზე ულტრაიისფერი გამოსხივების ქვეშ, ხილული ხდებოდა PCR-ის შედეგად მიღებული ამპლიფიცირებული უბნები. მათი მოლეკულური წონის დადგენა ხორციელდებოდა გელზე დატანილი მოლეკულური წონის მარკერებთან შედარების გზით. შედეგების დოკუმენტაციას ვახდენდით ციფრული კამერებით და პოლაროიდის ფირებით.

პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქციის შედეგად მიღებული დნმ-ების ამპლიფიცირებული უბნების მოლეკულური წონის მიხედვით ვახდენდით სახეობების დადგენას (სურ. 3), სადაც:

- 498 bp - *B. abortus* (ბიოვარი 1, 2 და 4);
- 731 bp - *B. melitensis* (ბიოვარი 1, 2 და 3);
- 976 bp - *B. ovis*;
- 285 bp - *B. suis* (ბიოვარი 1).



სურათი 3. PCR შედეგების ვიზუალიზაცია, აგაროზის გელ-ელექტროფორეზი: ზოლი 1 – (M) 100 bp მარკერი (NEB), ზოლი 2 – *B. melitensis* დადებითი კონტროლი; ზოლი 3 – *B. melitensis* დადებითი კონტროლი; ზოლი 4 – *B. abortus* დადებითი კონტროლი; ზოლი 5 – *B. ovis* დადებითი კონტროლი; ზოლი 6 – უარყოფითი (-cont.) კონტროლი; ზოლი 7 – (M) 100 bp მარკერი (NEB).

### 3.4.5. ერთ-ნუკლეოტიდური პოლიმორფიზმი (Single Nucleotide Polymorphism (SNP))

როგორც აღვნიშნეთ, AMOS-PCR-თან ერთად, ბრუცელას სახეობების იდენტიფიკაციისთვის ვიყენებდით ერთ-ნუკლეოტიდური პოლიმორფიზმით ტიპირების რეაქციას (SNP typing), რომელიც ემყარება *glk* (glucokinase), *omp25* (omp – 25 kDa outer membrane proteine) და *trpE* (anthranilate synthase) გენებში SNP ალტერნატიული ვარიანტების კომბინაციით ბრუცელას სახეობების დადგენას. ამისათვის, თითოეული ნიმუშის სამ ლოკუსზე ვდგამდით PCR რეაქციას სამი წყვილი პრაიმერის გამოყენებით (ცხრილი 10) (Scott et al., 2007).

**ცხრილი 10. ერთ-ნუკლეოტიდური პოლიმორფიზმის რეაქციაში ბრუცელას  
სახეობების სადიფერენციაციო პრაიმერები**

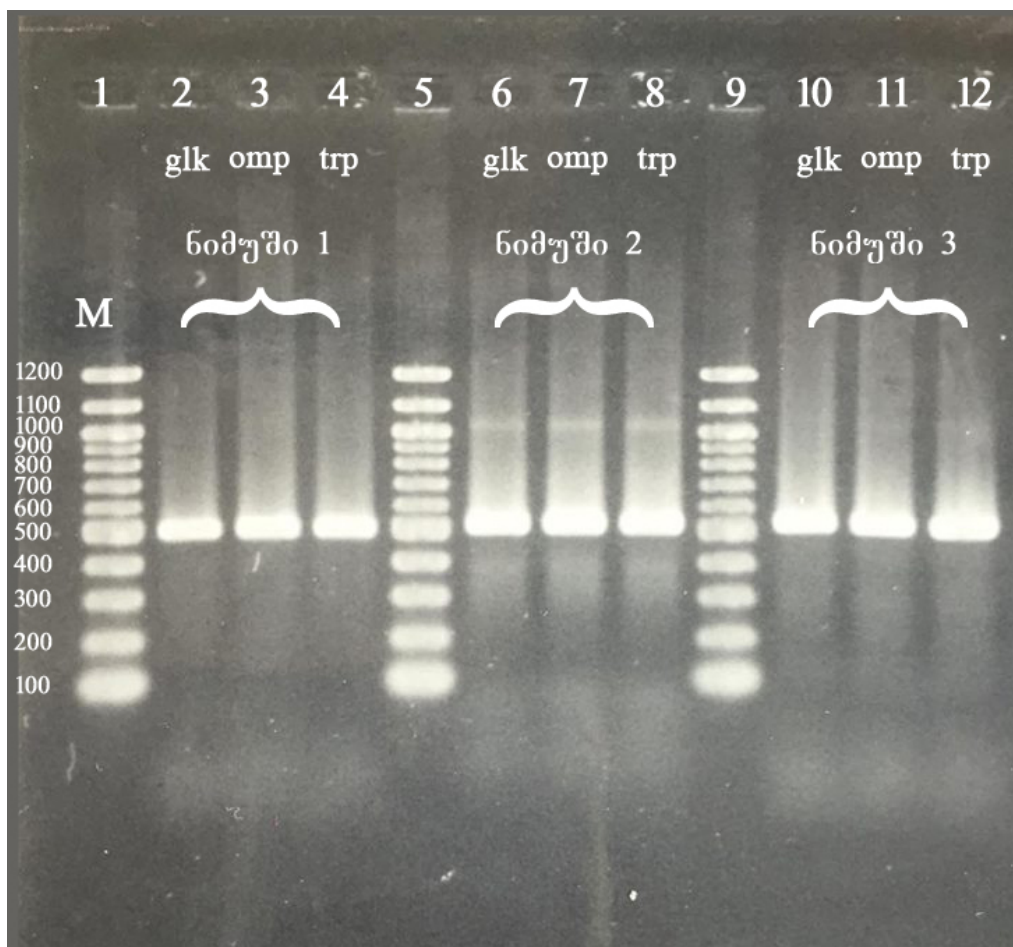
პრაიმერის დასახელება	პრაიმერის თანმიმდევრობა(5'-3')
<b>ამპლიფიკაცია</b>	
<i>glk</i> up	5'-TATGGAAMAGATCGGCCGG-3'
<i>glk</i> down	5'-GGGCCTTGTCTCGAAGG-3'
<i>omp25</i> up	5'-ATGCGCACTCTTAAGTCTC-3'
<i>omp25</i> down	5'-GCCSAGGATGTTGTCCGT-3'
<i>trpE</i> up	5'-GCGCGCMTGGTATGGCG-3'
<i>trpE</i> down	5'-CKSCCGCCATAGGCTTC-3'
<b>ერთი ნუკლეოტიდით დაგრძელება</b>	
<i>glk196R (glk-1344)</i>	5-CGCTAAGAATTTGYTCGCCGG-3
<i>glk427R (glk-1557)</i>	5-TTTTTTTTTTGAAGGATGCGCACCGGGATGC-3
<i>glk255R (glk-1403)</i>	5-TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAGGGTGGGCGTGATCTTGTCCGGC-3
<i>omp151F (omp25-3627)</i>	5-TGGCTATAACCGGTCTTACCTTGGCTA-3
<i>omp239F (omp25-3715)</i>	5-TTTTTTTTTTTTTTTTTTCTTTGCTGGCTGGAACCTCCAG-3
<i>trp290R (trpE-2858)</i>	5-TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGAACCTTGGCGCCCG TCTGG-3

საწყის ეტაპზე პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქციის ჩასატარებლად ვიყენებდით Invitrogen-ის ნაკრებს (Platinum PCR SuperMix High Fidelity), 1.1X ბუფერით (Invitrogen PCR 1.1X buffer), სადაც შედიოდა: Taq-დნმ პოლიმერაზა 22 U/ml (complexed recombinant Taq DNA polymerase 22 U/ml), *Pyrococcus* სახეობის *GB-D* თერმოსტაბილური პოლიმერაზა (*Pyrococcus* species *GB-D* thermostable polymerase), Platinum Taq ანტისხეულები (Platinum Taq Antibody), 66 mM Tris-SO<sub>4</sub> (pH – 8.9), 19.8 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2.4 mM MgSO<sub>4</sub>, 220 μM დეზოქსინუკლეოზიდ ტრიფოსფატები (dNTP) და სტაბილიზატორები (Stabilizers). თითოეულ სამუშაო ნარევს ვამატებდით 0.25 μl 50 μM პრაიმერების წყვილს (*glk*, *omp*, *trp*) და საკვლევ დნმ-ს 0.5 μl-ის ოდენობით. სარეაქციო ნარევის საბოლოო მოცულობა შეადგენდა 25 μl-ს. რეაქცია მიმდინარეობდა თერმოციკლერში შემდეგი პროგრამით (ცხრილი 11):

### ცხრილი 11. SNP ტიპირების PCR პირობები

პროგრამის დასახელება	ტემპერატურა (°C)	დრო	
საწყისი დენატურაცია	95	10 წთ	
დენატურაცია	95	45 წმ	35 ციკლი
ჰიბრიდიზაცია	53	45 წმ	
ელონგაცია	72	45 წმ	
საბოლოო ელონგაცია	72	7 წთ	
დაყოვნება	4	∞	

რეაქციის დამთავრების შემდეგ PCR-ის შედეგად მიღებული ამპლიფიცირებული უბნების სანახავად ვამზადებდით 1.3%-იან აგაროზის გელს TBE (Tris-borate-EDTA) ბუფერის გამოყენებით. რეაქციის პროდუქტების 2  $\mu$ l ვურევდით 1  $\mu$ l საღებავს (6x Loading Dye, Sigma), რომელიც შეგვქონდა გელის ფოსოებში და კონტროლებად ვუშვებდით 2  $\mu$ l სტანდარტული დნმ-ის 100 bp მოლეკულური წონის მარკერს (New England BioLabs 100bp DNA Ladder, 0.50  $\mu$ g), რეაქცია მიმდინარეობდა 100 ვოლტზე 45 წთ (სურ. 4).



სურათი. 4. *glk*, *omp* და *trp* ამპლიფიცირებული უბნების ვიზუალიზაცია.



აგაროზის გელ-ელექტროფორეზი: ზოლი 1 – (M) 100 bp მარკერი (NEB); ზოლი 2, 3, 4 - ნიმუში #1 (E10-00092/03-902) შესაბამისი *glk*, *omp* და *trp* ამპლიფიცირებული უბნებით; ზოლი 5 - 100 bp მარკერი (NEB); ზოლი 6, 7, 8 - ნიმუში #2 (E10-00094/03-904) შესაბამისი *glk*, *omp* და *trp* ამპლიფიცირებული უბნებით; ზოლი 9 - 100 bp მარკერი (NEB); ზოლი 10, 11, 12 - ნიმუში #3 (E10-00102/03-912) *glk*, *omp* და *trp* ამპლიფიცირებული უბნებით.

პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქციის შედეგად მიღებულ ამპლიფიცირებულ პროდუქტს ვასუფთავებდით ზედმეტი დეზოქსინუკლეოზიდ ტრიფოსფატებისგან (dNTPs) და პრაიმერებისგან, რისთვისაც მიკროცენტრიფუგის სინჯარაში შეგვკონდა 5 µl ნიმუში და 2 µl ეგზოსაპი (ExoSAP-IT, USB Corporation, Ohio, USA), ვავორტექსებდით, ვაცენტრიფუგირებდით (3000 ბრ/წთ სიჩქარეზე 5 წამი) და ვათავსებდით თერმოციკლერში ინკუბაციისა და ინაქტივაციისთვის შემდეგი პროგრამით:

ინკუბაცია – 37°C 15 წთ

ინაქტივაცია – 80°C 15 წთ

შემდეგ ეტაპზე, რომელსაც ეწოდება ერთი ნუკლეოტიდით დაგრძელების რეაქცია (Single Base Extension (SBE) Reaction) ვიყენებდით Beckman Coulter-ის ნაკრებს (GenomeLab SNPstart primer extension kit, Beckman Coulter). სინჯარაში შეგვკონდა 4.5 µl წყალი, 4 µl სამუშაო ნარევი, სადაც შედიოდა: 10x ბუფერი (10x buffer), დიდეზოქსინუკლეოზიდ ტრიფოსფატები – ddUTP, ddGTP, ddCTP, ddATP და პოლიმერაზა და 1 µl პრაიმერების ნარევი შემდეგი კონცენტრაციებით და რაოდენობებით (ცხრილი 12):

**ცხრილი 12. ერთი ნუკლეოტიდით დაგრძელების რეაქციისთვის პრაიმერების ნარევის მომზადება**

SNP პრაიმერის სახელწოდება	საწყისი კონცენტრაცია, µM	საბოლოო კონცენტრაცია, µM	მოცულობა µl
glk196R	20	1.2	1.2
glk427R-T	20	1.0	1.0
glk255R-T	20	2.0	2.0
omp151F	20	1.0	1.0
omp239F-T	20	0.9	0.9
Trp290R-T	20	0.5	0.5

ბოლოს ვამატებდით 0.8  $\mu$ l ამპლიფიცირებულ დნმ-ს და ვათავსებდით თერმოციკლერში შემდეგი პირობებით (SNP start extension) (ცხრილი 13):

**ცხრილი 13. ერთი ნუკლეოტიდით დაგრძელების რეაქციის პირობები**

პროგრამის დასახელება	ტემპერატურა (°C)	დრო	
საწყისი დენატურაცია	96	5 წთ	
დენატურაცია	96	20 წმ	28 ციკლი
ჰიბრიდიზაცია	64	10 წმ	
ელონგაცია	72	30 წმ	

აღნიშნული პროგრამის დამთავრების შემდეგ მიღებულ პროდუქტს კვლავ ვასუფთავებდით საპით (SAP) გამოუყენებელი (ნარჩენი) დიდებოქსინუკლეოზიდ ტრიფოსფატებისგან (ცხრილი 14).

**ცხრილი 14. SNP რეაქციის პროდუქტის გამწმენდი ნარევი**

რეაქტივის დასახელება	მოცულობა $\mu$ l X1
საპი 1U/ $\mu$ l (Roche Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP))	0.25
საპ ბუფერი (SAP buffer)	1.30
H <sub>2</sub> O (DNase, RNase free PCR grade water)	1.45
ჯამური მოცულობა	3.00

ბოლო ეტაპზე ნარევს ვავორტექსებდით 3000 ბრ/წთ 5წმ, ვათავსებდით თერმოციკლერში 37°C –ზე 30 წთ და ფერმენტების ინაქტივაციის მიზნით 65°C 15 წთ . ბოლო ეტაპზე 0.5  $\mu$ l გაწმენდილი ნიმუში შეგვქონდა 96 ფოსოიან პლანშეტში (Beckman Coulter 96-well plates, nonsterile), ვამატებდით 39  $\mu$ l SLS (Beckman Coulter GenomeLab Sample Loading Solution) და 0.5  $\mu$ l მოლეკულური წონის სტანდარტს (SS80 Beckman Coulter CEQ DNA Size Standard 80). ბოლოს სარეაქციო ნარევს ვამატებდით ერთ წვეთ მინერალურ ზეთს და ვათავსებდით კაპილარული ფორეზის CEQ 8000

(Beckman Coulter CEQ System) აპარატში. აპარატის ბუფერის პლანშეტის თითოეულ ფოსოს 3/4-ით ვაკვებდით ბუფერით (Sample Loading Buffer).

შედეგების ინტერპრეტაციას ვახდენდით CEQ/GenomeLab Software Version 8.0, (Beckman Coulter) პროგრამის მეშვეობით. ქვემოთ საილუსტრაციოდ მოყვანილია ელექტროფეროგრამის სურათი და ცხრილები, რომლებშიც მოცემულია სახეობა სპეციფიკური (უნიკალური) და ყველა სახეობისთვის საერთო SNP მარკერები (სურ. 5; ცხრილი 15 და 16). ეს მარკერებია: omp151F, glk196R, glk427R, omp239F, glk255R, trp290R, რომლებსაც შეესაბამება შესაბამისი პრაიმერის დაკავშირების ადგილები (ცხრილი 16). მარკერი omp151-სთვის უნიკალურ ნუკლეოტიდს წარმოადგენს „T“, რომელიც დამახასიათებელია *B. abortus*-ის სახეობისთვის, ხოლო ყველა დანარჩენ სახეობას საერთო „C“ ნუკლეოტიდი ახასიათებს. glk-427-ის შემთხვევაშიც *B. Ovis* შტამებისათვის უნიკალურია „T“ ნუკლეოტიდი, ხოლო სხვა დანარჩენი სახეობებისთვის დამახასიათებელია საერთო „C“ ნუკლეოტიდი. omp239F შემთხვევაში *B. canis* შტამებისათვის უნიკალურ ნუკლეოტიდს წარმოადგენს „A“, დანარჩენი სახეობებისთვის – „C“ და ა.შ. ერთადერთ გამონაკლისს წარმოადგენს მარკერი glk196R, სადაც ერთიდაიგივე უნიკალური ნუკლეოტიდი „C“ საზიაროა ბრუცელას ორი სახეობისთვის (*B. abortus* (გენოტიპი B) და *B. neotomae*), ხოლო დანარჩენ სახეობებს ახასიათებთ საერთო „T“ ნუკლეოტიდი (Scott et al., 2007; Whatmore, Perrett and MacMillan, 2007) (ცხრილი 15, 16).

ცხრილი 15. ბრუცელას სახეობების დიფერენცირებისთვის სპეციფიკური SNP პროფილები

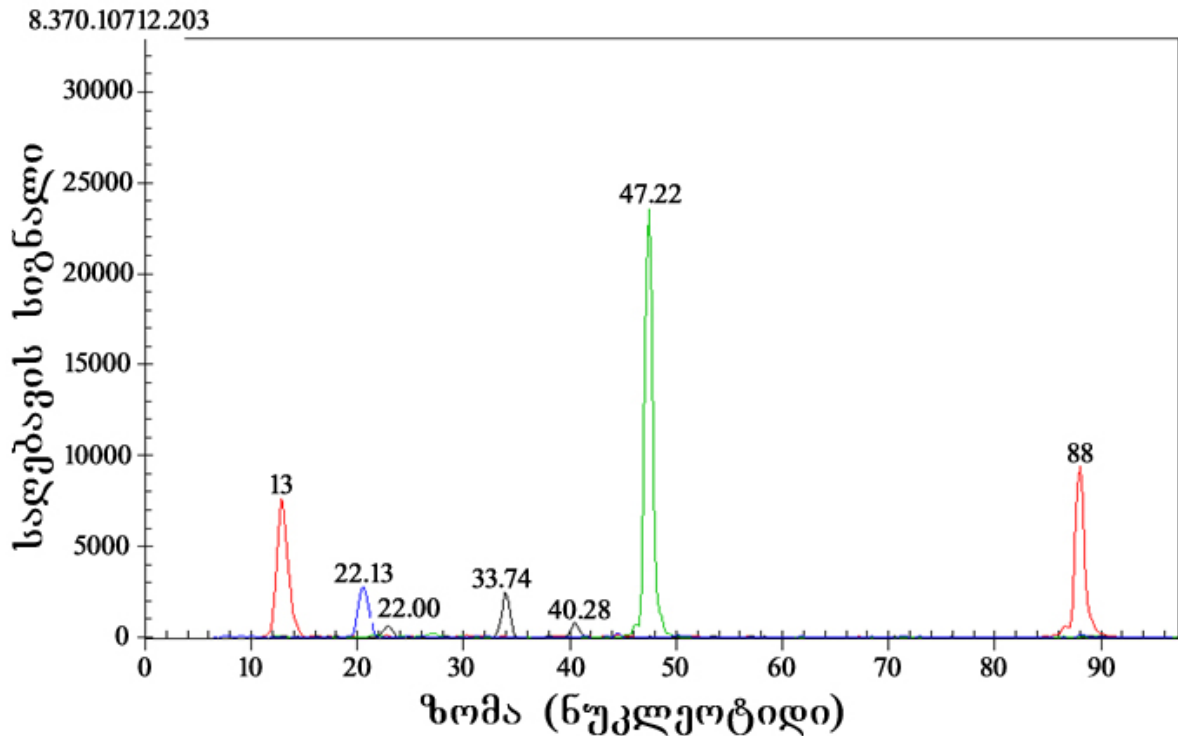
სახეობები	პროფილები პრაიმერების მიხედვით					
	glk196R-22 ( <i>glk</i> -1344)	glk427R -33 ( <i>glk</i> -1557)	glk255R -44 ( <i>glk</i> -1403)	omp151F -28 ( <i>omp25</i> -3627)	omp239F -40 ( <i>omp25</i> -3715)	trp290R -50 ( <i>trpE</i> -2858)
<i>B. abortus</i> (genotype A)	T	C	G	T	C	C
<i>B. abortus</i> (genotype B)	C	C	G	T	C	C
<i>B. melitensis</i>	T	C	C	C	C	C
<i>B. suis</i>	T	C	G	C	C	C

სახეობები	პროფილები პრაიმერების მიხედვით					
	glk196R-22 ( <i>glk</i> -1344)	glk427R -33 ( <i>glk</i> -1557)	glk255R -44 ( <i>glk</i> -1403)	omp151F -28 ( <i>omp25</i> -3627)	omp239F -40 ( <i>omp25</i> -3715)	trp290R -50 ( <i>trpE</i> -2858)
<i>B. ovis</i>	T	T	G	C	C	C
<i>B. canis</i>	T	C	G	C	A	C
<i>B. neotomae</i>	C	C	G	C	C	C
Marine mammal Brucella	T	C	G	C	C	T

ცხრილი 16. საბოლოო მულტიპლექს SNP რეაქციის სპეციფიკური პრაიმერების მახასიათებლები

სპეციფიკური პრაიმერი ერთი ნუკლეოტიდით დაგრძელებისთვის	დაკავშირების ადგილი	სახეობები	ნუკლეოტიდი (უნიკალური/საერთო)	პრაიმერის ზომა bp
glk196R	<i>glk</i> -1344	<i>B. neotomae</i>	C/T	21
omp151F	<i>omp25</i> -3627	<i>B. abortus</i>	T/C	27
glk427R	<i>glk</i> -1557	<i>B. ovis</i>	T/C	32
omp239F	<i>omp25</i> -3715	<i>B. canis</i>	A/C	39
glk255R	<i>glk</i> -1403	<i>B. melitensis</i>	C/G	43
trp290R	<i>trpE</i> -2858	Marine mammal	T/C	49

მიღებული პიკების ფერისა და ზომის (სურ. 5) შედარებით ცხრილებში მოცემულ SNP მარკერებთან, ხდებოდა ბრუცელას სახეობების იდენტიფიკაცია.



სურათი 5. ერთ-ნუკლეოტიდური პოლიმორფიზმის ფრაგმენტული ანალიზის რეაქციის შედეგების ელექტროფეროგრამა, CEQ-8000, Beckman Coulter. პიკების ფერები გვიჩვენებს განსხვავებულ ფუძეებს, სადაც T - ლურჯია, C - შავი, G - მწვანე და A - წითელი. მოცემული ექვსი პიკი შეესაბამება: glk196, omp151, glk427, glk255, omp239, trp 290 გენეტიკურ მარკერებს. წითელი ფერის 13 bp და 88 bp პიკები შეესაბამება მოლეკულური წონის მარკერს (glk255-ის პიკი ნაჩვენებ სურათში არ ჩანს).

SNP ტიპირების შედეგები დაწვრილებით განხილულია შედეგების ნაწილში.

### **3.4.6 მრავლობითი ლოკუსების ტანდემურად განმეორებადი თანმიმდევრობების ცვლადი რაოდენობის ანალიზი MLVA-8 (MLVA – Multiple Locus Variable-Number Tandem Repeat (VNTR) Analysis)**

როგორც უკვე აღვნიშნეთ MLVA ბრუცელას შტამებს შორის მრავალფეროვნების აღმოჩენის ერთ-ერთი საუკეთესო მეთოდია. ამ მიზნით ბრუცელას გენომიდან შეირჩა შემდეგი 8 ნაკლებ ვარიანტული, ტანდემურად განმეორებადი თანმიმდევრობების ცვლადი რაოდენობის (VNTR) უბანი შემდეგი თანმიმდევრობებით (ცხრილი 17), (Huynh et al., 2008):

**ცხრილი 17. MLVA-8 ანალიზისთვის გამოყენებული 8 სამიზნე უბნის თანმიმდევრობა**

პრაიმერის დასახელება	პრაიმერის შემოკლებული სახელწოდება	პრაიმერის თანმიმდევრობა (5'-3')
Bruce3F-BD3	M3F-D3	TCT CAT CGA CGG CAA GAT CGG CAT CAA GT
Bruce3R	M3R	CGC GAG GAC GAA GAG GGC ATT GC
Bruce7F-BD4	M7F-D4	GAG CCC GAT GAT ATG CGG CCA ACG AT
Bruce7R	M7R	GGA TAT TGA CGA TAT TCT TGT GTC TTC CAG CAA AGT CAC
Bruce14F-BD2	M14F-D2	GGC CTG GCG CAT GCC TTG GTG
Bruce14R	M14R	GCG ATG TCC TGC CTG CCC CAG TTC
Bruce16F-BD3	M16F-D3	GGC TAT GCG GGC GTG GAG AAC GAA CTC
Bruce16R	M16R	CTG CGC GCT TTG CAG GAT GCT ATG TTA GG
Bruce20F-BD2	M20F-D2	GCT GCG GCG GCC ATT ACC ACG C
Bruce20R	M20R	GCC GGC GGT TAT TCG TCC GGA TCG
Bruce21F-BD4	M21F-D4	GGA AGC ATG AAA CAA ACA TCA ATA ACG GGA ACT G
Bruce21R	M21R	CAC AAC GGC CGC CAG ACC GAA TCT
Bruce25F-BD4	M25F-D4	GAT GCG GGT CGA GGG CCT TGA GAG TG
Bruce25R	M25R	GAC AAT GGC CGC AAA AGC TTC CGA ACC
Bruce28F-BD4	M28F-D4	GTG CTG ACG AAG GGA AGG CAA TAA GGC AGT AG
Bruce28R	M28R	GCC GCC AAT GGC CGC AGG AAA G

მულტიპლექსური რეაქციის დასადგმელად ვამზადებდით სარეაქციო ნარევს ცხრილში მოცემული კომპონენტების შერევით (ცხრილი 18), რისთვისაც ვიყენებდით Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity, Invitrogen-ის ნაკრებს.

**ცხრილი 18. MLVA-8 ანალიზის სარეაქციო ნარევი**

სარეაქციო ნარევი	საწყისი კონცენტრაცია	საბოლოო კონცენტრაცია	მოცულობა (1X) $\mu$ l
ბუფერი (PCR buffer)	10X	1X	1.0
MgSO <sub>4</sub>	50 mM	2 mM	0.8
ნუკლეოტიდები (dNTPs )	2.5 mM	0.2 mM	0.40
დნმ პოლიმერაზა (Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity)	5 U/ $\mu$ l	0.04 U/ $\mu$ l	0.1

სარეაქციო ნარევი	საწყისი კონცენტრაცია	საბოლოო კონცენტრაცია	მოცულობა (1X) $\mu$ ლ
წყალი (H <sub>2</sub> O)			4.5

ცალკე ვამზადებდით პრაიმერების ნარევს ზემოთ ჩამოთვლილი 8 წყვილი პრაიმერის შერევით, რომელსაც სარეაქციო ნარევში ვამატებდით 1.2  $\mu$ ლ რაოდენობით (ცხრილი 19).

### ცხრილი 19. MLVA-8 ანალიზში გამოყენებული პრაიმერების ნარევი

პრაიმერის დასახელება	სამუშაო კონცენტრაცია, pM/ $\mu$ ლ	მოცულობა (1X) $\mu$ ლ
M21F-D4	2.5	0.05
M21R	2.5	0.05
M14F-D2	2.5	0.15
M14R	2.5	0.15
M28F-D4	2.5	0.05
M28R	2.5	0.05
M16F-D3	2.5	0.1
M16R	2.5	0.1
M7F-D4	2.5	0.05
M7R	2.5	0.05
M3F-D3	2.5	0.025
M3R	2.5	0.025
M20F-D2	2.5	0.15
M20R	2.5	0.15
M25F-D4	2.5	0.025
M25R	2.5	0.025

სამუშაო ნარევი და პრაიმერები ჯამში 8  $\mu$ ლ-ს შეადგენდა, რომელსაც ვამატებდით 2  $\mu$ ლ საკვლევ დნმ-ს. სარეაქციო არეს საბოლოო მოცულობა შეადგენდა 10  $\mu$ ლ-ს. ამის შემდეგ პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქციის სინჯარებს ვათავსებდით თერმოციკლერში. რეაქცია მიმდინარეობდა შემდეგი პროგრამით (ცხრილი 20):

### ცხრილი 20. MLVA-8 ტიპირების PCR პირობები

პროგრამის დასახელება	ტემპერატურა (°C)	დრო	
საწყისი დენატურაცია	94	5 წთ	
დენატურაცია	94	45 წმ	35 ციკლი

პროგრამის დასახელება	ტემპერატურა (°C)	დრო	
ჰიბრიდიზაცია	65	45 წმ	
ელონგაცია	72	45 წმ	
საბოლოო ელონგაცია	72	5 წთ	
დაყოვნება	4	∞	

შემდეგ ეტაპზე პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქციის შედეგად მიღებულ პროდუქტს ვაზავებდით 1:6-ზე (50  $\mu$ l დისტილირებულ წყალში 10  $\mu$ l PCR პროდუქტის დამატებით). რეაქციის გაშვებამდე ერთმანეთში ვურევდით SLS ბუფერს და მოლეკულური წონის სტანდარტს Size Standard 600 (SS600) შემდეგი თანაფარდობით: 4 ml SLS + 55  $\mu$ l SS600. ამის შემდეგ 96 ფოსოიანი პლანშეტის თითოეულ ფოსოში შეგვქონდა ამ ნარევის 40  $\mu$ l, რომელსაც ვამატებდით წინასწარ განზავებულ PCR პროდუქტს 2  $\mu$ l-ის ოდენობით, ერთ წვეთ მინერალურ ზეთს (ფრაგმენტული ანალიზის დროს პროდუქტის ამოორთქლების თავიდან ასაცილებლად) და ვათავსებდით კაპილარული ფორეზის CEQ 8000 (Beckman Coulter) აპარატში. აპარატის ბუფერის პლანშეტის თითოეულ ფოსოს 3/4-ით ვავსებდით ბუფერით (Sample Loading Buffer).

### 3.5 შერჩევის მეთოდოლოგია და მონაცემთა სტატისტიკური ანალიზი

მონაცემთა ანალიზისთვის გამოყენებულ იქნა აღწერილობითი და ანალიზური სტატისტიკის მეთოდები. სტატისტიკური დამუშავებისთვის გამოვიყენეთ SPSS version 20, ხოლო რუკების ასაგებად – ArcGIS 10.2 ვერსიები. კვლევის ამონარჩევის ზომა გამოვთვალეთ კომპიუტერული პროგრამა C Survey ვერსია 2.0-ით. რეგიონებში დაავადების გავრცელების შესაფასებლად გამოვიყენეთ შანსთა თანაფარდობა.

პროგრამის მიერ მოწოდებული მთლიანი ამონარჩევი იყო 949 პირუტყვი, მათგან 585 მსხვილფეხა და 364 წვრილფეხა რქოსანი პირუტყვი 95%-იანი სარწმუნოების დონით. ამონარჩევის გამოსათვლელად გამოყენებული იქნა 2006-2008 წლების მსხვილფეხა და წვრილფეხა პირუტყვის საორიენტაციო რაოდენობები რეგიონების მიხედვით. სულ შერჩეული იქნა 6 რეგიონის (კახეთი, მცხეთა-მთიანეთი, ქვემო ქართლი, შიდა ქართლი, სამცხე-ჯავახეთი, თბილისი) 37 სოფელი. მათგან მსხვილფეხა პირუტყვისთვის 5 რეგიონის 23 სოფელი. ხოლო წვრილფეხა



პირუტყვისთვის 6 რეგიონის 21 სოფელი. ნიმუშების შეგროვება დაიგეგმა შემთხვევითი შერჩევის პრინციპის გამოყენებით.

მსხვილფეხა რქოსნისთვის თითოეულ სოფელში წინასწარი გაანგარიშების მიხედვით საშუალოდ 25 სისხლის შრავი უნდა აგველო (ასევე სხვა ნიმუშებიც შესაძლებლობების ფარგლებში, მაგ. სისხლი, რძე თუ პირუტყვი იწველიდა), ხოლო წვრილფეხა პირუტყვისთვის – საშუალოდ 17 ნიმუში.

გარდა შერჩევაში მონაწილე აღნიშნული 6 რეგიონისა, ნიმუშები დამატებით შევაგროვეთ აჭარიდან და სამეგრელო-ზემო სვანეთიდან.

კვლევის ზედმიწევნით გეგმის მიხედვით წაყვანა ვერ მოხერხდა რიგი მიზეზების გამო (არასაკმარისი დაფინანსება, მეპატრონის უარი და სხვ.) პერიოდულად გვიწევდა შერჩევის წესიდან გადახვევა.

ასევე უნდა აღვნიშნო, რომ ჩვენი კვლევა ძირითადად ორიენტირებული იყო ცხოველთა პათოლოგიური მასალიდან კულტურის გამოყოფასა და მათ მოლეკულურ-გენეტიკურ დახასიათებაზე, თუმცა, გადავწყვიტეთ მიღებული შედეგების სტატისტიკური ანალიზიც გაგვეკეთებინა შესაძლებლობების ფარგლებში.

#### 4. მიღებული შედეგები

4.1 მსხვილფეხა და წვრილფეხა პირუტყვის სისხლის შრატების როზ-ბენგალის ტესტით, აგლუტინაციის დაჩქარებული რეაქციით, ფლუორესცენტული პოლარიზაციის რეაქციით და კონკურენტული იმუნოფერმენტული ანალიზით გამოკვლევის შედეგები

კვლევის ფარგლებში სისხლის შრატის 991 ნიმუში (627 მ.რ.პ-ის, 333 ცხვრის და 31 თხის) გამოვიკვლიეთ როზ-ბენგალის ტესტით (სურ. 6).

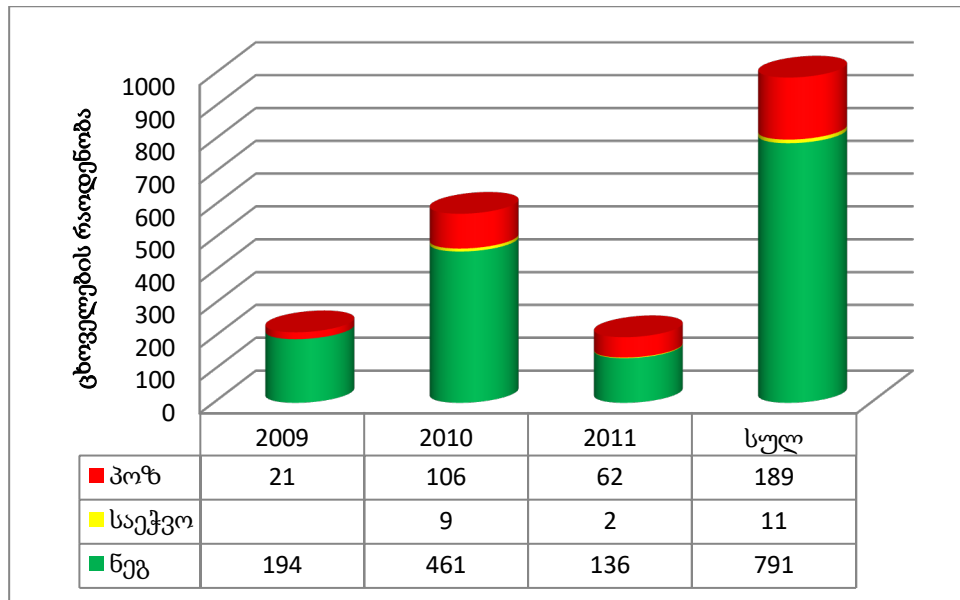


სურათი 6. როზ-ბენგალის ტესტი. ა) დადებითი შედეგი: აგლუტინატი ვარდისფერი ფიფქების სახით. ბ) უარყოფითი შედეგი: ჰომოგენური წვეთი.

გამოკვლევის შედეგად სულ დადებითად მორეაგირე აღმოჩნდა 19.07% სული ცხოველი (189/991), 13.74% წვრილფეხა (50/364), მათ შორის, 12.61% ცხვარი (42/333) და 25.81% თხა (8/31) და 22.17% (139/627) მსხვილფეხა რქოსანი პირუტყვი (ცხრილი 21).

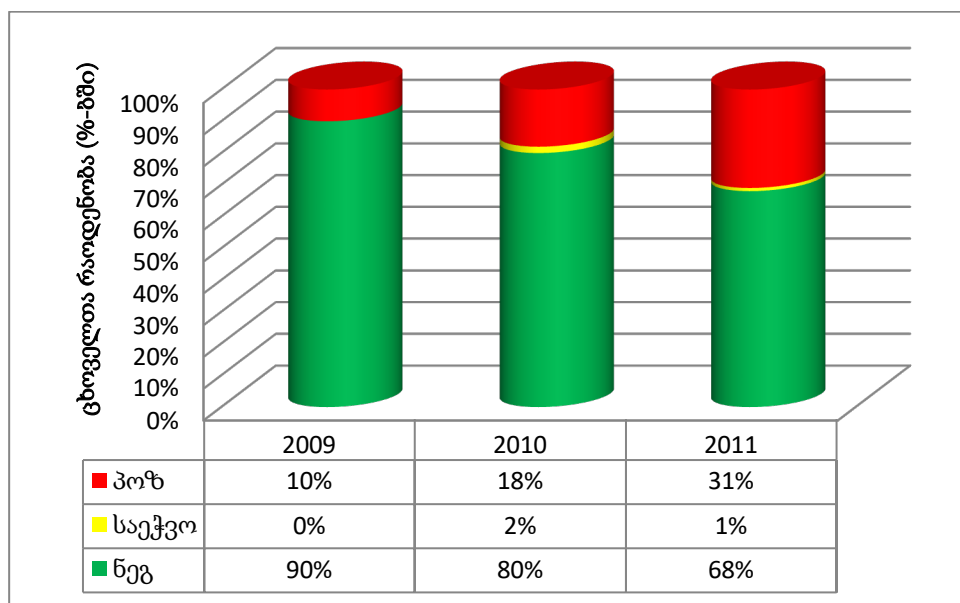
ცხრილი 21. მსხვილფეხა და წვრილფეხა რქოსანი პირუტყვის შრატების ბრუცელოზზე როზ-ბენგალის ტესტით გამოკვლევის შედეგები

ცხოველის სახეობა	ცხოველთა რაოდენობა	როზ-ბენგალის ტესტი			დადებითი %-ში
		დადებითი	საეჭვო	უარყოფითი	
მსხვილფეხა პირუტყვი	627	139	0	488	22.17
ცხვარი	333	42	11	280	12.61
თხა	31	8	0	23	25.81



სურათი 7. მსხვილფეხა და წვრილფეხა რქოსანი საქონლის შრატების ბრუცელოზზე როზ-ბენგალის ტესტით გამოკვლევის შედეგები წლების მიხედვით აბსოლუტურ რიცხვებში

ჩვენი კვლევის შედეგებიდან გამომდინარე, სულ როზ-ბენგალის ტესტით დადებითად მორეაგირე აღმოჩნდა 189 ცხოველი (სურ. 7).



სურათი 8. მსხვილფეხა და წვრილფეხა რქოსანი საქონლის შრატების ბრუცელოზზე როზ-ბენგალის ტესტით გამოკვლევის შედეგები წლების მიხედვით %-ში.

სურათიდან (სურათი 8) ნათლად ჩანს დადებითი შემთხვევების წილის მატება წლების მიხედვით.

როზ-ბენგალის ტესტით გამოკვლეული დადებითი და საექვო შრატები ასევე გამოვიკვლიეთ აგლუტინაციის დაჩქარებული რეაქციით. ამ ორი ტესტის დადებითი შედეგები იდენტური აღმოჩნდა, ხოლო როზ-ბენგალის ტესტით გამოკვლეული 11 საექვო შრატი უარყოფითი იყო აგლუტინაციის დაჩქარებული რეაქციით (ცხრილი 22).

**ცხრილი 22. წვრილფეხა და მსხვილფეხა რქოსანი პირუტყვის შრატების ბრუცელოზზე აგლუტინაციის დაჩქარებული რეაქციით და როზ-ბენგალის ტესტით გამოკვლევის შედეგები**

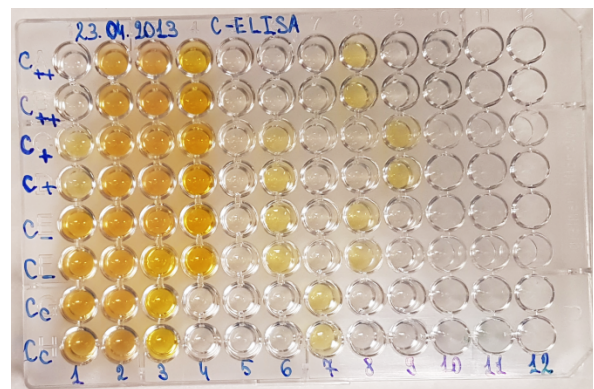
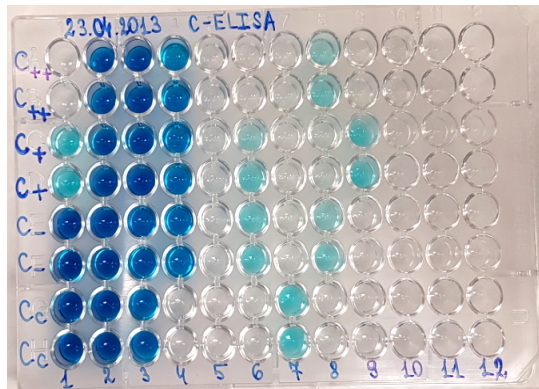
ცხოველის სახეობა	ცხოველთა საერთო რაოდენობა	როზ-ბენგალის ტესტი		აგლუტინაციის დაჩქარებული რეაქცია	
		დადებითი	საექვო	დადებითი	უარყოფითი
ძროხა	627	139	0	139	0
თხა	31	8	0	8	0
ცხვარი	333	42	11	42	11

დაავადებათა კონტროლის ეროვნული ცენტრის ბაზაზე ჩვენს მიერ როზ-ბენგალის ტესტით გამოკვლეული 991 შრატიდან 33 ცხვრის შრატი სოფლის მეურნეობის სამინისტროს ლაბორატორიაში ხელახლა შევისწავლეთ სასკრინინგო როზ-ბენგალის ტესტით, რის შედეგადაც დაავადებათა კონტროლის ეროვნული ცენტრის ბაზაზე როზ-ბენგალის ტესტით სკრინინგის შედეგად მიღებული 11 საექვო შრატის შედეგი შეფასდა როგორც უარყოფითი, რომლებიც შემდეგ დადასტურდა საკონფირმაციო კონკურენტული იმუნოფერმენტული ანალიზით (C-ELISA) და ფლუორესცენტული პოლარიზაციის რეაქციებით (FPA), ხოლო როზ-ბენგალის ტესტით მიღებული 22 დადებითი შედეგი დაემთხვა საკონფირმაციო კონკურენტული იმუნოფერმენტული ანალიზით (C-ELISA) და ფლუორესცენტული პოლარიზაციის რეაქციებით (FPA) მიღებულ გამოკვლევის შედეგებს (ცხრილი 23, 24; სურ. 9).

**ცხრილი 23. სოფლის მეურნეობის სამინისტროს ლაბორატორიის მიერ როზ-ბენგალის ტესტით, კონკურენტული იმუნოფერმენტული ანალიზით და ფლუორესცენტული პოლარიზაციის რეაქციით ცხვრის შრატების ბრუცელოზზე გამოკვლევის შედეგები**

ნიმუშის საიდენტიფიკაციო ნომერი	როზ-ბენგალის ტესტი	FPA	cELISA
1	უარყოფითი	უარყოფითი	უარყოფითი
2	დადებითი	დადებითი	დადებითი
3	დადებითი	დადებითი	დადებითი
4	დადებითი	დადებითი	დადებითი
5	დადებითი	დადებითი	დადებითი
6	დადებითი	დადებითი	დადებითი
7	დადებითი	დადებითი	დადებითი
8	უარყოფითი	უარყოფითი	უარყოფითი
9	უარყოფითი	უარყოფითი	უარყოფითი
10	დადებითი	დადებითი	დადებითი
11	დადებითი	დადებითი	დადებითი
12	დადებითი	დადებითი	დადებითი
13	დადებითი	დადებითი	დადებითი
14	დადებითი	დადებითი	დადებითი
15	დადებითი	დადებითი	დადებითი
16	უარყოფითი	უარყოფითი	უარყოფითი
17	დადებითი	დადებითი	დადებითი
18	დადებითი	დადებითი	დადებითი
19	უარყოფითი	უარყოფითი	უარყოფითი
20	უარყოფითი	უარყოფითი	უარყოფითი
21	დადებითი	დადებითი	დადებითი
22	დადებითი	დადებითი	დადებითი
23	დადებითი	დადებითი	დადებითი
24	დადებითი	დადებითი	დადებითი
25	დადებითი	დადებითი	დადებითი
26	უარყოფითი	უარყოფითი	უარყოფითი
27	დადებითი	დადებითი	დადებითი
28	უარყოფითი	უარყოფითი	უარყოფითი
29	უარყოფითი	უარყოფითი	უარყოფითი
30	დადებითი	დადებითი	დადებითი
31	დადებითი	დადებითი	დადებითი
32	უარყოფითი	უარყოფითი	უარყოფითი
33	უარყოფითი	უარყოფითი	უარყოფითი

**შენიშვნა:** წვრილფეხა პირუტყვის ყველა დადებითი (50) ნიმუში ზემოთ აღნიშნული სეროლოგიური რეაქციებით ვერ დავადასტურეთ შრატის არასაკმარისი რაოდენობის გამო.



სურათი 9. კონკურენტული (ენზიმ შეკავშირებული იმუნოსორბენტული) იმუნოფერმენტული ანალიზი (C-ELISA).

ა) შემაჩერებელი ხსნარის დამატებამდე, ბ) შემაჩერებელი ხსნარის დამატების შემდეგ; C++ დადებითი კონტროლი; C+ სუსტად დადებითი; C- უარყოფითი კონტროლი და Cc კონიუგატ კონტროლი. მე-2 რიგის ზემოდან პირველი ფოსოდან მე-4 რიგის ზემოდან მე-6 ფოსოს ჩათვლით – უარყოფითი შედეგი; მე-4 რიგის ზემოდან მე-7 ფოსოდან მე-10 რიგის ზემოდან მე-2 ფოსოს ჩათვლით – დადებითი შედეგი.

ცხრილი 24. კონკურენტული იმუნოფერმენტული ანალიზის (C-ELISA) საილუსტრაციო გეგმა-ცხრილი

ნიმუშები	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	C++	1	5	9	13	17	21	25	29	33		
B	C++	1	5	9	13	17	21	25	29	33		
C	C+	2	6	10	14	18	22	26	30			
D	C+	2	6	10	14	18	22	26	30			
E	C-	3	7	11	15	19	23	27	31			
F	C-	3	7	11	15	19	23	27	31			
G	Cc	4	8	12	16	20	24	28	32			
H	C	4	8	12	16	20	24	28	32			

შენიშვნა: C++ = დადებითი კონტროლი  
 C+ = სუსტად დადებითი კონტროლი  
 C- = უარყოფითი კონტროლი  
 Cc = კონიუგატ კონტროლი

ცხრილში (ცხრილი 24) მოცემული ციფრები წარმოადგენენ ტესტის ნიმუშების რიგით ნომრებს დუბლიკატებში. თითოეულ ფოსოში შეტანილია 1:10-ზე განზავე-

ბული შრატი, კონიუგატ კონტროლის გარდა. თავიდან შევიტანეთ 11 საექვო, ხოლო შემდეგ ფოსოებში 22 დადებითი შრატი.

აღნიშნული 33 ცხვრის შრატი პარალელურად შევისწავლეთ აგლუტინაციის დაჩქარებული რეაქციით და მივიღეთ კონკურენტული იმუნოფერმენტული ანალიზით და ფლუორესცენტული პოლარიზაციის რეაქციით გადამოწმების იდენტური შედეგები (ცხრილი 25).

**ცხრილი 25. აგლუტინაციის დაჩქარებული, კონკურენტული იმუნოფერმენტული და ფლუორესცენტული პოლარიზაციის რეაქციებით ბრუცელოზზე ცხვრის შრატების გამოკვლევის შედეგები**

#	ტესტის დასახელება	დადებითი	უარყოფითი	სულ
1	აგლუტინაციის დაჩქარებული რეაქცია	22	11	33
2	ფლუორესცენტული პოლარიზაციის რეაქცია (FPA)	22	11	33
3	კონკურენტული იმუნოფერმენტული რეაქცია (C-ELISA)	22	11	33

აგლუტინაციის დაჩქარებული რეაქციით მიღებული სადიაგნოსტიკო ტიტრის შეფასების და გადამოწმების მიზნით 20 წვრილფეხა რქოსანი პირუტყვის შრატი ასევე გამოვიკვლიეთ აგლუტინაციის დაჩქარებული და სინჯარული (რაიტი) აგლუტინაციის რეაქციებით და მივიღეთ იდენტური დადებითი სადიაგნოსტიკო ტიტრები (ცხრილი 26).

**ცხრილი 26. წვრილი რქოსანი პირუტყვის შრატების აგლუტინაციის დაჩქარებული და რაიტის რეაქციებით გამოკვლევის შედეგები**

#	ცხოველის სახეობა	აგლუტინაციის დაჩქარებული რეაქცია (ტიტრი)	სინჯარული აგლუტინაციის (რაიტი) რეაქცია (ტიტრი)
1	ცხვარი	1:100	1:100
2	ცხვარი	1:100	1:100
3	ცხვარი	1:200	1:200
4	ცხვარი	1:200	1:200
5	ცხვარი	1:100	1:100

#	ცხოველის სახეობა	აგლუტინაციის დაჩქარებული რეაქცია (ტიტრი)	სინჯარული აგლუტინაციის (რაიტი) რეაქცია (ტიტრი)
6	ცხვარი	1:100	1:100
7	ცხვარი	1:100	1:100
8	ცხვარი	1:100	1:100
9	ცხვარი	1:100	1:100
10	ცხვარი	1:100	1:100
11	ცხვარი	1:200	1:200
12	ცხვარი	1:200	1:200
13	ცხვარი	1:100	1:100
14	ცხვარი	1:100	1:100
15	ცხვარი	1:200	1:200
16	ცხვარი	1:100	1:100
17	ცხვარი	1:100	1:100
18	თხა	1:200	1:200
19	თხა	1:100	1:100
20	თხა	1:100	1:100
21	დადებითი კონტროლი (ცხვარი)	1:200	1:200
22	უარყოფითი კონტროლი (ცხვარი)	-	-

#### 4.2 მონაცემთა სტატისტიკური ანალიზი

მონაცემთა ანალიზის სრულყოფის მიზნით, საჭიროდ ჩავთვალეთ დაგვედგინა, თუ რამდენად მეტია ან ნაკლები ამა თუ იმ რეგიონში, მსხვილფეხა რქოსნების ინფიცირების რისკი. ზოგიერთი რეგიონის მონაცემები (აჭარა, სამცხე-ჯავახეთი, თბილისი) შეგროვებული დაკვირვებების რაოდენობის სიმცირის გამო ანალიზს არ დაექვემდებარა. ანალიზი ჩატარდა 569 მსხვილფეხა რქოსანი პირუტყვის გამოკვლევის მონაცემებს, რომელთაგან 120 (21,1%) დადებითი იყო როზ-ბენგალის ტესტით (ცხრილი 27).

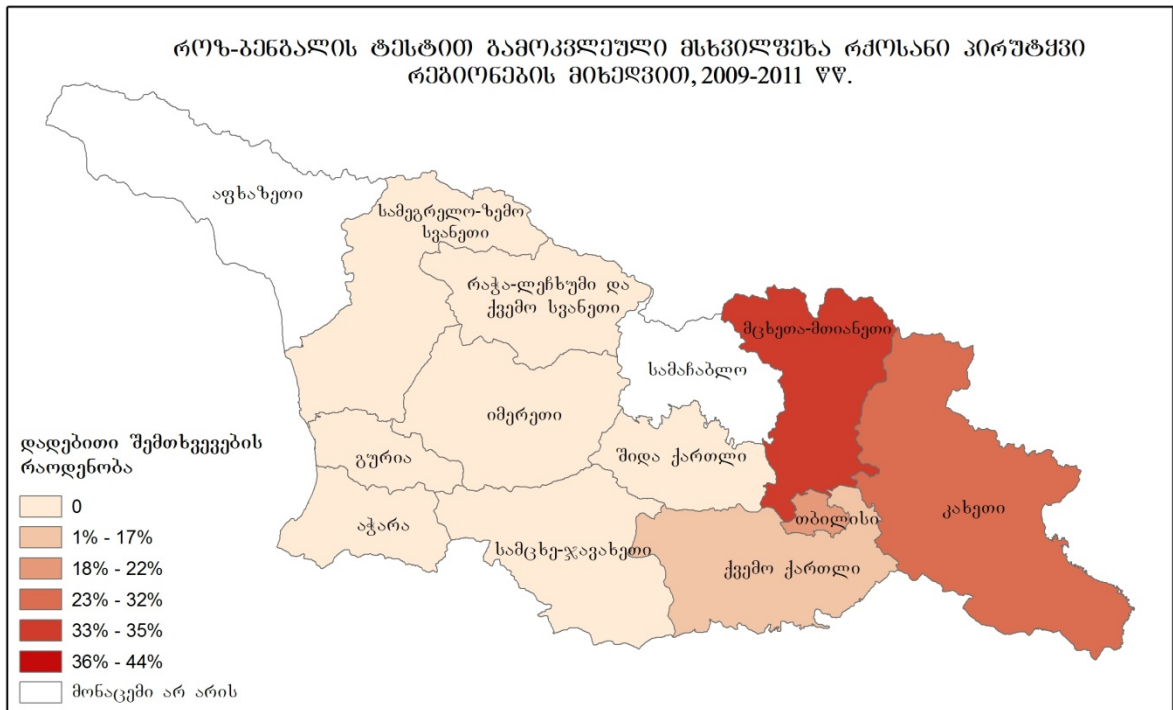
ცხრილი 27. მსხვილფეხა რქოსანი პირუტყვის როზ-ბენგალის ტესტით გამოკვლევის შედეგები რეგიონების მიხედვით

რეგიონი	როზ-ბენგალის ტესტი				სულ	
	დადებითი		უარყოფითი		რაოდენობა	
	რაოდენობა	%	რაოდენობა	%		



რეგიონი	როზ-ბენგალის ტესტი				სულ	
	დადებითი		უარყოფითი			
	რაოდენობა	%	რაოდენობა	%	რაოდენობა	%
კახეთი	14	31.8	30	68.2	44	100
მცხეთა-მთიანეთი	35	34.7	66	65.3	101	100
ქვემო ქართლი	71	16.7	353	83.3	424	100
სულ	120	21.1	449	78.9	569	100

დადგინდა, რომ კავშირი ტესტის შედეგსა და აღებული ნიმუშის რეგიონს შორის სტატისტიკურად სარწმუნოა ( $P < 0.001$ ;  $X^2$  ტესტი). ავადობის სიხშირე ყველაზე მეტი აღმოჩნდა მცხეთა-მთიანეთში (OR=2,64; CI – 1,63-4,43) და კახეთში (OR=2,17; CI – 1,10-4,28) (სურ. 10).



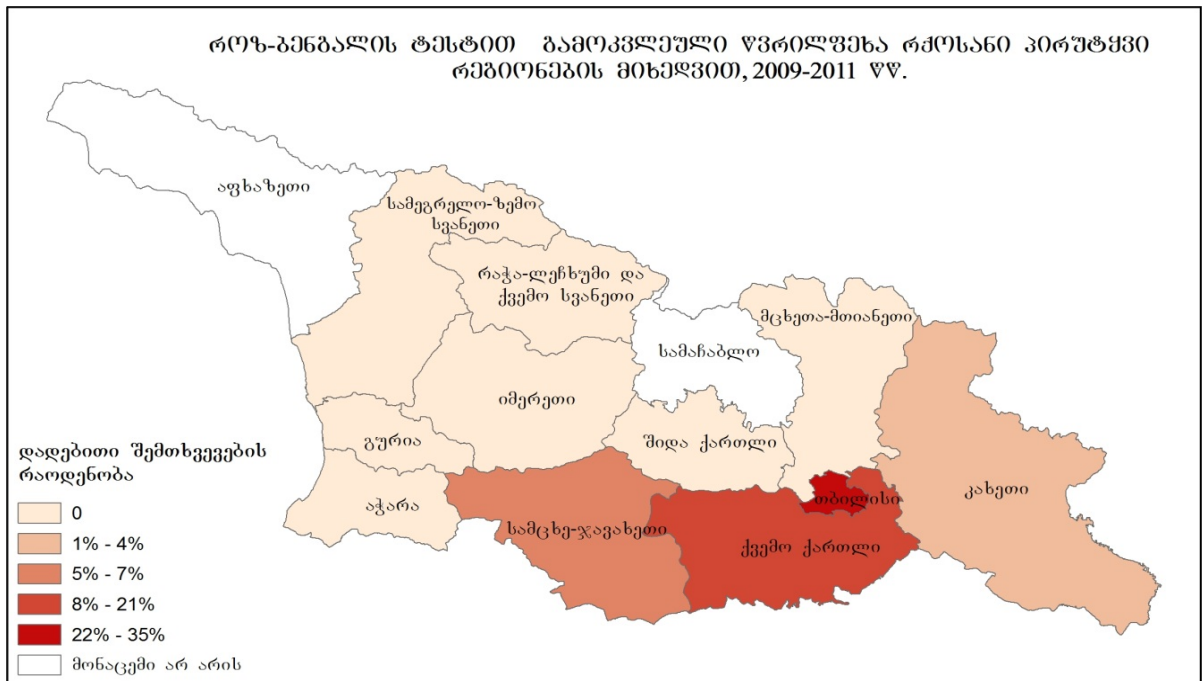
სურათი 10. როზ-ბენგალის ტესტით გამოკვლეული მსხვილფეხა რქოსანი პირუტყვი რეგიონების მიხედვით, 2009-2011 წწ.

ანალოგიური ანალიზი ჩავატარეთ წვრილფეხა რქოსანი პირუტყვისთვისაც, სადაც ასევე ანალიზს არ დაექვემდებარა მცხეთა-მთიანეთის და შიდა ქართლის მონაცემები, რადგან როზ-ბენგალის ტესტით გამოკვლევისას დადებითი არცერთი ნიმუში აღმოჩნდა (მცხეთა-მთიანეთში სულ გამოვიკვლიეთ 25, ხოლო შიდა ქართლში – 33 ნიმუში). ანალიზი ჩაუტარდა 306 წვრილფეხა პირუტყვის ნიმუშს, რომელთაგან 50 (16.3%) აღმოჩნდა როზ-ბენგალის ტესტით დადებითი (ცხრილი 28).

**ცხრილი 28. წვრილფეხა რქოსანი პირუტყვის როზ-ბენგალის ტესტით გამოკვლევის შედეგები რეგიონების მიხედვით**

რეგიონი	როზ-ბენგალის ტესტი				სულ	
	დადებითი		უარყოფითი			
	რაოდენობა	%	რაოდენობა	%	რაოდენობა	%
კახეთი	2	4.1	47	95.9	49	100
თბილისი	8	34.8	15	65.2	23	100
ქვემო ქართლი	36	20.8	137	79.2	173	100
სამცხე-ჯავახეთი	4	6.6	57	93.4	61	100
სულ	50	16.3	256	83.7	306	100

მიღებული კავშირი ტესტის შედეგსა და აღებული ნიმუშის რეგიონს შორის სტატისტიკურად სარწმუნოა ( $P < 0.001$ ;  $X^2$  ტესტი). წვრილფეხა პირუტყვის ავადობის სიხშირე ყველაზე მეტი დაფიქსირდა შემდეგი თანმიმდევრობით: თბილისის მუნიციპალიტეტში ( $OR=12,53$ ;  $CI - 2,39-65,58$ ), ქვემო ქართლში ( $OR=6,17$ ;  $CI - 1,43-26,64$ ) და სამცხე-ჯავახეთში ( $OR=1.65$ ;  $CI - 0,29-9,40$ ) (სურ. 11).



სურათი 11. როზ-ბენგალის ტესტით გამოკვლეული წვრილფეხა რქოსანი პირუტყვი რეგიონების მიხედვით, 2009-2011 წწ.

**4.3 წვრილფეხა და მსხვილფეხა პირუტყვიდან გამოყოფილი *B. melitensis*-ის იზოლატების ბიოლოგიური ნიშან-თვისებების შესწავლის შედეგები**

**4.3.1 კულტურალური თვისებები**

შესწავლილია სეროლოგიურად დადებითი და შემთხვევითი პრინციპით შერჩეული სეროლოგიურად უარყოფითი მსხვილფეხა და წვრილფეხა რქოსანი პირუტყვიდან აღებული პათოლოგიური მასალის 348 სინჯი. გარდა ამისა გამოკვლეულია სეროლოგიურად საექვო ცხვრის რძის 7 ნიმუში, 25 ძროხის ვაგინალური ნაცხი და 25 ძროხის ყბისქვეშა ლიმფური ჯირკვალი. ამრიგად, გამოკვლეულ იქნა სულ 405 სინჯი. აქვე აღვნიშნავთ, რომ 25 ვაგინალური ნაცხის და 25 ყბისქვეშა ლიმფური ჯირკვლის შესახებ სათანადო მონაცემების არარსებობის გამო ვერ შევძელით მათი გამოკვლევის შედეგების შეტანა პირველ ან მეორე ჯგუფში. ბრუცელას სელექტიურ და შოკოლადისებურ ნიადაგებზე გათესვით, გამოვყავით მორფოლოგიურად ბრუცელების მსგავსი 13 იზოლატი (3.21%) (სურ. 12; ცხრილი 29, 30).

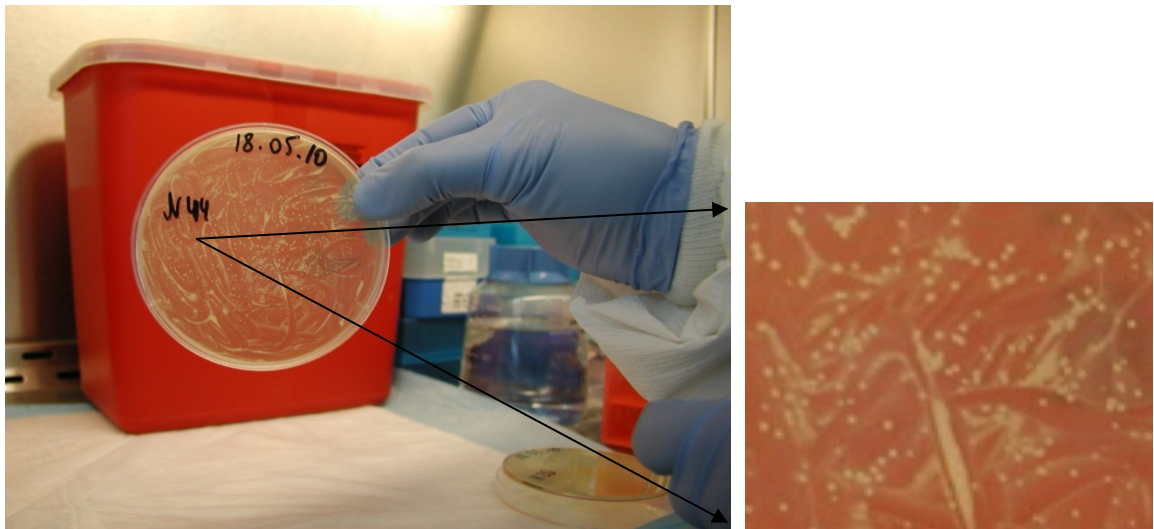
**ცხრილი 29. ბაქტერიოლოგიურად გამოკვლეული პათოლოგიური მასალა**

ცხოველის სახეობა	მთლიანი სისხლი	რძე	ყბისქვეშა ლიმფური ჯირკვალი	ვაგინალური ნაცხი	სულ გამოკვლეული
ცხვარი	56	74	-	-	130
თხა	3	0	-	-	3
ძროხა	147	75	25	25	272
სულ გამოკვლეული	206	149	25	25	405

მათგან, 3 იზოლატი გამოვყავით ცხვრის რძიდან (3 *B. melitensis*), 7 – ძროხის რძიდან (5 *B. abortus*, 2 *Brucella spp.*) და 3 – ძროხის ყბისქვეშა ლიმფური ჯირკვლებიდან (3 *Brucella spp.*). 8 იზოლატის შემთხვევაში (3 *B. melitensis* და 5 *B. abortus*) 72 სთ-იანი ინკუბაციის შემდეგ დაფიქსირდა სელექტიურ ნიადაგზე ბრუცელებისთვის დამახასიათებელი, მოთეთრო-თაფლისფერი, პრიალა, ამობურცული ზედაპირის მქონე, 1-2 მმ დიამეტრის მრგვალი კოლონიების ზრდა.

ძროხის რძიდან გამოყოფილი 2 *Brucella spp.* კულტურის შემთხვევაში (E10-00096/03-906 და E10-00110/03-920) 96 სთ-იანი ინკუბაციის შემდეგ სელექტიურ და არასელექტიურ ნიადაგებზე აღინიშნა 9-12 მმ დიამეტრის ბრტყელი, ლორწოვანი,

ყვითელი-მოკრემისფრო, მრგვალი კოლონიები, ხოლო ძროხის ყბისქვეშა ლიმფური ჯირკვლებიდან გამოყოფილი 3 *Brucella spp.* კულტურის შემთხვევაში (E10-00118/03-928, E10-00136/03-946, E10-00140/03-950) 48 სთ-იანი ინკუბაციის შემდეგ 2-4 მმ დიამეტრის, მრგვალი, მბრწყინავი, მოკრემისფრო-თაფლისფერი, ლორწოვანი კოლონიები. ლიმფური ჯირკვლიდან გამოყოფილმა ერთმა კულტურამ (E10-00140/03-950) გამოიწვია სელექტიური ნიადაგის ფერის ცვლილება მუქ ყვითელ ფერში და ნიადაგის ლიზისი.



სურათი 12. ცხვრის რძიდან გამოყოფილი *B. melitensis*-ის კულტურა

**ცხრილი 30. ცხოველური ნიმუშებიდან გამოყოფილი *Brucella spp.* შტამები**

#	შტამის საიდენტიფიკაციო ნომერი	გამოყოფის წყარო	გეოგრაფიული წარმომავლობა	შედეგი		
				rt - PCR	AMOS PCR	SNP
1	534 (20)	ცხვრის რძე	ქვემო ქართლი მარნეული, ერთეესის დასახლება	<i>Brucella spp.</i>	<i>Brucella melitensis</i>	<i>Brucella melitensis</i>
2	552 (44)	ცხვრის რძე	ქვემო ქართლი მარნეული, ერთეესის დასახლება	<i>Brucella spp.</i>	<i>Brucella melitensis</i>	<i>Brucella melitensis</i>
3	E10-00092/03-902 (#1)	ძროხის რძე	მცხეთა-მთიანეთი დუშეთი, შუახევის ფერმერული მეურნეობა	<i>Brucella spp.</i>	-	<i>Brucella abortus</i>
4	E10-00094/03-904	ძროხის	მცხეთა-მთიანეთი	<i>Brucella</i>		<i>Brucella</i>

#	შტამის საიდენტიფიკაციო ნომერი	გამოყოფის წყარო	გეოგრაფიული წარმომავლობა	შედეგი		
				rt - PCR	AMOS PCR	SNP
	(#3)	რძე	დუშეთი, შუახევის ფერმერული მეურნეობა	<i>spp.</i>	-	<i>abortus</i>
5	E10-00096/03-906 (#5)	ძროხის რძე	მცხეთა-მთიანეთი დუშეთი, შუახევის ფერმერული მეურნეობა	<i>Brucella spp.</i>	-	-
6	E10-00102/03-912 (#11)	ძროხის რძე	მცხეთა-მთიანეთი დუშეთი, შუახევის ფერმერული მეურნეობა	<i>Brucella spp.</i>	-	<i>Brucella abortus</i>
7	E10-00108/03-918 (#17)	ძროხის რძე	მცხეთა-მთიანეთი დუშეთი, შუახევის ფერმერული მეურნეობა	<i>Brucella spp.</i>	-	<i>Brucella abortus</i>
8	E10-00110/03-920 (#19)	ძროხის რძე	მცხეთა-მთიანეთი დუშეთი, შუახევის ფერმერული მეურნეობა	<i>Brucella spp.</i>	-	-
9	E10-00532/03-983	ძროხის რძე	თბილისი ვაკე-საბურთალო, სოფ. თხინვალა	<i>Brucella spp.</i>	-	<i>Brucella abortus</i>
10	11E-01804/02- 1050/MR (#6)	ცხვრის რძე	ქვემო ქართლი მარნეული, სოფ. სადახლო	<i>Brucella spp.</i>	<i>Brucella melitensis</i>	<i>Brucella melitensis</i>
11	E10-00118/03- 928/MR (#3)	ძროხის ყბისქვეშა ლიმფური ჯირკვალი	მცხეთა-მთიანეთი დუშეთი, შუახევის ფერმერული მეურნეობა	<i>Brucella spp.</i>	-	-
12	E10-00136/03- 946/MR (#21)	ძროხის ყბისქვეშა ლიმფური ჯირკვალი	მცხეთა-მთიანეთი დუშეთი, შუახევის ფერმერული მეურნეობა	<i>Brucella spp.</i>	-	-
13	E10-00140/03- 950/MR (#25)	ძროხის ყბისქვეშა ლიმფური ჯირკვალი	მცხეთა-მთიანეთი დუშეთი, შუახევის ფერმერული მეურნეობა	<i>Brucella spp.</i>	-	-

შენიშვნა: - არ დატიპირდა.

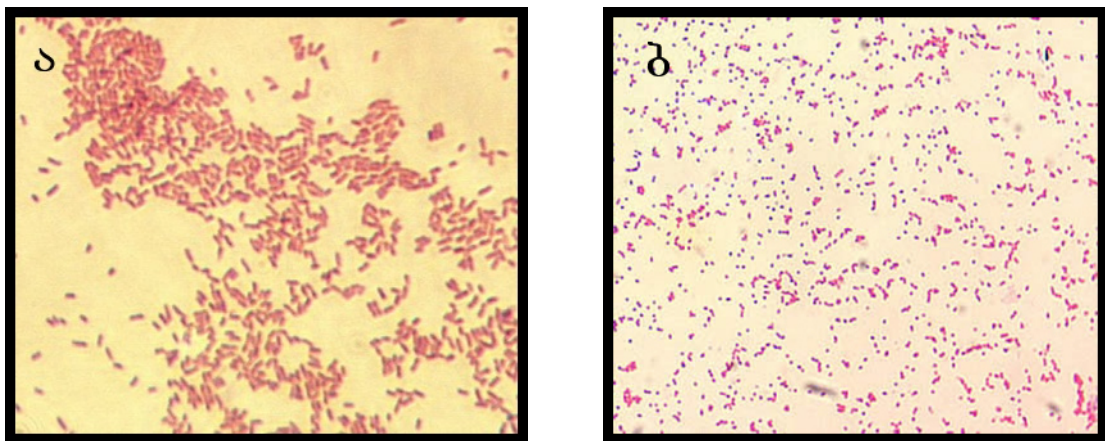
უნდა აღვნიშნოთ, რომ ინფიცირების ადრეული შემთხვევების გამოსავლენად, როდესაც იმუნური პასუხი შესაძლოა ჯერ არ არის სრულად ჩამოყალიბებული, გავთესეთ შემთხვევითი პრინციპით შერჩეული სეროლოგიურად უარყოფითი 85 მსხვილფეხა და 20 წვრილფეხა პირუტყვის შრატების შესაბამისი სისხლის ნიმუშები. არც დადებითი და არც უარყოფითი შრატების სისხლიდან კულტურა არ გამოიყო.

აღსანიშნავია, რომ სტატისტიკურად სისხლიდან კულტურის გამოყოფა რთულია და ძალიან დაბალ %-ში არის შესაძლებელი (Mamisashvili et al., 2013; Gupta et al., 2006; Ilhan et al., 2008a; Poester et al., 2010).

გარდა ამისა, გავთესეთ ლიმფური ჯირკვლების და ვაგინალური ნაცხების ყველა ნიმუში, მიუხედავად სეროლოგიური გამოკვლევის შედეგებისა და გამოვყავით ბრუცელას სამი კულტურა.

#### 4.3.2 მორფოლოგიური თვისებები

მორფოლოგიური და ტინქტორიალური თვისებების შესწავლის მიზნით, გამოყოფილი კულტურები შევღებეთ გრამის წესით და დავათვალიერეთ მიკროსკოპში. სამი კულტურის შემთხვევაში (გამოყოფის წყარო – ცხვრის რძე) მივიღეთ *B. melitensis*-თვის დამახასიათებელი სურათი, კერძოდ, პრეპარატში თანაბრად განაწილებული, გრამ-უარყოფითი წვრილი კოკები. დანარჩენი 10 იზოლატი (გამოყოფის წყარო – ძროხის რძე, ლიმფური ჯირკვლები), შედარებით მსხვილი კოკო-ბაცილები აღმოჩნდა (სურ. 13).

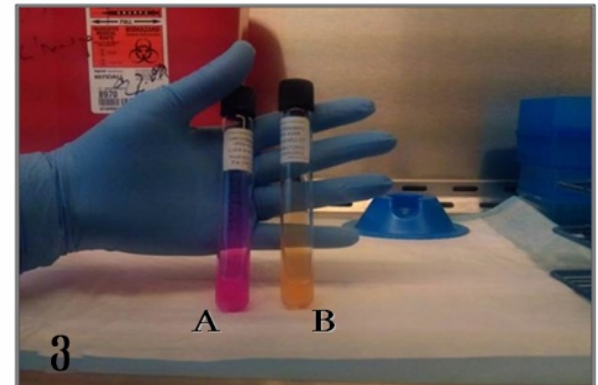
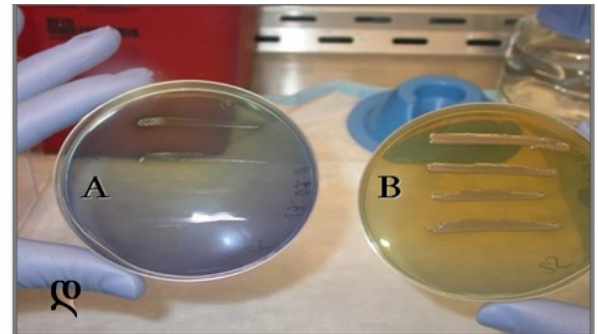
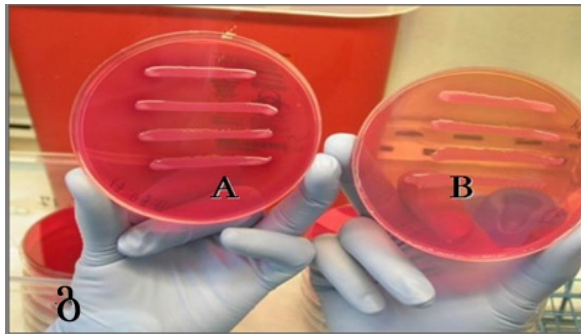
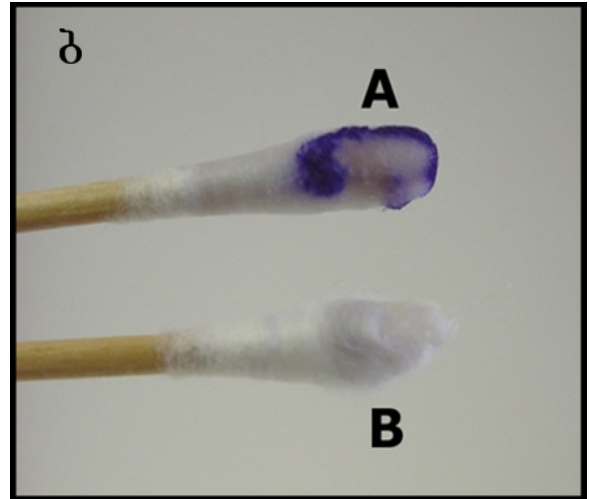
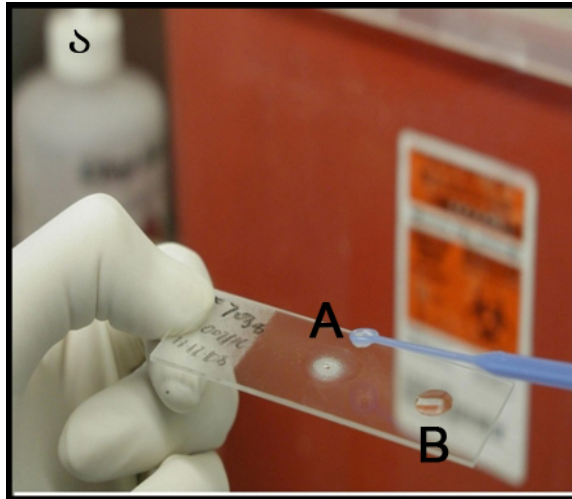


სურათი 13. გრამის წესით შეღებილი ბრუცელები.  
ა) *Brucella abortus*, ბ) *Brucella melitensis*

#### 4.3.3 ბიოქიმიური თვისებები

ბრუცელას სახეობების იდენტიფიკაციისთვის შევისწავლეთ გამოყოფილი იზოლატების ბიოქიმიური თვისებები. რის შედეგადაც ყველა იზოლატი ოქსიდაზა

და კატალაზა დადებითი და TSI (Triple Sugar Iron Agar – რკინის სამშაქრიანი აგარი) უარყოფითი აღმოჩნდა, რაც ტიპურია ბრუცელას კულტურებისთვის. 13 იზოლატიდან 4 აღმოჩნდა ურეაზა უარყოფითი, ხოლო გოგირდწყალბადი (H<sub>2</sub>S) გამოიმუშავა ყველა კულტურამ. სადებავების მიმართ მგრძობელობის განსაზღვრის მიზნით, გამოვიყენეთ შემდეგი განზავების 1: 25 000, 1: 50 000 და 1: 100 000-იანი ფუძე ფუქსინის და თიონინის ნიადაგები (ცხრილი 31; სურ. 14).



სურათი 14. ბრუცელას იზოლატების ბიოქიმიური თვისებები: ა) კატალაზა ტესტი: A-კატალაზა დადებითი - 534 (20), B. *melitensis* (შეინიშნება აირის ბუმტუკები); B-კატალაზა უარყოფითი ATCC - *Streptococcus pyogenes* (ბუმტუკები არ წარმოიქმნა); ბ)

ოქსიდაზა ტესტი: A-ოქსიდაზა დადებითი - 534 (20), *B. melitensis* (ლურჯი-იასამნისფერი); B-ოქსიდაზა უარყოფითი - ATCC - *E. coli* (ფერის ცვლილება არ აღინიშნება); გ) ზრდა ფუქსინზე: 534 (20), *B. melitensis*; A - 1:25000; B - 1:50000; დ) ზრდა თიონინზე: 534 (20), *B. melitensis* A - 1:25000; B - 1:50000; ე) გოგირდწყალბადის გამომუშავება: ე1- უარყოფითი კონტროლი (ATCC - *E. coli*) - ზოლის შეფერილობა არ შეცვლილა; ე2 - დადებითი კონტროლი (ATCC - *Salmonella typhimurium*) და (ბოლო სამი სინჯარა) დადებითი კულტურები (#E10-00096/03-906; E10-00094/03-904 და E10-00110/03-920) - აღინიშნა ზოლის გაშავება, რაც მიუთითებს, რომ სამივე კულტურა გამოიმუშავებს გოგირდწყალბადს. ეს სურათი ასევე გვიჩვენებს (TSI) შაქრების მეტაბოლიზმს. სურათიდან ჩანს, რომ შაქრების ფერმენტაცია არ ხდება, რადგან ნიადაგის ფერი უცვლელია (წითელი); ვ) ურეაზა ტესტი: A- დადებითი შედეგი - 534 (20), *B. melitensis* (ნიადაგის შეფერვა ვარდისფრად), B - უარყოფითი შედეგი - *E. coli* (ნიადაგი ფერის ცვლილების გარეშე - ყვითელი).

**შენიშვნა:** მე-14 სურათზე ნაჩვენებია მხოლოდ ორი განზავების (1:25000; 1:50000) საღებავიან ნიადაგებზე ზრდის შედეგები, რადგან *B. melitensis* და *B. abortus*-ის სახეობებს 1:50000 და 1:100000 განზავების ნიადაგებზე იდენტური ზრდა ახასიათებთ.

**აგლუტინაცია ბრუცელას პოლიკლონურ შრატთან და აკრიფლავინთან.**  
გამოყოფილი 13 იზოლატიდან ბრუცელას დადებით პოლიკლონურ შრატთან ურთიერთქმედებით 8 იზოლატმა მოგვცა დადებითი, ხოლო 5-მა უარყოფითი შედეგი. აკრიფლავინთან ურთიერთქმედებით ყველა იზოლატი ერთგვაროვანი იყო (გლუვი კოლონიის ტიპის) (ცხრილი 31).



ცხრილი 31. *Brucella spp.* იზოლატების ლაბორატორიული ტესტირების შედეგები

შტამის დასახელება	გამოყოფის წყარო	გრამის წესით შედეგა	ოქსიდაზა	კატალაზა	H <sub>2</sub> S	TSI	ურეაზა	თიონინი			ფუქსინი			აგლუტინაცია ბრუცელას ბოლიკლონურ შრატთან	აგლუტინაცია აკრიფლაგინთან
								1:25 000	1:50 000	1:100 000	1:25 000	1:50 000	1:100 000		
<i>Brucella spp</i> #5 E10-00096/03-906	ძროხის რძე	გრამუარყოფითი მსხვილი კოკობაცილები.	+	+	+	-	-	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	-	-
<i>Brucella spp.</i> #19 E10-00110/03-920	ძროხის რძე	გრამუარყოფითი მსხვილი კოკობაცილები.	+	+	+	-	-	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	-	-
<i>B. abortus</i> # 11 E10-00102/03-912	ძროხის რძე	გრამუარყოფითი მსხვილი კოკობაცილები.	+	+	+	-	++	-	-	+	+	+(-)	-	+	-
<i>B. abortus</i> E10-00532/03-983	ძროხის რძე	გრამუარყოფითი მსხვილი კოკობაცილები	+	+	+	-	++	+(-)	-	+(-)	+	+	+	+	-
<i>B. abortus</i> # 3 E10-00094/03-904	ძროხის რძე	გრამუარყოფითი მსხვილი კოკობაცილები	+	+	+	-	++	+	+(-)	-	+	+	-	+(-)	-
<i>B. abortus</i> # 17 E10-00108/03-918	ძროხის რძე	გრამუარყოფითი მსხვილი კოკობაცილები	+	+	+	-	++	+(-)	+(-)	+	+	+	+	+	-
<i>B. abortus</i> # 1 E10-00092/03-902	ძროხის რძე	გრამუარყოფითი მსხვილი კოკობაცილები	+	+	+	-	++	*	*	+	*	*	+	+	-
<i>B. melitensis</i> #20 (534)	ცხვრის რძე	გრამუარყოფითი წვრილი	+	+	+	-	++	*	*	+	*	*	+	+	-

შტამის დასახელება	გამოყოფის წყარო	გრამის წესით შეღებვა	ოქსიდაზა	კატალაზა	H <sub>2</sub> S	TSI	ურეაზა	თიონინი			ფუქსინი			აგლუტინაცია ბრუცელას პოლიკლონურ შრატთან	აგლუტინაცია აკრიფლავინთან
								1:25 000	1:50 000	1:100 000	1:25 000	1:50 000	1:100 000		
		კოკობაცილები.													
<i>B. melitensis</i> #44 (552)	ცხვრის რძე	გრამუარყოფითი წვრილი კოკობაცილები.	+	+	+	-	++	*	*	+	*	*	+	+	-
<i>Brucella spp.</i> E10-00118/03-928/MR (#3)	ძროხის ყბისქვეშა ლიმფური ჯირკვალი	გრამუარყოფითი მსხვილი კოკობაცილები	+	+	++	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-
<i>Brucella spp.</i> E10-00136/03-946/MR (#21)	ძროხის ყბისქვეშა ლიმფური ჯირკვალი	გრამუარყოფითი მსხვილი კოკობაცილები	+	+	++	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-
<i>Brucella spp.</i> E10-00140/03-950/MR (#25)	ძროხის ყბისქვეშა ლიმფური ჯირკვალი	გრამუარყოფითი მსხვილი კოკობაცილები	+	+	++	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-
<i>B. melitensis</i> 11E-01804/02-1050/MR (#6)	ცხვრის რძე	გრამუარყოფითი წვრილი კოკობაცილები	+	+	-(+)	-	++	-	+(-)	+	-	+	+	+	-

შენიშვნა: E1000140/03-950/MR (#25) – თიონინზე და ფუქსინზე ზრდასთან ერთად გამოიწვია ნიადაგის ფერის შეცვლა ყვითელ ფერში და ლიზისი. ასევე არატიპიური ზრდა აღინიშნა *Brucella spp.* E10-00096/03-906 (#5) და *Brucella spp.* E10-00110/03-920 (#19) კულტურების შემთხვევაშიც ლორწოვანი დიდი კოლონიების სახით. \* – ტესტი არ გაკეთდა.

#### 4.4 ანტიბიოტიკომგრძობელობის განსაზღვრა

გამოვიკვლიეთ მიღებული კულტურების ანტიბიოტიკებისადმი მგრძობელობა. ანტიბიოტიკების სია შერჩეული იყო ჯანდაცვის სამინისტროს, ჯანმრთელობის დაცვის მსოფლიო ორგანიზაციის (WHO) გაიდლაინის და ამერიკელი კოლაბორატორის ფილიპ ელზერის რეკომენდაციის საფუძველზე (Philip H. Elzer, Department of Veterinary Science, LSU AgCenter, Baton Rouge, LA 70803, USA). მიღებულ შედეგებს ვაფასებდით CLSI/NCCLS (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2009) სტანდარტის შეფასების ზონების მიხედვით (ცხრილი 5, 32, 33).

ცხრილი 32. ცხოველური ნიმუშებიდან გამოყოფილი ბრუცელას შტამების ანტიბიოტიკომგრძობელობის შედეგები

#	შტამის საიდენტიფიკაციო ნომერი	სახეობები	გამოყოფის წყარო	ანტიბიოტიკის დისკები													
				პენიცილინი (10 აგ)	კანამიცინი (30 აგ)	რიფამპინი (5 აგ)	გენტამიცინი (10 აგ)	ცეფოტოქსიმინი (5 აგ)	სტრეპტომიცინი (10 აგ)	ტეტრაციკლინი (30 აგ)	ერთრომიცინი (15 აგ)	ტრიმეტოპრიმიდოქსოლი (1.25/23.75 აგ)	დოქსიციკლინი (30 აგ)	ქლორამფენიკოლი (30 აგ)	ტობრამიცინი (10 აგ)	ოფლოქსაცინი (5 აგ)	
1	534 (20)	<i>Brucella melitensis</i>	ცხვრის რძე	R	S	S	S	S	S	S	S	I	R	*	S	S	S
2	552 (44)	<i>Brucella melitensis</i>	ცხვრის რძე	R	I	I	S	S	S	S	R	R	*	S	S	S	
3	E10-00092/03-902 (#1)	<i>Brucella abortus</i>	ძროხის რძე	R	R	I	R	S	R	S	I	R	*	R	R	S	
4	E10-00094/03-904 (#3)	<i>Brucella abortus</i>	ძროხის რძე	R	R	R	R	S	R	S	I	R	*	R	R	S	
5	E10-00096/03-906 (#5)	<i>Brucella spp.</i>	ძროხის რძე	I	I	R	S	I	R	R	I	R	*	R	R	nd	
6	E10-00102/03-912 (#11)	<i>Brucella abortus</i>	ძროხის რძე	R	R	R	R	S	R	S	I	R	*	I	R	S	
7	E10-00108/03-918 (#17)	<i>Brucella abortus</i>	ძროხის რძე	R	R	R	R	S	R	S	I	R	*	R	R	S	
8	E10-00110/03-920 (#19)	<i>Brucella spp.</i>	ძროხის რძე	I	S	R	R	I	R	R	S	R	*	R	R	R	
9	E10-00532/03-983	<i>Brucella abortus</i>	ძროხის რძე	R	I	R	S	I	-	S	R	R	*	R	R	S	

#	შტამის საიდენტიფიკაციო ნომერი	სახეობები	გამოყოფის წყარო	ანტიბიოტიკის დისკები												
				პენიცილინი (10 ug)	კანამიცინი (30 ug)	რიფამპიცინი (5 ug)	გენტამიცინი (10 ug)	ცეფოტაქსიმი (5 ug)	სტრეპტომიცინი (10 ug)	ტეტრაციკლინი (30 ug)	ერითრომიცინი (15 ug)	ტრიმეტროპრიმიდოლი (1.25/23.75 mg)	დოქსიციკლინი (30 ug)	ქლორამფენიკოლი (30 ug)	ტობრამიცინი (10 ug)	ოფლოქსაცინი (5 ug)
10	11E-01804/02-1050/MR (#6)	<i>Brucella melitensis</i>	ცხვრის რძე	R	I	S	S	S	S	S	I	S	S	S	I	S
11	E10-00118/03-928/MR (#3)	<i>Brucella spp.</i>	ძროხის ყბისქვეშა ლიმფური ჯირკვავალი	R	S	S	S	S	S	S	I	R	S	S	S	S
12	E10-00136/03-946/MR (#21)	<i>Brucella spp.</i>	ძროხის ყბისქვეშა ლიმფური ჯირკვავალი	R	S	S	S	S	S	S	I	R	S	S	S	S
13	E10-00140/03-950/MR (#25)	<i>Brucella spp.</i>	ძროხის ყბისქვეშა ლიმფური ჯირკვავალი	I	S	I	S	S	R	I	S	R	S	S	S	S

შენიშვნა: S - მგრძობიარე;  
 I - შუალედურ ზღვარზე;  
 R - რეზისტენტული;  
 \* - ტესტი არ გაკეთდა;

უნდა აღინიშნოს, რომ ორმა კულტურამ (E10-00096/03-906 და E10-00096/03-920) გამოიწვია შოკოლადისებური ნიადაგის ფერის ცვლილება, რიგი ადგილები გაუფერულდა, ხოლო რიგ ადგილებში შეინიშნებოდა წითლად შეფერილი უბნები.

**ცხრილი 33. გამოყოფილი იზოლატების ანტიბიოტიკომგრძობელობის შესწავლის ჯამური მაჩვენებლები**

#	ანტიბიოტიკის დისკები	მგრძობიარე	შუალედურ ზღვარზე	რეზისტენტული
1	პენიცილინი (10 ug)	0	3	10
2	კანამიცინი (30 ug)	5	4	4
3	რიფამპიცინი (5 ug)	4	3	6
4	გენტამიცინი (10 ug)	8	0	5

#	ანტიბიოტიკის დისკები	მგრძნობიარე	შუალედურ ზღვარზე	რეზისტენტული
5	ციპროფლოქსაცინი (5 ug)	10	3	0
6	სტრეპტომიცინი (10 ug)	5	0	7
7	ტეტრაციკლინი (30 ug)	10	1	2
8	ერითრომიცინი (15 ug)	2	9	2
9	ტრიმეტროპრიმსულფო (1,25/23,75 ug)	1	0	12
10	დოქსიციკლინი (30 ug)	4	-	-
11	ქლორამფენიკოლი (30 ug)	6	1	6
12	ტობრამიცინი (10 ug)	5	1	7
13	ოფლოქსაცინი (5 ug)	11	0	1

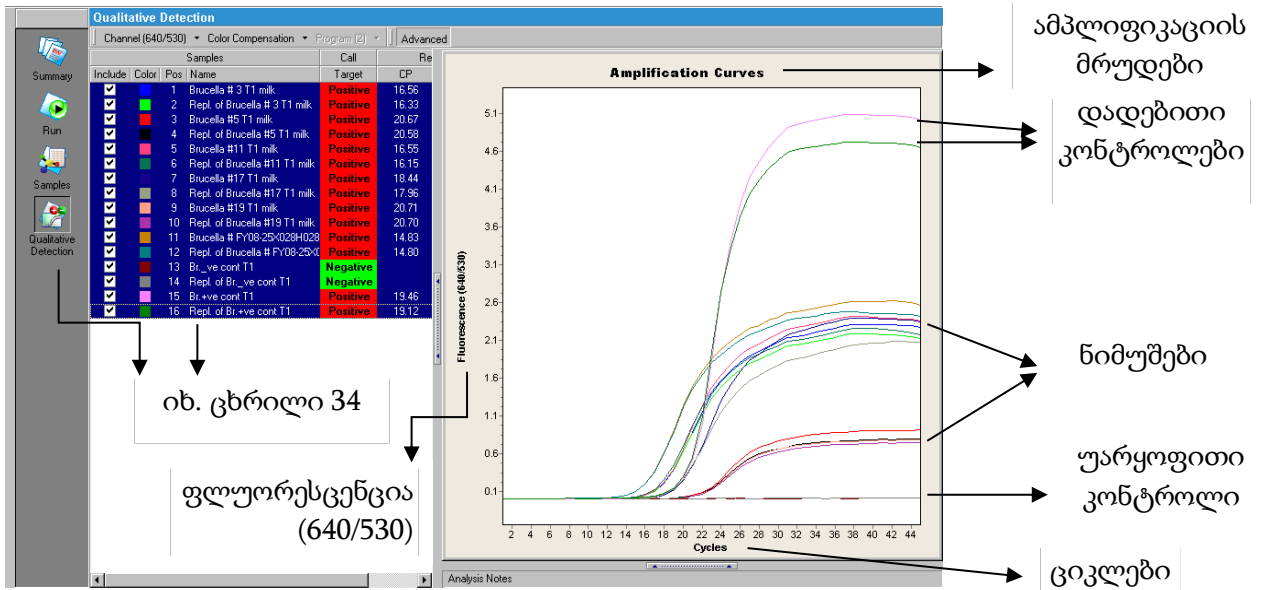
ჩვენს მიერ შესწავლილმა კულტურებმა მაქსიმალური მგრძნობელობა გამოავლინეს ციპროფლოქსაცინის, ტეტრაციკლინის, ოფლოქსაცინის და გენტამიცინის მიმართ, შუალედურ ზღვარზე აღმოჩნდნენ ძირითადად ერითრომიცინის მიმართ და რეზისტენტობა უმეტეს შემთხვევებში დაფიქსირდა პენიცილინის, სტრეპტომიცინის, ტრიმეტროპრიმსულფოს და ტობრამიცინის მიმართ. თუმცა აღსანიშნავია, რომ რეზისტენტობის ტენდენცია გამოვლინდა ძირითადად *B. abortus*-ის და *Brucella spp.* შტამებს შორის ბრუცელოზის სამკურნალო პრეპარატებიდან უმეტესად რიფამპიცინის, გენტამიცინის, სტრეპტომიცინის, ქლორამფენიკოლის და ტობრამიცინის მიმართ (ცხრილი 29, 30).

**შენიშვნა:** არასრული მონაცემებია დოქსიციკლინის მიმართ მგრძნობელობის შესახებ ანტიბიოტიკის დისკების არასაკმარისი რაოდენობის გამო.

#### 4.5 გამოყოფილ *B. melitensis* კულტურათა მოლეკულურ-გენეტიკური დახასიათება

##### 4.5.1 პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქცია რეალურ დროში (*real-time PCR*)

იმის დასადასტურებლად, რომ პათოლოგიური მასალიდან ჩვენს მიერ გამოყოფილი 13 იზოლატი გენეტიკურად ნამდვილად მიეკუთვნებოდა ბრუცელას გვარს, მათგან გამოყოფილი დნმ-ები გამოვიკვლიეთ პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქციით რეალურ დროში (*real-time PCR*, Idaho Techn., Inc. Target 1 (T1)).



სურათი 15. Light Cycler 2.0 აპარატზე შესრულებული ბრუცელას სადიაგნოსტიკო PCR რეალურ დროში შედეგების ვიზუალიზაცია (Idaho Technology/BioFire Diagnostics Inc., Brucella,T1): შედეგების ხარისხობრივი ანალიზის მენიუ და ამპლიფიკაციის მრუდები. სურათის მარჯვენა მხარეს ნაჩვენებია ბრუცელას კულტურების ამპლიფიცირებული დნმ-ების მრუდების გრაფიკული გამოსახულება.

მიღებულმა შედეგებმა უჩვენა, რომ ყველა იზოლატი ბრუცელას გვარს ეკუთვნოდა (სურ. 15). თუმცა, აღსანიშნავია, რომ 5 კულტურის დეტექციისას (E10-00096/03-906 (#5); E10-00110/03-920 (#19); E10-00118/03-928/MR (#3); E10-00136/03-946/MR (#21); E10-00140/03-950/MR (#25)) მათი ამპლიფიკაციის მრუდები სხვა შტამებთან შედარებით გვიან ფაზებში ჩნდებოდა (ცხრილი 35).

ცხრილი 34. Light Cycler 2.0 აპარატზე შესრულებული real-time PCR შედეგების ხარისხობრივი ანალიზის მენიუს თარგმანი

რეზიუმე	ხარისხობრივი დეტექცია					
	არხი (640/530)					
რეაქციის გაშვება	ნიმუშები			აპარატის მიერ მინიჭებული შედეგი	დეტექციის ზღურბლი	
	დამატება	ფერი	პოზიცია			დასახელება
ნიმუშები	<input checked="" type="checkbox"/>	■	1.	Brucella # 3 T1 რძე	დადებითი	16.56
	<input checked="" type="checkbox"/>	■	2.	Repl. of Brucella #3 T1 რძე	დადებითი	16.33
ხარის-	<input checked="" type="checkbox"/>	■	3.	Brucella #5 T1 რძე	დადებითი	20.67
	<input checked="" type="checkbox"/>	■	4.	Repl. of Brucella #5 T1 რძე	დადებითი	20.58

ხოზრივი დეტექცია	<input checked="" type="checkbox"/>	<span style="color: red;">■</span>	5.	Brucella #11 T1 რძე	დადებითი	16.55
	<input checked="" type="checkbox"/>	<span style="color: green;">■</span>	6.	Repl. of Brucella #11 T1 რძე	დადებითი	16.15
	<input checked="" type="checkbox"/>	<span style="color: purple;">■</span>	7.	Brucella #17 T1 რძე	დადებითი	18.44
	<input checked="" type="checkbox"/>	<span style="color: grey;">■</span>	8.	Repl. of Brucella #17 T1 რძე	დადებითი	17.96
	<input checked="" type="checkbox"/>	<span style="color: pink;">■</span>	9.	Brucella #19 T1 რძე	დადებითი	20.71
	<input checked="" type="checkbox"/>	<span style="color: magenta;">■</span>	10.	Repl. of Brucella #19 T1 რძე	დადებითი	20.70
	<input checked="" type="checkbox"/>	<span style="color: orange;">■</span>	11.	Brucella # FY08-25X028H028	დადებითი	14.83
	<input checked="" type="checkbox"/>	<span style="color: blue;">■</span>	12.	Repl. of Brucella #FY08-25X0	დადებითი	14.80
	<input checked="" type="checkbox"/>	<span style="color: red;">■</span>	13.	Br. - კონტროლი T1	უარყოფითი	
	<input checked="" type="checkbox"/>	<span style="color: blue;">■</span>	14.	Repl. of Br. - კონტროლი T1	უარყოფითი	
	<input checked="" type="checkbox"/>	<span style="color: magenta;">■</span>	15.	Br. + კონტროლი T1	დადებითი	19.46
	<input checked="" type="checkbox"/>	<span style="color: green;">■</span>	16.	Repl. of Br. + კონტროლი T1	დადებითი	19.12

**შენიშვნა:** ცხრილში მოცემულია რამდენიმე ძროხის რძიდან გამოყოფილი კულტურების სია ადამიანის კლინიკური ნიმუშიდან გამოყოფილ ერთ კულტურასთან ერთად, თავისი დადებითი და უარყოფითი კონტროლებით დუბლიკატებში.

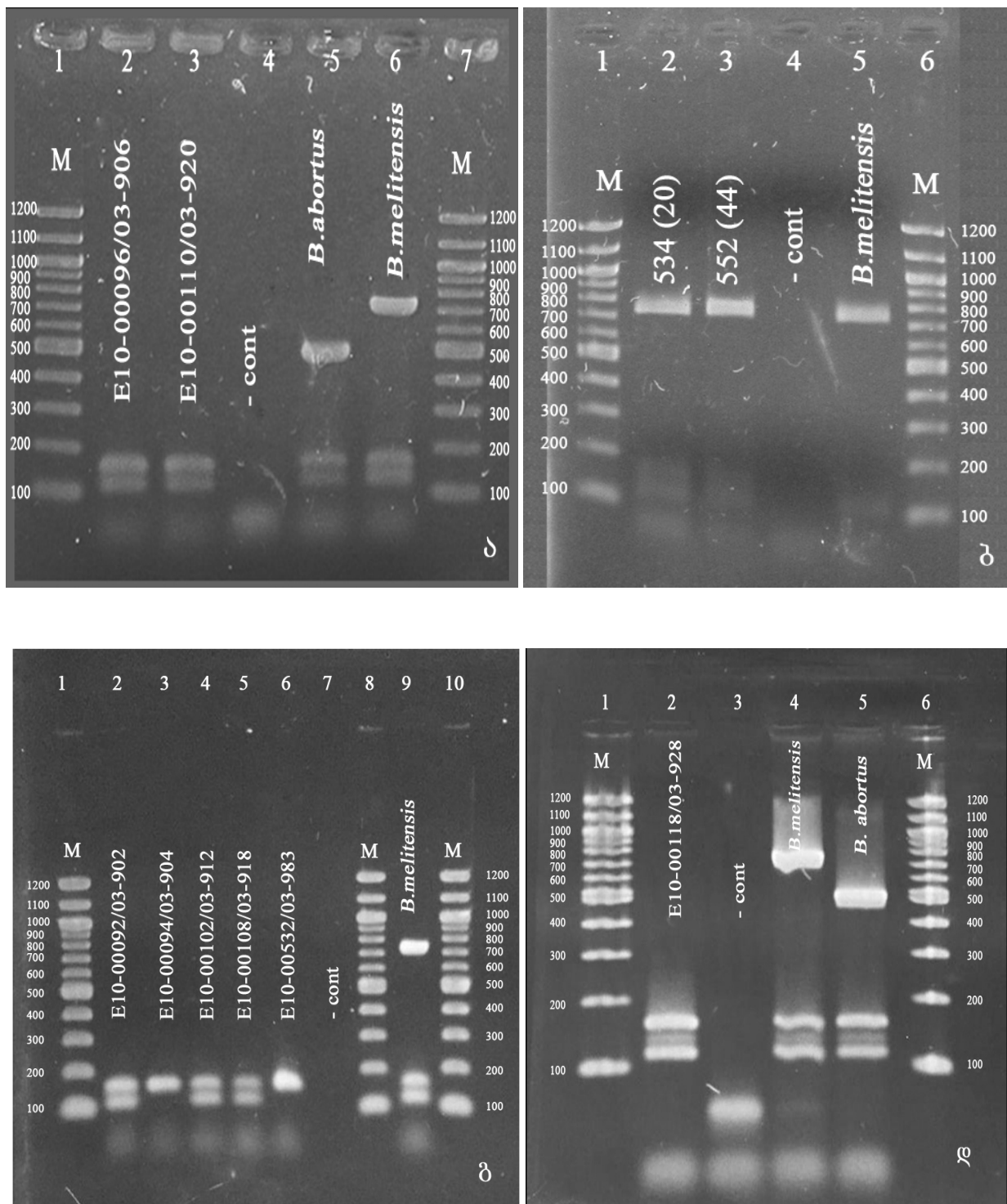
### ცხრილი 35. real-time PCR დეტექციის ზღურბლის (CP) მაჩვენებლები

#	შტამის საიდენტიფიკაციო ნომერი	შედეგი	real-time PCR (CP)
1	534 (20)	<i>Brucella spp.</i>	14
2	552 (44)	<i>Brucella spp.</i>	15
3	E10-00092/03-902 (#1)	<i>Brucella spp.</i>	16
4	E10-00094/03-904 (#3)	<i>Brucella spp.</i>	15
5	E10-00096/03-906 (#5)	<i>Brucella spp.</i>	20
6	E10-00102/03-912 (#11)	<i>Brucella spp.</i>	16
7	E10-00108/03-918 (#17)	<i>Brucella spp.</i>	18
8	E10-00110/03-920 (#19)	<i>Brucella spp.</i>	20
9	E10-00532/03-983	<i>Brucella spp.</i>	15
10	11E-01804/02-1050/MR (#6)	<i>Brucella spp.</i>	13
11	E10-00118/03-928/MR (#3)	<i>Brucella spp.</i>	30
12	E10-00136/03-946/MR (#21)	<i>Brucella spp.</i>	35
13	E10-00140/03-950/MR (#25)	<i>Brucella spp.</i>	20

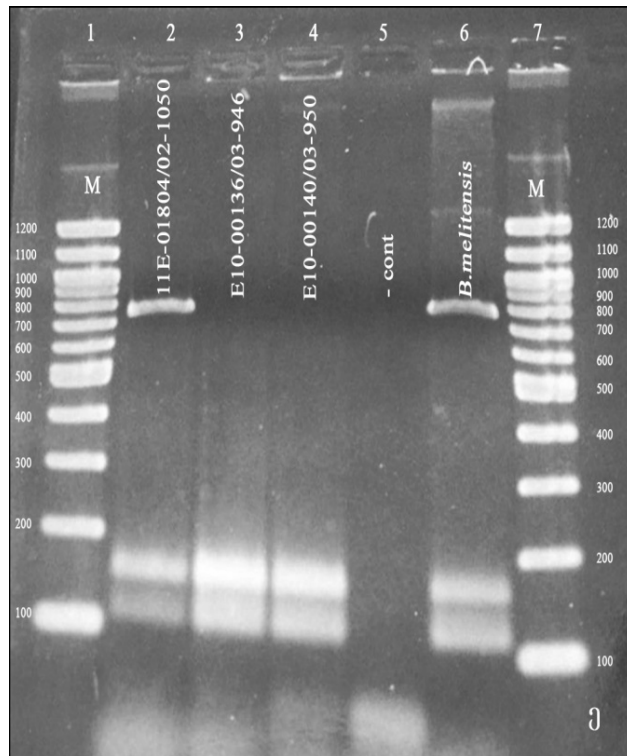
#### 4.5.2 AMOS PCR

მიღებული იზოლატების სახეობრივი დიფერენციაციის მიზნით, ყველა შტამის დნმ შევისწავლეთ AMOS PCR-ით. მიღებული 13 კულტურიდან მხოლოდ 3 კულტურა დატიპირდა როგორც *B. melitensis*-ის სახეობა, ხოლო დანარჩენი 10

კულტურის დნმ არ ამპლიფიცირდა AMOS PCR-ის შეზღუდვების გამო (მისი საშუალებით შესაძლებელია მხოლოდ *B. abortus* 1, 2 და 4 ბიოვარების, *B. melitensis* - სამივე ბიოვარის, *B. ovis* და *B. suis* 1 ბიოვარის დადგენა) (სურ. 16 ).







სურათი 16. ბრუცელას 13 შტამის AMOS-PCR-ის შედეგები. *B. melitensis*-ის დადასტურებული შტამები (სურ.16-ბ მე-2, მე-3 ზოლი და სურ.16-ე მე-2 ზოლი). დანარჩენი ამპლიფიცირებული ნიმუშები მიეკუთვნება *B. melitensis*-ის და *B. abortus*-ის დადებით კონტროლებს; 10 შტამის დნმ არ ამპლიფიცირდა. M - მოლეკულური წონის 100bp მარკერი (NEB).

#### 4.5.3 ერთ-ნუკლეოტიდური პოლიმორფიზმი (SNP)

როგორც უკვე აღვნიშნეთ, AMOS PCR-ის გარკვეული შეზღუდვების გამო, ბრუცელას ყველა იზოლატის ტიპირება ვერ მოხერხდა. ამიტომ, ვივარაუდეთ, რომ არაამპლიფიცირებული შტამები შესაძლოა ბრუცელას სახეობების რომელიმე სხვა ბიოვარი ყოფილიყო.

ჩვენი მოსაზრების დასადასტურებლად, SNP მეთოდით შევისწავლეთ ჩვენს მიერ გამოყოფილი ბრუცელას 13 შტამის და 2 რეფერენს (სავაქცინე *B. ovis* და *B. abortus S19*) შტამის დნმ და ასევე GG-17 პროექტის („ბრუცელოზის კლინიკური, ეპიდემიოლოგიური და ლაბორატორიული შეფასება საქართველოში“) ფარგლებში სოფლის მეურნეობის სამინისტროს ლაბორატორიის მიერ გამოყოფილი და AMOS-PCR-ით დადასტურებული *B. melitensis*-ის 8 კულტურა, რომლებიც არ იყო შესწავლილი SNP მეთოდის საშუალებით (ცხრილი 36).

**ცხრილი 36. ცხოველური ნიმუშებიდან სოფლის მეურნეობის სამინისტროს  
ლაბორატორიის მიერ გამოყოფილი *Brucella melitensis*-ის შტამები**

#	შტამის საიდენტიფიკაციო ნომერი	გამოყოფის წყარო	გეოგრაფიული წარმომავლობა	შედეგი (AMOS PCR, SNP)
1	#5 GG17-KKS0187m	ცხვრის რძე	ქვემო ქართლი, მარნეული, ერტეესის დასახლება	<i>Brucella melitensis</i>
2	#6 GG17-KKS0211-m	ცხვრის რძე	ქვემო ქართლი, მარნეული, ერტეესის დასახლება	<i>Brucella melitensis</i>
3	#15/#6 GG17KK.sh. 0211b (2)	ცხვრის სისხლი	ქვემო ქართლი, მარნეული, ერტეესის დასახლება	<i>Brucella melitensis</i>
4	#18 GG17K.K.S.0694m	ცხვრის რძე	ქვემო ქართლი, მარნეული, ლაგლუჯა	<i>Brucella melitensis</i>
5	#19 GG17K.K.B.0790m	ძროხის რძე	ქვემო ქართლი, ბოლნისი, სავანეთი	<i>Brucella melitensis</i>
6	#20 GG17K.K.B.0521m	ძროხის რძე	ქვემო ქართლი, გარდაბანი, კუმისი	<i>Brucella melitensis</i>
7	#25 GG-17K.K.S.0841-m	ცხვრის რძე	ქვემო ქართლი, მარნეული, მარნეული	<i>Brucella melitensis</i>
8	#31 GG-17K.G.1271-b	თხის სისხლი	კახეთი, საგარეჯო, კაკაბეთი	<i>Brucella melitensis</i>

აღნიშნული მეთოდით მიღებულმა შედეგებმა დაადასტურა ჩვენი მონაცემები და მოსაზრებები. კერძოდ, AMOS PCR-ით გამოვლენილი *B. melitensis* შტამების დნმ-ის SNP პროფილი შეესაბამებოდა აღნიშნული სახეობის საკონტროლო დნმ-ის პროფილს, ხოლო AMOS PCR-ით დაუტიპირებელი ხუთი შტამის დნმ-ის SNP პროფილი საკონტროლო *B. abortus*-ის სახეობის პროფილის იდენტური აღმოჩნდა. სამწუხაროდ, SNP მეთოდით ვერ მოხერხდა დარჩენილი ხუთი შტამის (E10-00096/03-906 (#5); E10-00110/03-920 (#19); E10-00118/03-928/MR (#3); E10-00136/03-946/MR (#21); E10-00140/03-950/MR (#25)) ტიპირება, რომლებიც შემდგომში, ქ. სიდამონიძის მიერ სრული გენომური სექვენირების მეთოდით იდენტიფიცირებული იქნა, როგორც *Ochrobactrum* გვარის წარმომადგენლები (ცხრილი 38, 37).

**ცხრილი 37. AMOS PCR-ით და SNP მეთოდით დატიპირებული ცხოველური ნიმუშებიდან გამოყოფილი *Brucella spp.* შტამები**

#	შტამის საიდენტიფიკაციო ნომერი	გამოყოფის წყარო	გეოგრაფიული წარმომავლობა	ტიპირების შედეგი	
				AMOS PCR	SNP
1	534 (20)	ცხვრის რძე	ქვემო ქართლი მარნეული, ერტეესის დასახლება	<i>Brucella melitensis</i>	<i>Brucella melitensis</i>

#	შტამის საიდენტიფიკაციო ნომერი	გამოყოფის წყარო	გეოგრაფიული წარმომავლობა	ტიპირების შედეგი	
				AMOS PCR	SNP
2	552 (44)	ცხვრის რძე	ქვემო ქართლი მარნეული, ერტევის დასახლება	<i>Brucella melitensis</i>	<i>Brucella melitensis</i>
3	E10-00092/03-902 (#1)	ძროხის რძე	მცხეთა-მთიანეთი დუშეთი, შუახევის ფერმერული მეურნეობა	-	<i>Brucella abortus</i>
4	E10-00094/03-904 (#3)	ძროხის რძე	მცხეთა-მთიანეთი დუშეთი, შუახევის ფერმერული მეურნეობა	-	<i>Brucella abortus</i>
5	E10-00102/03-912 (#11)	ძროხის რძე	მცხეთა-მთიანეთი დუშეთი, შუახევის ფერმერული მეურნეობა	-	<i>Brucella abortus</i>
6	E10-00108/03-918 (#17)	ძროხის რძე	მცხეთა-მთიანეთი დუშეთი, შუახევის ფერმერული მეურნეობა	-	<i>Brucella abortus</i>
7	E10-00532/03-983	ძროხის რძე	თბილისი ვაკე-საბურთალო, სოფ. თხინვალა	-	<i>Brucella abortus</i>
8	11E-01804/02-1050/MR (#6)	ცხვრის რძე	ქვემო ქართლი მარნეული, სოფ. სადახლო	<i>Brucella melitensis</i>	<i>Brucella melitensis</i>
9	#5, GG17-KKS0187m	ცხვრის რძე	ქვემო ქართლი, მარნეული, ერტევის დასახლება	<i>Brucella melitensis</i>	<i>Brucella melitensis</i>
10	#6, GG17-KKS0211-m	ცხვრის რძე	ქვემო ქართლი, მარნეული, ერტევის დასახლება	<i>Brucella melitensis</i>	<i>Brucella melitensis</i>
11	#15/#6 GG17 KK.sh. 0211b (2)	ცხვრის სისხლი	ქვემო ქართლი, მარნეული, ერტევის დასახლება	<i>Brucella melitensis</i>	<i>Brucella melitensis</i>
12	#18 GG17K.K.S.0694m	ცხვრის რძე	ქვემო ქართლი, მარნეული, ლაგლუჯა	<i>Brucella melitensis</i>	<i>Brucella melitensis</i>
13	#19 GG17K.K.B.0790m	ძროხის რძე	ქვემო ქართლი, ბოლნისი, სავანეთი	<i>Brucella melitensis</i>	<i>Brucella melitensis</i>
14	#20 GG17K.K.B.0521m	ძროხის რძე	ქვემო ქართლი, გარდაბანი, კუმისი	<i>Brucella melitensis</i>	<i>Brucella melitensis</i>
15	#25 GG-17K.K.S.0841-m	ცხვრის რძე	ქვემო ქართლი, მარნეული, მარნეული	<i>Brucella melitensis</i>	<i>Brucella melitensis</i>
16	#31 GG-17K.G.1271-b	თხის სისხლი	კახეთი, საგარეჯო, კაკაბეთი	<i>Brucella melitensis</i>	<i>Brucella melitensis</i>
17	#5 E10-00096/03-906	ძროხის რძე	მცხეთა-მთიანეთი დუშეთი, შუახევის ფერმერული მეურნეობა	-	-
18	#19 E10-00110/03-920	ძროხის რძე	მცხეთა-მთიანეთი დუშეთი, შუახევის ფერმერული მეურნეობა	-	-
19	#3 E10-00118/03- 928/MR	ძროხის ყბისქვეშა ლიმფ. ჯირკვე.	მცხეთა-მთიანეთი დუშეთი, შუახევის ფერმერული მეურნეობა	-	-

#	შტამის საიდენტიფიკაციო ნომერი	გამოყოფის წყარო	გეოგრაფიული წარმომავლობა	ტიპირების შედეგი	
				AMOS PCR	SNP
20	#21 E10-00136/03- 946/MR	ძროხის ყბისქვეშა ლიმფ. ჯირკვე.	მცხეთა-მთიანეთი დუშეთი, შუახევის ფერმერული მეურნეობა	-	-
21	#25 E10-00140/03- 950/MR	ძროხის ყბისქვეშა ლიმფ. ჯირკვე.	მცხეთა-მთიანეთი დუშეთი, შუახევის ფერმერული მეურნეობა	-	-

ზემოთ აღწერილი მეთოდის მიხედვით ბრუცელას თითოეულ სახეობას შეესაბამება ბრუცელას 3 გენის (*glk*, *omp*, *trp*) 6 ლოკუსში ერთ-ნუკლეოტიდური პოლიმორფიზმის ალტერნატიული ვარიანტების გარკვეული კომბინაცია, რომელიც საერთოა ამ სახეობის ყველა ბიოვარისთვის. შესაბამისად, აღნიშნული SNP მეთოდით დავადასტურეთ საქართველოში მოცირკულირე ბრუცელას ორი სახეობა - *B. melitensis* და *B. abortus* (ცხრილი 38).

ცხრილი 38. SNP ტიპირების შედეგები

#	შტამის საიდენტიფიკაციო ნომერი	ერთ-ნუკლეოტიდური პოლიმორფიზმის (SNP) სპეციფიკური პრაიმერები						ცხოველი	ნიმუში	სახეობა
		gk196R-22 (gk-1344)	gk427R - 33 (gk-1557)	gk255R - 44 (gk-1403)	omp151F - 28 (omp25-3627)	omp239F - 40 (omp25-3715)	trp290R - 50 (trpE-2858)			
1	<i>B. ovis</i>	T	T	G	C	C	C			<i>B. ovis</i>
2	<i>B. abortus S19</i>	T	C	G	T	C	C			<i>B. ab S19</i>
3	#5 GG17KKS0187m	T	C	C	C	C	C	ცხვარი	რძე	<i>B. mel</i>
4	#6 GG17KKS0211m	T	C	C	C	C	C	ცხვარი	რძე	<i>B. mel</i>
5	#15/#6 GG17KK.sh. 0211b(2)	T	C	C	C	C	C	ცხვარი	სისხლი	<i>B. mel</i>
6	#18 GG17K.K.S.0694m	T	C	C	C	C	C	ცხვარი	რძე	<i>B. mel</i>
7	#19 GG17K.K.B.0790m	T	C	C	C	C	C	ძროხა	რძე	<i>B. mel</i>
8	#20 GG17K.K.B.0521m	T	C	C	C	C	C	ძროხა	რძე	<i>B. mel</i>
9	#25 GG-17K.K.S.0841-m	T	C	C	C	C	C	ცხვარი	რძე	<i>B. mel</i>
10	#31 GG-17K.G.1271-b	T	C	C	C	C	C	თხა	სისხლი	<i>B. mel</i>
11	MR 534 (20)	T	C	C	C	C	C	ცხვარი	რძე	<i>B. mel</i>
12	MR 552 (44)	T	C	C	C	C	C	ცხვარი	რძე	<i>B. mel</i>
13	#1 E10 00092/03-902	T	C	G	T	C	C	ძროხა	რძე	<i>B. ab</i>
14	#2 E10 00532/03-983	T	C	G	T	C	C	ძროხა	რძე	<i>B. ab</i>
15	#3 E10 00094/03-904	T	C	G	T	C	C	ძროხა	რძე	<i>B. ab</i>
16	#6 E11—1804/02-1050	T	C	C	C	C	C	ცხვარი	რძე	<i>B. mel</i>
17	#11 E10 00102/03-912	T	C	G	T	C	C	ძროხა	რძე	<i>B. ab</i>
18	#17 E10 00108/03-918	T	C	G	T	C	C	ძროხა	რძე	<i>B. ab</i>
19	#5 E10-00096/03-906	-	-	-	-	-	-	ძროხა	რძე	<i>B. spp.</i>
20	#19 E10-00110/03-920	-	-	-	-	-	-	ძროხა	რძე	<i>B. spp.</i>
21	#3 E10-00118/03-928/MR	-	-	-	-	-	-	ძროხა	ლიმფ. ჯირკვ.	<i>B. spp.</i>
22	#21 E10-00136/03-946/MR	-	-	-	-	-	-	ძროხა	ლიმფ. ჯირკვ.	<i>B. spp.</i>
23	#25 E10-00140/03-950/MR	-	-	-	-	-	-	ძროხა	ლიმფ. ჯირკვ.	<i>B. spp.</i>

შენიშვნა: შედეგების ინტერპრეტაციას ვახდენდით ცხრილი 15 და 16-ის მიხედვით.

#### 4.5.4 მრავლობითი ლოკუსების ტანდემურად განმეორებადი თანმიმდევრობების ცვლადი რაოდენობის ანალიზი (MLVA-8)

კვლევის შემდგომ ეტაპზე, გამოყოფილი ბრუცელას შტამების სახეობებს შიგნით არსებული შესაძლო განსხვავებების გამოვლენის და ქვეჯგუფებად კლასიფიკაციის მიზნით, გამოვიყენეთ დნმ-ის მრავლობითი ლოკუსების ტანდემურად განმეორებადი თანმიმდევრობების ცვლადი რაოდენობის MLVA-8 (Multiple Locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis) ანალიზი. აღნიშნული ტესტისთვის შევარჩიეთ 8 მინისატელიტური, ნაკლებვარიაბელური სამიზნე უბანი (ცხრილი 17) (Huyhn et al; 2008). მისი საშუალებით დავახასიათეთ პროექტის ფარგლებში გამოყოფილი 11 *B. melitensis* და 5 *B. abortus* შტამი, სადაც კონტროლებად გამოვიყენეთ *B. ovis* და *B. abortus S19* დნმ-ები (ცხრილი 39).

ცხრილი 39. მულტიპლექსური MLVA-8 ტიპირების შედეგები

#	შტამის საიდენტიფიკაციო ნომერი	MLVA-8 ტიპირების სპეციფიკური მარკერები								გამოყოფის წყარო	საკვლევი მასალა	სახეობა	ტიპირების შედეგი	
		M3	M7	M14	M16	M20	M21	M25	M28				AMOS	SNP
1	<i>B. ovis</i>	354	320	124	217	441	98	473	200	-	-	<i>B. ovis</i>	<i>B. ovis</i>	<i>B. ovis</i>
2	<i>B. abortus</i> S19	362	316	115	241	441	105	473	184	ძროხა	რძე	<i>B. ab</i> S19	-	<i>B. ab</i> S19
3	#5 GG17-KKS0187m	330	316	124	225	441	105	503	192	ცხვარი	რძე	<i>B. mel</i>	<i>B. mel</i>	<i>B. mel</i>
4	#6 GG17-KKS0211-m	330	316	124	225	441	105	508	208	ცხვარი	რძე	<i>B. mel</i>	<i>B. mel</i>	<i>B. mel</i>
5	#15/#6 GG17 KK.sh. 0211b(2)	338	316	124	241	441	105	473	192	ცხვარი	სისხლი	<i>B. mel</i>	<i>B. mel</i>	<i>B. mel</i>
6	#18 GG17K.K.S.0694m	354	316	124	225	452	105	488	208	ცხვარი	რძე	<i>B. mel</i>	<i>B. mel</i>	<i>B. mel</i>
7	#19 GG17K.K.B.0790m	338	316	124	225	441	105	508	200	ძროხა	რძე	<i>B. mel</i>	<i>B. mel</i>	<i>B. mel</i>
8	#20 GG17K.K.B.0521m	338	316	124	225	441	105	508	200	ძროხა	რძე	<i>B. mel</i>	<i>B. mel</i>	<i>B. mel</i>
9	#25 GG-17K.K.S.0841-m	330	316	124	225	441	105	508	208	ცხვარი	რძე	<i>B. mel</i>	<i>B. mel</i>	<i>B. mel</i>
10	#31 GG-17K.G.1271-b	330	316	124	225	441	105	493	192	თხა	სისხლი	<i>B. mel</i>	<i>B. mel</i>	<i>B. mel</i>
11	MR 534 (20)	330	316	124	225	441	105	503	192	ცხვარი	რძე	<i>B. mel</i>	<i>B. mel</i>	<i>B. mel</i>
12	MR 552 (44)	330	316	124	225	441	105	508	208	ცხვარი	რძე	<i>B. mel</i>	<i>B. mel</i>	<i>B. mel</i>
13	#1 E10 00092/03-902	354	316	124	241	441	105	478	208	ძროხა	რძე	<i>B. ab</i>	-	<i>B. ab</i>
14	#2 E10 00532/03-983	338	316	124	241	441	105	478	192	ძროხა	რძე	<i>B. ab</i>	-	<i>B. ab</i>
15	#3 E10 00094/03- 904	354	316	124	241	441	105	478	216	ძროხა	რძე	<i>B. ab</i>	-	<i>B. ab</i>
16	#6 E11—1804/02-050	330	316	124	225	441	105	508	208	ცხვარი	რძე	<i>B. mel</i>	<i>B. mel</i>	<i>B. mel</i>
17	#11 E10 00102/03-912	354	316	124	241	441	105	478	208	ძროხა	რძე	<i>B. ab</i>	-	<i>B. ab</i>
18	#17 E10 00108/03-918	354	316	124	241	441	105	478	208	ძროხა	რძე	<i>B. ab</i>	-	<i>B. ab</i>

ცხრილიდან ჩანს, რომ ჩვენს მიერ შესწავლილი შტამების M3 ლოკუსში ფრაგმენტის ზომა მერყეობდა 330-354 bp ნუკლეოტიდურ წყვილს შორის, სადაც ერთი (VNTR) ტანდემური განმეორება 8 bp ნუკლეოტიდურ წყვილს შეადგენდა. M3 მარკერის მიხედვით შტამებს შორის ორი სხვადასხვა ზომის ალელი გამოიკვეთა (330 bp და 338 bp), რომლებიც არ იმეორებდა არცერთი საკონტროლო შტამის ალელის ზომას (354 bp და 362 bp), ხოლო *B. abortus* S19 საკონტროლო შტამის ალელის ზომა (362 bp) საერთოდ არ დაფიქსირდა ქართულ შტამებში. M7 მარკერზე ყველა შტამმა იდენტური ზომის პროდუქტი აჩვენა – 316 bp ნუკლეოტიდური წყვილი, რომელიც *B. abortus* S19 საკონტროლო შტამის ალელის ზომის (316 bp) იდენტური იყო, სადაც ერთი ტანდემური განმეორება შედგებოდა 8 bp ზომის ნუკლეოტიდური თანმიმდევრობისგან. M14 მარკერზე ყველა შესწავლილმა შტამმა გაიმეორა *B. ovis* საკონტროლო შტამის ალელის იდენტური ზომა 124 bp ნუკლეოტიდური წყვილი, სადაც ერთი ტანდემური განმეორება 8 bp ნუკლეოტიდური წყვილი იყო, ხოლო *B. abortus* S19 საკონტროლო შტამის ალელის ზომა არ დაფიქსირდა (115 bp). M16 ლოკუსში – VNTR-ის ზომა მერყეობდა 225-241 bp ნუკლეოტიდურ წყვილს შორის, სადაც ერთი ტანდემური განმეორება 8 bp ნუკლეოტიდურ წყვილს შეადგენდა. გამოიკვეთა ერთი ალელი (225 bp), რომელიც არ იმეორებდა რეფერალური შტამების ზომებს (217 bp და 241 bp), ხოლო *B. ovis* სავაქცინე შტამის ზომა (217 bp) არ დაფიქსირებულა. M20 მარკერის მიხედვით ყველა შტამის ალელის ზომა შეადგენდა 441 bp ნუკლეოტიდურ წყვილს, გარდა ერთი შტამის ალელისა, რომლის ზომაც 452 bp ნუკლეოტიდური წყვილი იყო და არ იმეორებდა არცერთი რეფერალური შტამის ზომას (441 bp), ხოლო ერთი ტანდემური განმეორების ზომა 11 bp ნუკლეოტიდური წყვილი იყო. M21 ლოკუსში – VNTR-ის ზომა შეადგენდა 105 bp ნუკლეოტიდურ წყვილს, სადაც ერთი ტანდემური განმეორების ზომა 5 bp ნუკლეოტიდური წყვილი იყო, ხოლო *B. ovis* საკონტროლო შტამის ზომა საერთოდ არ დაფიქსირდა (98 bp). M25 ლოკუსში – VNTR-ის ზომა მერყეობდა 473-508 bp ნუკლეოტიდურ წყვილს შორის, სადაც ერთი ტანდემური განმეორების ზომა 5 bp ნუკლეოტიდურ წყვილს შეადგენდა. M25 მარკერის მიხედვით შტამებს შორის რამდენიმე ალელი გამოიკვეთა (478 bp, 488 bp, 493 bp 503 bp და 508 bp), რომელთა ზომებიც არ იმეორებდა საკონტროლო შტამების ზომას (473 bp). M28 ლოკუსში – VNTR-ის ზომა მერყეობდა



192-216 bp ნუკლეოტიდურ წყვილს შორის, სადაც ერთი ტანდემური განმეორების ზომა 8 bp ნუკლეოტიდური წყვილი იყო. M28 მარკერის მიხედვითაც შტამებს შორის რამდენიმე სხვადასხვა ზომის ალელი მივიღეთ (192 bp, 208 bp და 216 bp), რომელთა ზომაც არ იმეორებდა არცერთი საკონტროლო შტამის ზომას (184 bp და 200 bp), ხოლო *B. abortus S19* საკონტროლო შტამის ზომა საერთოდ არ დაფიქსირდა (184 bp). ჩვენი შედეგების მიხედვით მარკერები M3, M25 და M28 შედარებით ვარიაბელური აღმოჩნდა, რომლებმაც სხვა მარკერებისგან განსხვავებით უფრო მრავალფეროვანი გენოტიპები მოგვცა (ცხრილი 39).

#### 4.5.5 საქართველოში გამოყოფილი *Brucella spp.* შტამების MLVA-8 ტიპირების დენდროგრამა

მიღებული მონაცემების საფუძველზე კომპიუტერული პროგრამის BioNumerics (version 6.1, Applied Maths) მეშვეობით ავაგეთ დენდროგრამა, რომლის ანალიზიც საშუალებას გვაძლევს წარმოდგენა ვიქონიოთ ქვეყანაში გავრცელებული ბრუცელას გენოტიპებზე (სურ. 17).

# MLVA-8

Brucella MVLA 8 Brucella MVLA 8

MV3	MV7	MV14	MV16	MV20	MV21	MV25	MV28	ნიმუშის #	სახეობა	AMOS PCR	SNP	წყარო / ცხოველი	წყარო / მასალა	რეგიონი	რაიონი	სოფელი
354	316	124	225	452	105	488	208	#18 GG17K.K.S.06.	B. mel	B. mel	B. mel	ცხვარი	რძე	ქვ. ქართლი	მარნეული	ლაგლუჯა
354	320	124	217	441	98	473	200	Br.Ovis	B. ovis	B. ovis	B. ovis	-	-	-	-	-
354	316	124	241	441	105	478	208	#1. E10 00092/03	B. ab	B. ab	B. ab	ძროხა	რძე	მცხ.-მთიანეთი	დუშეთი	შუახევი
354	316	124	241	441	105	478	208	#11 E10 00102/03.	B. ab	B. ab	B. ab	ძროხა	რძე	მცხ.-მთიანეთი	დუშეთი	შუახევი
354	316	124	241	441	105	478	208	#17 E10 00108/03.	B. ab	B. ab	B. ab	ძროხა	რძე	მცხ.-მთიანეთი	დუშეთი	შუახევი
354	316	124	241	441	105	478	216	#3. E10 00094/03-	B. ab	B. ab	B. ab	ძროხა	რძე	მცხ.-მთიანეთი	დუშეთი	შუახევი
338	316	124	241	441	105	473	192	#15/#6 GG17 KK.s.	B. mel	B. mel	B. mel	ცხვარი	სისხლი	ქვ. ქართლი	მარნეული	რტს დასახლება
338	316	124	241	441	105	478	192	#2 E10 00532/03-	B. ab	B. ab	B. ab	ძროხა	რძე	თბილისი	ვაკე-საბურთ.	თხინვალი
362	316	115	241	441	105	473	184	Br.Abortus S19	B. ab S19	No amp.	B. ab S19	ძროხა	რძე	-	-	-
330	316	124	225	441	105	503	192	#5, GG17-KKS018.	B. mel	B. mel	B. mel	ცხვარი	რძე	ქვ. ქართლი	მარნეული	რტს დასახლება
330	316	124	225	441	105	503	192	MR 534 (20)	B. mel	B. mel	B. mel	ცხვარი	რძე	ქვ. ქართლი	მარნეული	რტს დასახლება
330	316	124	225	441	105	493	192	#31 GG-17K.G.127.	B. mel	B. mel	B. mel	თხა	სისხლი	კახეთი	საგარეჯო	კაკაბეთი
338	316	124	225	441	105	508	200	#19 GG17K.K.B.07.	B. mel	B. mel	B. mel	ძროხა	რძე	ქვ. ქართლი	ბოლნისი	სავანეთი
338	316	124	225	441	105	508	200	#20 GG17K.K.B.05.	B. mel	B. mel	B. mel	ძროხა	რძე	ქვ. ქართლი	გარდაბანი	კუმისი
330	316	124	225	441	105	508	208	#25 GG-17K.K.S.0.	B. mel	B. mel	B. mel	ცხვარი	რძე	ქვ. ქართლი	მარნეული	მარნეული
330	316	124	225	441	105	508	208	#6 E11—1804/02-	B. mel	B. mel	B. mel	ცხვარი	რძე	ქვ. ქართლი	მარნეული	სადახლო
330	316	124	225	441	105	508	208	#6, GG17-KKS021.	B. mel	B. mel	B. mel	ცხვარი	რძე	ქვ. ქართლი	მარნეული	რტს დასახლება
330	316	124	225	441	105	508	208	MR 552 (44)	B. mel	B. mel	B. mel	ცხვარი	რძე	ქვ. ქართლი	მარნეული	რტს დასახლება

სურათი 17. საქართველოში გამოყოფილი *Brucella spp.* შტამების MLVA-8 ტიპირების დენდროგრამა

როგორც MLVA-8 ტიპირების დენდროგრამიდან ჩანს, ძირითადად მივიღეთ ორი დიდი განშტოება, რომელთაგან ერთი ძირითადად მოიცავს *B. abortus*-ის, ხოლო მეორე *B. melitensis*-ის შტამებს. თუმცა, აქვე შეინიშნება *B. melitensis*-ის ორი გამონაკლისი (#15 GG17 KK.sh. 0211b (2) და #18 GG17K.K.S.0694m), რომლებიც *B. abortus*-ის ჯგუფში მოხვდნენ. ამასთანავე, *B. abortus* და *B. melitensis*-ის ჯგუფები თავის მხრივ 9 მცირე, 2-4 შტამის შემცველ, ქვეჯგუფად დაიყო. გამოყოფილი კულტურების უმრავლესობა იყო ქვემო ქართლიდან და მცხეთა-მთიანეთიდან და თითო-თითო შტამი გამოიყო თბილისიდან და კახეთიდან. პირველ განშტოებაში *B. ovis*-ის რეფერალურ შტამთან დაწყვილდა მარნეულის რ-ნის, სოფ. ლაგლუჯადან ცხვრის რძიდან გამოყოფილი *B. melitensis*-ის შტამი, შემდეგ განშტოებაში, ერთად მოთავსდა დუშეთის რ-ნის, შუახევის ფერმერული მეურნეობიდან ძროხის რძიდან გამოყოფილი 3 *B. abortus*-ის შტამი. ამავე მეურნეობიდან გამოყოფილი ერთი შტამი მხოლოდ M28 მარკერის შედეგით განსხვავდებოდა დანარჩენი *B. abortus*-ის 3 შტამისგან. მე-4 განშტოებაში დაწყვილდა ქვემო ქართლიდან და თბილისიდან ცხვრის სისხლიდან გამოყოფილი *B. melitensis*-ის და ვაკე-საბურთალოს რ-ნის, სოფ. თხინვალადან ძროხის რძიდან გამოყოფილი *B. abortus*-ის შტამები, რომლებიც ახლოს დგას ცალკე მდგომ *B. abortus* S19 რეფერალურ შტამთან. შემდეგ განშტოებაში, ერთად მოთავსდა მარნეულის რ-ნის, ერტეესის დასახლებიდან ცხვრის რძიდან გამოყოფილი *B. melitensis*-ის 2 შტამი, რომელიც ახლოს აღმოჩნდა ცალკე მდგომ საგარეჯოს რ-ნის, სოფ. კაკაბეთში თხის სისხლიდან გამოყოფილ *B. melitensis*-ის შტამთან, რომელიც ერთი M25 მარკერით განსხვავდებოდა მის წინ არსებული განშტოების შტამებისგან. მე-8 განშტოებაში ერთად მოთავსდა ქვემო ქართლის რეგიონის, ბოლნისის რ-ნის სოფ. სავანეთში ძროხის რძიდან გამოყოფილი *B. melitensis* და გარდაბნის რ-ნის, სოფ. კუმისში ძროხის რძიდან გამოყოფილი *B. melitensis*-ის შტამები და ბოლო მე-9 განშტოებაში დაწყვილდა მარნეულის რ-ნის, ერტეესის დასახლებაში და სოფ. სადახლოში, ცხვრის რძიდან გამოყოფილი *B. melitensis*-ის 4 შტამი, რომლებიც ყველა 8 მარკერის მიხედვით იდენტური აღმოჩნდა. უნდა აღინიშნოს, რომ აღნიშნულ რეგიონებში ძირითადად ცირკულირებს *B. melitensis* და *B. abortus*-ის შტამები. ცალკე მდგომი შტამების არსებობა კი მიუთითებს იმაზე, რომ საქართველოში მოცირკულირე ბრუცელას იზოლატები გენეტიკურად საკმაოდ მრავალფეროვანია და ამ მრავალფეროვნების უკეთ აღწერისთვის საჭიროა

უფრო ფართომასშტაბიანი კვლევების ჩატარება. მეტი რაოდენობის ნიმუშის არსებობის შემთხვევაში შესაძლებელი იქნებოდა ცალკე მდგომი განშტოებების დაწყვილება სხვა მსგავს შტამებთან. ამდენად, მიღებული სურათი სრულად არ მოიცავს საქართველოში გავრცელებული შტამების მრავალფეროვნებას, რადგან შეზღუდული შესაძლებლობების გამო ნიმუშები ძირითადად შეგროვდა აღმოსავლეთ საქართველოს მხოლოდ ზოგიერთი რეგიონიდან.

აქვე უნდა აღინიშნოს, რომ დაუტიპირებელი შტამები საჭიროებენ კვლევის უფრო ღრმა მეთოდებით შესწავლას, მათი შემდგომი იდენტიფიკაციისა და გენეტიკური დახასიათებისთვის.

## 5. მიღებული შედეგების განხილვა

ჩვენი კვლევის ფარგლებში საქართველოს სხვადასხვა რეგიონებიდან შეგროვებული წვრილფეხა და მსხვილფეხა რქოსანი პირუტყვის ნიმუშები გამოვიკვლიეთ ბრუცელოზის დიაგნოსტიკისთვის რეკომენდებული პრაქტიკულად ყველა მეთოდით.

როზ-ბენგალის ტესტის შედეგებმა გვიჩვენა, რომ ბრუცელოზით სავარაუდოდ დაავადებულია გამოკვლეულ ცხოველთა 19.07%, მათ შორის 22.17% მსხვილფეხა რქოსანი და 13.74% წვრილფეხა რქოსანი პირუტყვი. საქართველოს რეგიონებში ბრუცელოზით ინფიცირების რისკის შესაფასებლად ჩატარდა როზ-ბენგალის ტესტით მიღებული მონაცემების სტატისტიკური ანალიზი, რის შედეგადაც მსხვილფეხა პირუტყვის ავადობის ყველაზე მაღალი სიხშირე გამოვლინდა მცხეთა-მთიანეთში (OR=2,64; CI – 1,63-4,43) და კახეთში (OR=2,17; CI – 1,10-4,28), ხოლო წვრილფეხა პირუტყვისა თბილისის მუნიციპალიტეტში (OR=12,53; CI – 2,39-65,58), ქვემო ქართლში (OR=6,17; CI – 1,43-26,64) და სამცხე-ჯავახეთში (OR=1.65; CI – 0,29-9,40). შეგროვებული მასალის არასაკმარისი რაოდენობის გამო გარკვეული რეგიონების მონაცემები ანალიზს არ დაექვემდებარა.

როზ-ბენგალის ტესტით მიღებული შედეგების დადასტურების მიზნით ცხვრის შრატები (n=33) გამოვიკვლიეთ კონკურენტული იმუნოფერმენტული ანალიზით (C-ELISA) და ფლუორესცენტული პოლარიზაციის რეაქციით (FPA), რომლებიც წარმოადგენენ საკონფირმაციო ტესტებს. აღნიშნული კვლევით დადასტურდა როზ-ბენგალის ტესტის მიერ დადებითად შეფასებული 22 შრატის შედეგი, ხოლო როზ-ბენგალის მიხედვით 11 საექვო პასუხი შეფასდა როგორც უარყოფითი.

აღსანიშნავია, რომ ჩვენი კვლევის ერთ-ერთ ამოცანას წარმოადგენდა აგლუტინაციის დაჩქარებული რეაქციის ეფექტურობის შეფასება. ამ მიზნით ზემოაღნიშნული საკონფირმაციო ტესტებით გამოკვლეული აღნიშნული 33 ცხვრის შრატი ასევე შევისწავლეთ აგლუტინაციის დაჩქარებული რეაქციით, რომლის შედეგები აღმოჩნდა საკონფირმაციო ტესტების იდენტური (22 დადებითი, 11 უარყოფითი). გარდა ამისა, აგლუტინაციის დაჩქარებული რეაქციით ასევე

გამოვიკვლიეთ მხოლოდ როზ-ბენგალის ტესტით დადებითი სისხლის შრატები. ამ შემთხვევაშიც მივიღეთ როზ-ბენგალის ტესტის იდენტური შედეგები. აღსანიშნავია, რომ როზ-ბენგალის ტესტისგან განსხვავებით აგლუტინაციის დაჩქარებული რეაქცია გვამღვეს ტიტრის განსაზღვრის საშუალებას.

აგლუტინაციის დაჩქარებული რეაქციით მიღებული სადიაგნოსტიკო ტიტრის შეფასების და გადამოწმების მიზნით წვრილფეხა რქოსანი პირუტყვის (20 ცხვარი) შრატი ასევე შევისწავლეთ პრაქტიკაში უკვე აპრობირებული სინჯარული აგლუტინაციის (რაიტის) რეაქციით. ამ უკანასკნელმაც დაადასტურა აგლუტინაციის დაჩქარებული რეაქციით მიღებული სადიაგნოსტიკო ტიტრების სარწმუნოება.

ყოველივე ზემოაღნიშნულის გათვალისწინებით შეიძლება დავასკვნათ, რომ აგლუტინაციის დაჩქარებული რეაქცია სანდო და მარტივად შესასრულებელი ტესტია. ის რაიტის რეაქციასთან შედარებით (24 სთ) არსებითად ამცირებს კვლევისთვის საჭირო დროს (5-6 წთ) და ამასთანავე როზ-ბენგალის ტესტისგან განსხვავებით იძლევა არა მხოლოდ ხარისხობრივი (დადებითი, უარყოფითი), არამედ რაოდენობრივი (ტიტრი) შეფასების საშუალებას. აგლუტინაციის დაჩქარებული რეაქცია საჭიროების შემთხვევაში შესაძლოა გამოყენებული იქნას როგორც როზ-ბენგალის ტესტის, ისე რაიტის რეაქციის ნაცვლად. ასევე აღსანიშნავია, რომ აგლუტინაციის დაჩქარებული რეაქციის დიაგნოსტიკუმის დამზადება შესაძლებელია საქართველოში, რაც იმპორტირებულ კომერციულ დიაგნოსტიკუმებთან შედარებით მნიშვნელოვნად შეამცირებს გამოკვლევის ხარჯებს.

ბრუცელას პათოგენის შესწავლის მიზნით სეროლოგიურად დადებითი და შემთხვევითი პრინციპით შერჩეული მსხვილფეხა და წვრილფეხა რქოსანი პირუტყვის პათოლოგიური მასალიდან ((n=405) რძე, სისხლი, ლიმფური ჯირკვალი, ვაგინალური ნაცხი) გამოყოფილი იქნა მორფოლოგიურად ბრუცელების მსგავსი 13 იზოლატი. ამათგან, 5 წარმოადგენდა *B. abortus*-ის სახეობას, 3 – *B. melitensis*, ხოლო 5 კულტურის სახეობის იდენტიფიკაცია ვერ მოხერხდა (*Brucella spp.*).

კვლევის პროცესში იზოლირებული 13 შტამის იდენტიფიკაციის მიზნით თავდაპირველად შევისწავლეთ გამოყოფილი კულტურების მორფოლოგიური და ბიოქიმიური თვისებები, რასაც მოყვა შედეგების დადასტურება პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქციით რეალურ დროში (real-time PCR). მიღებული შედეგები იზოლატების არაერთგვაროვნებაზე მსჯელობის საფუძველს არ იძლეოდა. კვლევა

გაგრძელდა AMOS-PCR (*A-abortus*, *M-melitensis*, *O-ovis*, *S-suis*) მეთოდით, რომელიც შტამების სახეობრივი დიფერენციაციის გარკვეულ შესაძლებლობებს ქმნის. ამ მეთოდით მოხერხდა 3 იზოლატის მიკუთვნება *B. melitensis* სახეობისათვის. კვლევის მეთოდის გარკვეული შეზღუდვების გამო ყველა იზოლატის იდენტიფიკაცია ვერ მოხერხდა (მისი საშუალებით შესაძლებელია მხოლოდ *B. abortus* 1, 2 და 4 ბიოვარების, *B. melitensis* – სამივე ბიოვარის, *B. ovis* და *B. suis* 1 ბიოვარის დადგენა). იზოლატების შემდგომი სახეობრივი იდენტიფიკაციის მიზნით 13-ივე იზოლატი შესწავლილ იქნა ერთ-ნუკლეოტიდური პოლიმორფიზმით (SNP) და კვლევაში ჩართული იყო ასევე GG-17 პროექტის („ბრუცელოზის კლინიკური, ეპიდემიოლოგიური და ლაბორატორიული შეფასება საქართველოში“) ფარგლებში სოფლის მეურნეობის სამინისტროს ლაბორატორიის მიერ გამოყოფილი და AMOS-PCR-ით დადასტურებული *B. melitensis*-ის 8 კულტურის დნმ, რომლებიც არ იყო შესწავლილი SNP მეთოდის საშუალებით. მიღებულმა შედეგებმა დაადასტურა AMOS-PCR-ით გამოვლენილი *B. melitensis* შტამების სახეობრივი კუთვნილება, ხოლო AMOS-PCR-ით არაამპლიფიცირებადი 10 შტამიდან 5 შტამის დნმ-ის SNP პროფილი საკონტროლო *B. abortus*-ის სახეობის პროფილის იდენტური აღმოჩნდა. შეიძლება ვივარაუდოთ, რომ აღნიშნული უკანასკნელი 5 კულტურა (AMOS-PCR-ით არაამპლიფიცირებადი და SNP მეთოდით ტიპირებული) მიეკუთვნება *B. abortus*-ის 3, 5, 6 ან 9 ბიოვარებს.

*Brucella* spp. 5 კულტურა, რომლებიც AMOS PCR და SNP მეთოდებით ტიპირებას არ დაექვემდებარა, დანარჩენთაგან მეტ-ნაკლებად განსხვავდებოდა მორფოლოგიური (შედარებით მსხვილი, ტლანქი კოკო-ბაცილები), კულტურალური (შედარებით დიდი ზომის, ლორწოვანი კოლონიები), სეროლოგიური (აგლუტინაციის არარსებობა ბრუცელას დადებით პოლიკლონურ შრატთან) თვისებებით. შემდგომმა მოლეკულურ-გენეტიკურმა შესწავლამ (სრული გენომური სექვენირების მეთოდი) გამოავლინა, რომ აღნიშნული კულტურები მიეკუთვნებოდა *Ochrobactrum*-ის გვარს.

ჩვენს მიერ ჩატარებული მოლეკულურ-გენეტიკური კვლევის შედეგებზე დაყრდნობით შეიძლება ვივარაუდოთ, რომ საქართველოში უფრო ფართოდაა გავრცელებული *B. abortus*-ის 3, 5, 6 და/ან 9 ბიოვარები, ვიდრე 1, 2 და 4. აღსანიშნავია, რომ არსებულ ლიტერატურულ მონაცემებზე დაყრდნობით ჩვენს

მეზობელ ქვეყნებში (თურქეთი და რუსეთი), გამოყოფილი კულტურების უმრავლესობა *B. melitensis* და *B. abortus*-ის ბიოვარი-3-ია (სომხეთზე და აზერბაიჯანზე მონაცემები არ არის), რაც გვაფიქრებინებს, რომ შესაძლოა ჩვენს ქვეყანაშიც უფრო ცირკულირებს *B. abortus* ბიოვარი-3. ასევე შეიძლება ითქვას, რომ აღნიშნული AMOS PCR მეთოდის გამოყენება არამარტო ჩვენს ქვეყანაში, არამედ ჩვენს მეზობელ ქვეყნებშიც ლიმიტირებულია.

კვლევის შემდგომ ეტაპზე, გამოყოფილი ბრუცელას შტამების სახეობებს შიგნით არსებული შესაძლო განსხვავებების გამოვლენის და მრავალფეროვნების დადგენის მიზნით გამოვიყენეთ მრავლობითი ლოკუსების ტანდემურად განმეორებადი თანმიმდევრობების ცვლადი რაოდენობის MLVA-8 (Multiple Locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis) ანალიზი.

მიღებულ მონაცემთა ანალიზის შედეგად აგებული დენდროგრამა გვიჩვენებს, რომ ბრუცელას შტამები განლაგდა 2 დიდ განშტოებად – *B. melitensis* და *B. abortus*. ორივე შტო თავის მხრივ დაიყო ცხრა ქვეჯგუფად (5 – *B. abortus*, 4 – *B. melitensis*) და აქვე უნდა აღინიშნოს, რომ ორი ქვეჯგუფი წარმოდგენილი იყო *B. melitensis* და *B. abortus*-ის თითო შტამით.

ჩატარებული მოლეკულურ-გენეტიკური კვლევის შედეგებმა ცხადყო საქართველოს ტერიტორიაზე მოცირკულირე ბრუცელების მრავალფეროვნება და, ამავე დროს ამ მიმართულებით სრულმასშტაბიანი და თანამედროვე მეთოდოლოგიურ დონეზე ჩატარებული მოლეკულურ-ბიოლოგიური გამოკვლევების გაგრძელების აუცილებლობა.

და ბოლოს, აღსანიშნავია, რომ მსოფლიოში დღეისათვის ყველაზე აქტუალურია ანტიბიოტიკორეზისტენტობის საკითხი, რომელიც თავს იჩენს როგორც ადამიანის, ისე ვეტერინარულ მედიცინაშიც. ცხოველებში ანტიბიოტიკორეზისტენტობა კიდევ უფრო ნაკლებადაა შესწავლილი, ვიდრე ჯანდაცვის სფეროში. განსაკუთრებით ცოტა რამ არის ცნობილი ბრუცელას კულტურების ანტიბიოტიკებისადმი რეზისტენტობის შესახებ. გამომდინარე იქიდან, რომ ბრუცელოზი ზოონოზური დაავადებაა, შესაბამისად, ცხოველური ბრუცელას შტამები ცირკულირებს ადამიანშიც. ამ მიზნით კვლევის ფარგლებში შევისწავლეთ გამოყოფილი კულტურების ანტიბიოტიკომგრძობელობა. გამოკვლეულ შტამებს შორის რეზისტენტობა მეტ-ნაკლებად გამოვლინდა პენიცილინის, კანამიცილის,



ერიტრომიცინის, ტრიმეტროპრიმსულფოს, ოფლოქსაცინის, რიფამპიცინის, გენტამიცინის, სტრეპტომიცინის, ტეტრაციკლინის, ქლორამფენიკოლის და ტობრამიცინის მიმართ. მათგან განსაკუთრებით გასათვალისწინებელია ის ანტიბიოტიკები, რომლებიც ჯანმრთელობის მსოფლიო ორგანიზაციის მიერ მოწოდებულია ადამიანებში ბრუცელოზის სამკურნალოდ (რიფამპიცინი, გენტამიცინი, სტრეპტომიცინი, ტეტრაციკლინი, დოქსიციკლინი, ქლორამფენიკოლი და ტობრამიცინი). მიღებული შედეგების მიხედვით აღნიშნული ანტიბიოტიკების მიმართ რეზისტენტობა დაფიქსირდა *Brucella* spp. და *B. abortus*-ის სახეობებს შორის. როგორც აღვნიშნეთ *Brucella* spp. შემდგომი შესწავლის შედეგად აღმოჩნდა *Ochrobactrum*-ის გვარის წარმომადგენლები, რომლებიც ადამიანისთვის ჩვეულებრივ პირობებში არაპათოგენურ მიკროორგანიზმებს წარმოადგენენ. ამდენად, ყურადსაღებია *B. abortus*-ის სახეობების რეზისტენტობა აღნიშნული ანტიბიოტიკების მიმართ, რათა შემდგომში გათვალისწინებული იქნას მკურნალობის დროს სწორი და ეფექტური პრეპარატების შერჩევა. სასურველია გაგრძელდეს გამოყოფილი ბრუცელას კულტურების ანტიბიოტიკომგრძობელობის რუტინული შესწავლა შემდგომი მონიტორინგის მიზნით, რათა დროულად მოხდეს რეზისტენტობის აღმოჩენა და მათი გათვალისწინება სამკურნალო პრეპარატების შერჩევის დროს.

## 6. დასკვნები:

ჩატარებული კვლევის შედეგების ანალიზის საფუძველზე შეიძლება დავასკვნათ:

1. მოლეკულურ-გენეტიკურ დონეზე პირველად დადასტურდა, რომ საქართველოს ტერიტორიაზე ცირკულირებს *B. melitensis* და *B. abortus*-ის სახეობების შტამები.
2. ჩვენს მიერ ჩატარებული მოლეკულურ-გენეტიკური კვლევის შედეგებზე დაყრდნობით სავარაუდოა, რომ საქართველოში უფრო ფართოდაა გავრცელებული *B. abortus*-ის 3, 5, 6 და/ან 9 ბიოვარები, ვიდრე 1, 2 და 4. რის გამოც, AMOS PCR მეთოდის გამოყენება ჩვენს ქვეყანაში ლიმიტირებულია.
3. მრავლობითი ლოკუსების ტანდემურად განმეორებადი თანმიმდევრობების ცვლადი რაოდენობის (MLVA-8) ანალიზის გამოყენებით აგებულმა დენდროგრამამ გამოავლინა, რომ საქართველოში მოცირკულირე შტამები გენეტიკურად საკმაოდ მრავალფეროვანია.
4. ჩვენს მიერ ჩატარებული კვლევების შედეგად დადგინდა, რომ real-time PCR-ით (*Brucella* T1, Idaho Technology) ვერ ხერხდება გენეტიკურად ახლო მდგომი *Brucella*-ს და *Ochrobactrum*-ის გვარის წარმომადგენლების დიფერენცირება.
5. კვლევის ფარგლებში შემუშავებული აგლუტინაციის დაჩქარებული მოდიფიკაცია სანდო, სწრაფი და მარტივად შესასრულებელი ტესტია, რომელიც როზ-ბენგალის ტესტისგან განსხვავებით, იძლევა ანტისხეულების ტიტრის განსაზღვრის შესაძლებლობას. ამასთანავე, ის ხარჯთეფექტურია დიაგნოსტიკუმის ადგილზე დამზადების შესაძლებლობის გამო.
6. ჩვენი კვლევის ფარგლებში გამოყოფილი ბრუცელას შტამების ანტიბიოტიკომგრძობელობის შესწავლის შედეგად ბრუცელოზის სამკურნალო პრეპარატების მიმართ რეზისტენტობის ტენდენცია გამოვლინდა ძირითადად *B. abortus*-ის შტამებს შორის, რაც გასათვალისწინებელია სამკურნალო ანტიბიოტიკების შერჩევის დროს და მიუთითებს ანტიბიოტიკორეზისტენტობის რუტინული ეპიდზედამხედველობის საჭიროებაზე არამარტო ჯანდაცვის, არამედ ვეტერინარიის სექტორშიც.

## 7. პრაქტიკული რეკომენდაციები:

1. ბრუცელოზი საქართველოში წარმოადგენს ქვეყნის ეკონომიკის და ჯანმრთელობის დაცვის სამსახურების მნიშვნელოვან პრობლემას, რომლის გადასაწყვეტადაც აუცილებელია ამ დაავადების გაღრმავებული შესწავლის გაგრძელება, ყურადღების აქცენტირებით ეტიოლოგიისა და ეპიზოოტოლოგიის საკითხებზე.
2. ბრუცელოზის ლაბორატორიული დიაგნოსტიკისათვის მიზანშეწონილია გამოკვლევათა კომპლექსში აგლუტინაციის დაჩქარებული რეაქციის ჩართვა ნაკლები დანახარჯების და მოკლე დროში შესაძლებელი ანტისხეულების ტიტრის განსაზღვრის გამო, რომელიც რეკომენდებულია დაინერგოს საქართველოს რეგიონულ ვეტერინარულ დიაგნოსტიკურ ლაბორატორიებში.
3. ფლუორესცენტული პოლარიზაციის რეაქცია (FPA) ნაკლები დანახარჯების და მარტივი ტექნიკის გამო რეკომენდებულია დაინერგოს საქართველოს ყველა ზონალურ ვეტერინარულ დიაგნოსტიკურ ლაბორატორიაში.
4. ბრუცელების სახეობების იდენტიფიკაციისათვის ქვეყნის რეფერალურ ლაბორატორიებში სასურველია დაინერგოს ერთ-ნუკლეოტიდური პოლიმორფიზმი (SNP), როგორც სათანადარიგო მეთოდი.
5. რეკომენდებულია ჯანდაცვის და ვეტერინარიის რეფერალური ლაბორატორიების ყოველდღიური პრაქტიკის ნაწილი გახდეს მრავლობითი ლოკუსების ტანდემურად განმეორებადი თანმიმდევრობების ცვლადი რაოდენობის ანალიზი (MLVA), რათა საჭიროების შემთხვევაში, კერძოდ ბრუცელოზის ეპიზოოტიების ან ეპიდაფეთქებების დროს შესაძლებელი იყოს ინფექციის იდენტიფიკაცია, ინფექციის წყაროს და ინფექციის გავრცელების გზების სარწმუნო დადგენა.
6. ანტიბიოტიკორეზისტენტობის პრობლემის აქტუალობიდან გამომდინარე სასურველია ჩატარდეს ადამიანებიდან და ცხოველებიდან გამოყოფილი ბრუცელას კულტურების ანტიბიოტიკებისადმი მგრძობელობის უწყვეტი მონიტორინგი, განსაკუთრებით, ადამიანების სამკურნალოდ გამოყენებული პრეპარატების მიმართ.

## 8. ბიბლიოგრაფია

- ანთაძე, ვლადიმერი. *ბრუცელოზი, ეპიდემიოლოგიური ნარკვევი*. თბილისი: საქმედგამი, 1947.
- ბაბაკიშვილი, ჯემალი. თანაავტ. „ბრუცელოზი“ ცხოველთა ინფექციური დაავადებები. თბილისი: კაზადონი, 2005.
- ლომინეიშვილი, მურმან და გავაშელი, თამაზ. *ბრუცელოზი და მისი საწინააღმდეგო ღონისძიებები*. თბილისი, 2002.
- მარუაშვილი, გიორგი. *ბრუცელოზი*. თბილისი: საბჭ. საქართველო, 1983.
- ნავდარაშვილი, არჩილ. „ბრუცელოზის ეპიდემიოლოგიური მონიტორინგი საქართველოში“. დისერტაცია დოქტორის აკადემიური ხარისხის მოსაპოვებლად მედიცინაში, პ. შოთაძის სახელობის სამედიცინო აკადემია, 2008.
- ნათიძე, მერაბ თანაავტ. *კერძო სავეტერინარო მიკრობიოლოგია*. თბილისი: 2011.
- ნათიძე, მერაბ თანაავტ. *ბრუცელოზი*. თბილისი: 2014.
- Al Dahouk Sascha, Hofer Erwin, Tomaso Herbert, Vergnaud Gilles, Flèche Le Philippe, Cloeckaert Axel, Koylass Mark S., Whatmore Adrian M., Nöckler Karsten and Scholz Holger C. “Intraspecies Biodiversity of the Genetically Homologous Species *Brucella microti*”. Applied and Environmental Microbiology 78 (March 2012): 1534–1543 DOI:10.1128/AEM.06351-11.
- Al Dahouk Sascha, Sprague Lisa D. and Neubauer Heinrich. “New developments in the diagnostic procedures for zoonotic brucellosis in humans” Rev. sci. tech. Off. int. Epiz. 32,1 (April 2013): 177-188.
- Al Dahouk Sascha, Tomaso Herbert, Nöckler Karsten, Neubauer Heinrich and Frangoulidis Dimitrios. “Laboratory-based diagnosis of brucellosis – a review literature. Part II: serological tests for brucellosis”. Clin Lab. 49 (2003): 577–589.
- Alton G.G. “*Brucella melitensis*”. In *Animal Brucellosis*, eds. Nielsen K., Duncan J.R. (CRC Press. Boston, 1990), 383-409.
- Alton, G. G., Jones, L. M. and Pietz, D. E. *Laboratory techniques in brucellosis. Monogr. Ser. World Health Org.* 1975.
- Alton, G.G., Jones, L.M., Angus, R.D. and Verger, J.M. “Techniques for the brucellosis laboratory”. Institut National de la Recherche Agronomique, Paris, Cited in: J. Clin.

Microbiol. 33 (1988): 3198-3200.

Angus, RD., Barton, CE. "The production and evaluation of a buffered plate antigen for use in a presumptive test for brucellosis". Dev. Biol. Stand. 56 (1984): 349-56.

Anonymous. *FAO/OIE/WHO Animal Health Yearbook 1995-1997*, Rome, Italy: FAO Animal Production and Health Series, FAO, 1997.

Bahn P, Nockler K. "Validation of the fluorescence polarization assay (FPA) for the serological diagnosis of brucellosis". Berl Tierarztl Wochenschr. 118 (2005): 372-6.

Baily, G.G., Krahn, J.B., Drasar, B.S., Stoker, N.G. "Detection of *Brucella melitensis* and *B. abortus* by DNA amplification". J. Trop. Med. Hyg. 95 (Aug. 1992): 271-275.

Banai, Menachem and Corbel Michael J. "Taxonomy of *Brucella*". Open Vet Sci J. 4 (May 2010): 85-101. DOI: 10.2174/1874318801004010085.

Bang, B. "The etiology of epizootic abortion". J. Comp. Pathol. Ther. 10 (1897): 125-149. DOI:10.1016/S0368-1742(97)80014-8.

Baum, M., Zamir, O., Bergman-Rios, R., Katz, E., Beider, Z., Cohen, A and Banai, M. "Comparative evaluation test as supplementary diagnostic methods for brucellosis". J Clin Microbiol 33 (Aug. 1995): 2166-2170.

Bercovich, Z. "The use of skin delayed-type hypersensitivity as an adjunct test to diagnose brucellosis in cattle: a review". Vet Q. 22 (July 2000): 123-30.

Bercovich, Z., Haagsma, J., Van Lipzig J., *et al.* "Specificity of the skin delayed-type hypersensitivity test in brucellosis free cattle tested with a *Brucella* allergen". Zentralbl Veterinarmed B. 40 (1993): 582-8.

Blasco JM. "Control and Eradication Strategies for *Brucella melitensis* Infection in Sheep and Goats", Prilozi 31,1 (2010): 145-165.

Blasco, J.M., Garin-Bastuji, B., Marin, C.M., Gerbier, G., Fanlo, J., Jimenez de Bagues, M.P., Cau, C. "Efficacy of different rose bengal and complement of fixation antigens for the diagnosis of *Brucella melitensis* in sheep and goats". Vet. Rec., 134,16 (April 1994a): 415-420.

Blasco, J.M., Marin, C.M., Jimenez de Bagues, M.P., Barberan, M., Hernandez, A., Molina, L., Velasco, J., Diaz, R., Moriyon, I. "Evaluation of allergic and serological tests for diagnosis of *Brucella melitensis* Infection in sheep". J. Clin. Microbiol., 32, 8 (August 1994b): 1835-1840.

Bohlin, Jon, Snipen, Lars, Cloeckart, Axel, Lagesen, Karin, Ussery, David, Kristoffersen, Anja B. and Godfroid, Jacques. "Genomic comparisons of *Brucella* spp. and closely

- related bacteria using base compositional and proteome based methods". BMC Evol. Biol. 10 (Aug. 2010): 249. DOI: 10.1186/1471-2148-10-249.
- Brew, S.D., Perrett, L.L., Stack, J.A., MacMillan, A.P. and Staunton, N.J. "Human exposure to *Brucella* recovered from a sea mammal". Vet Rec 144 (April 1999): 483.
- Bricker Betsy J., Ewalt Darla R., Olsen Steven C. and Jensen Allen E. "Evaluation of the *Brucella abortus* species-specific polymerase chain reaction assay, an improved version of the *Brucella* AMOS polymerase chain reaction assay for cattle". J. vet. diagn. Invest. 15,4 (July 2003): 374–378.
- Bricker, Betsy J. "PCR as a diagnostic tool for brucellosis". Vet microbial. 90, 1-4 (Dec. 2002): 435-446. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(02\)00228-6](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(02)00228-6).
- Bricker, Betsy J. and Halling, Shirley M. "Differentiation of *Brucella abortus* bv. 1, 2, and 4, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis*, and *Brucella suis* bv. 1 by PCR". J. clin. Microbiology 32 (Nov.1994): 2660-2666.
- Bricker, Betsy J., Halling, Shirley M. "Enhancement of the *Brucella* AMOS PCR assay for differentiation of *Brucella abortus* vaccine strains S19 and RB51". J. Clin. Microbiol. 33 (June 1995): 1640-1642.
- Bruce David. "Sur une nouvelle forme de fièvre". Ann Inst Pasteur 4 (1893): 289-304.
- Bruce, David. "Note on the discovery of a microorganism in Malta fever". Practitioner 39 (1887): 161-70.
- Buddle, M. B. „Studies on *Brucella ovis* (n.sp.). A cause of genital disease of sheep in New Zealand and Australia". J. Hyg. 54 (1956): 351-364.
- Buddle, M. B., and Boyes, B.W. "A *Brucella* mutant causing genital disease in sheep in New Zealand". Aust. Vet. J. 29 (1953):145-153.
- Burgess G.W. and Norris M.J. "Evaluation of the cold complement fixation test for diagnosis of ovine brucellosis". Aust. Vet. J., 59, 1 (July 1982): 23–25.
- Burnet, E. "Diagnosis of Mediterranean Fever by the intradermal reaction: Action of the filtrate of culture of *M. Melitensis*". Arch. Inst Pasteur de Afrique du Nord 2 (1922): 187.
- Carlsson H., Hurvell B., Lindberg A. "Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for titration antibodies against *Brucella abortus* and *Yersinia enterocolitica*". Acta. Pathol. Microbiol. Scand C. 84, 3 (June 1976): 168-176.
- Carmichael, L. E. and Bruner D.W. "Characteristics of a newly recognized species of *Brucella* responsible for infectious canine abortions". Cornell Vet. 58, 4 (Oct. 1968): 579-592.

CDC. Bioterrorism agents/diseases, 2013, CDC website:  
<http://emergency.cdc.gov/agent/agentlist-category.asp>.

Chain Patrick S.G., Comerci Diego J., Tolmasky Marcelo E., Larimer Frank W., Malfatti Stephanie A, Vergez Lisa M., Aguero Fernan, Land Miriam L, Ugalde Rodolfo A, Garcia Emilio. “Whole-genome analyses of speciation events in pathogenic brucellae”. *Infection and Immunity* 73,12 (Dec. 2005): 8353–8361. DOI:10.1128/IAI.73.12.8353-8361.2005.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Nineteenth Informational Supplement (M100-S19). 2009. Clinical and Laboratory Standards Institute. Wayne, PA 19087 USA  
<http://www.clsi.org/source/orders/free/m100-s19.pdf>.

Cloekaert Axel, Grayon Maggy and Grepinet Olivier. “An IS711 element downstream of the bp26 gene is a specific marker of *Brucella* spp. isolated from marine mammals”. *Clin. Diagn Lab Immunol* 7, 5 (Sep. 2000): 835–839.

Cloekaert, Axel, Verger, Jean-Michel, Grayon, Maggy, Paquet, Jean-Yves, Garin-Bastuji, Bruno, Foster, Geoff and Godfroid, Jacques. “Classification of *Brucella* spp. isolated from marine mammals by DNA polymorphism at the *omp2* locus”. *Microbes Infect.* 3, 9 (July 2001): 729–738. [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(01\)01427-7](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(01)01427-7).

Cook, D.R. and Noble, J.W. “Isolation of *Brucella suis* from cattle” *Aust Vet J.* 61, 8 (Aug.1984) : 263-264.

Corbel Michael J. “Brucellosis in humans and animals”. World Health Organization in collaboration with the Food and Agriculture Organization of the United Nations and the World Organization for Animal Health. Switzerland, Geneva, WHO Press. 2006.  
<http://www.who.int/csr/resources/publications/Brucellosis.pdf>.

Corbel Michael J. “Brucellosis: an Overview”, Proceedings of the 1st International Conference on Emerging Zoonoses: Emerg Infect Diseases, Jerusalem 3, 2 (April-June 1997): 213-221. DOI:10.3201/eid0302.970219.

Corbel, M.J. and Brinley-Morgan, W.J. “Genus *Brucella*”. Edited by Krieg N.R and Holt J.G. *In Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology*, Baltimore: Williams and Wilkins. 1(1984): 377–388.

Da Costa M., Guillou J.P., Garin-Bastuji B., Thiebaud M., Dubray G. “Specificity of six gene sequences for the detection of the genus *Brucella* by DNA amplification”. *J. Appl. Bacteriol.*, 81, 3 (Sep. 1996): 267-275.

Dajer, A., Luna-Martinez, E., Zapata, D., Villegas, S., Gutierrez, E., Pena, G.,Gurria, F., Nielsen, K., and Gall, D. “Evaluation of a fluorescence polarization assay for the

- diagnosis of bovine brucellosis in Mexico". *Prev. Vet. Med.* 40, 1(1999): 67-73.
- Davies G. "The Rose Bengal test". *Vet. Rec.* 88,17(April 1971): 447-449.
- De, Barun K., Stauffer, Larry, Koylass, Mark S., Sharp, Susan E., Gee, Jay E., Helsel, Leta O., Steigerwalt, Arnold G., Vega, Robert, Clark, Thomas A., Daneshvar, Maryam I., Wilkins, Patricia P., Whatmore, Adrian M. "Novel *Brucella* strain (BO1) associated with a prosthetic breast implant infection". *Journal of Clinical Microbiology* 46,1(Jan. 2008):43-49. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2224274/pdf/1494-07.pdf>.
- Debeaumont C., Falconnet P.A., Maurin M. "Real-time PCR for detection of *Brucella* spp. DNA in human serum samples" *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 24 (2005): 842-845.
- DelVecchio Vito G, Kapatral Vinayak, Redkar Rajendra J. Patra Guy et al., "The genome sequence of the facultative intracellular pathogen *Brucella melitensis*". *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 1 (Jan. 2002):443-448. DOI:10.1073/pnas.221575398.
- Díaz Aparicio E. "Epidemiology of brucellosis in domestic animals caused by *Brucella melitensis*, *Brucella suis* and *Brucella abortus*". *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.* 32, 1(Apr. 2013): 53-60.
- Díaz-Aparicio E., Marin C., Alonso B., Aragon V., Perez S., Pardo M., Blasco J.M., Díaz R., Moriyon I. "Evaluation of serological tests for diagnosis of *B. melitensis* infection of goats". *J. Clin. Microbiol.* 32, 5 (May 1994):1159-1165 PMID:PMC263630.
- Eisenberg Tobias, Hans-Peter Hamann, Ute Kaim, Karen Schlez, Helga Seeger, Nicole Schauerte, Falk Melzer, Herbert Tomaso, Holger C. Scholz, Mark S. Koylass, Adrian M. Whatmore, and Michael Zschöck. "Isolation of Potentially Novel *Brucella* spp. from Frogs". *Applied and Environmental Microbiology.* 78, 10 (May 2012): 3753-3755.
- Elfaki Mohamed G, Uz-Zaman Taher, Al-Hokail Abdullah A, Nakeeb Shaheen M. "Detection of *Brucella* DNA in sera from patients with brucellosis by polymerase chain reaction". *Diagn Microbiol Infect Dis* 53, 1(Sep. 2005): 1-7.
- El-Tras F. Wael , Tayel A. Ahmed, Eltholth M. Mahmoud, Guitian Javier. "Brucella infection in fresh water fish: Evidence for natural infection of Nile catfish, *Clarias gariepinus*, with *Brucella melitensis*". *Veterinary Microbiology* 141, (3-4) (Mar. 2010): 321-325.
- Etman RH, SA Barsoum, IGA Ibrahim, WR El-Ashmawy & KA Abou-Gazia. "Evaluation of efficacy of some serological tests used for diagnosis of brucellosis in cattle in Egypt using latent class analysis". *Sokoto Journal of Veterinary Sciences*, 12, 1(August, 2014): 1-7.



- European Commission. Brucellosis in sheep and goats (*Brucella melitensis*). Scientific Committee on Animal Health and Animal Welfare. SANCO.C.2/AH/R23/2001 (July 2001): 89.
- European Council Directive (ECD), On Animal Health Conditions Governing Intra-Community Trade in Ovine and Caprine Animals, (1991) 91/68/EEC L 46.19–30.
- Evans, A. C. „Further studies on *Bacterium abortus* and related bacteria. II. A comparison of *Bacterium abortus* and *Bacterium bronchisepticus* and with the organism which causes Malta fever”. *J. Infect. Dis.* 22(1918): 580-593.
- Ewalt Darla R. and Bricker Betsy J. „Validation of the abbreviated *Brucella AMOS* PCR as a rapid screening method for differentiation of *Brucella abortus* field strain isolates and the vaccine strains, 19 and RB51”. *J Clin Microbiol.* 38, 8 (Aug. 2000): 3085-6. PMID: PMC87192.
- Ewalt, Darla R., Payeur, Janet B., Martin, Barbara M., Cummins, Donna R., and Miller, George W. “Characteristics of a *Brucella* species from a bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*)”. *J. Vet. Diagn. Invest.* 6, 4 (Oct. 1994): 448–452.
- FAO/WHO Expert Committee on Brucellosis, Sixth Report. WHO Technical Report Series, 740. WHO, Geneva. (1986).
- FAO-WHO-OIE Animal Health Yearbooks, 1994.
- Farina, R. “Current serological methods in *B. melitensis* diagnosis”, In *M. Plommet and J. M. Verger (ed.), Brucella melitensis*. Martinus Nijhoff Publ., Dordrecht, The Netherlands (1985): 139-146.
- Farrell, I.D. “The development of a new selective medium for the isolation of *B. abortus* from contaminated sources”. *Res.Vet. Sci.* 16(1974): 280-286.
- Fekete A, Bantle JA, Halling SM, Sanborn MR. “Preliminary development of a diagnostic test for *Brucella* using polymerase chain reaction”. *J. Appl. Bacteriol.* 69, 2 (Aug.1990): 216-27.
- Fekete Andrea, Bantle John A., Halling Shirley M. “Detection of *Brucella* by polymerase chain reaction in bovine fetal and maternal tissues”. *J. Vet. Diagn. Invest.* 4, 1(Jan. 1992): 79-83.
- Fensterbank, R. “Brucellosis in cattle, sheep and goats: diagnosis, control and vaccination”. *Rev. sci. tech. Off. Int. Epiz.* 5, 3 (1986): 605-618.
- Fensterbank, R., Pardon, P., Marly, J. “Comparison between subcutaneous and conjunctival route of vaccination of Rev 1 strain against *B. melitensis* infection in ewes”. *Ann. Rech. Vet.* 13, 4 (1982): 295–301.

- Ferreira Ana Cristina, Cardoso Regina, Travassos Dias Isabel, et al. „Evaluation of a modified Rose Bengal test and an indirect enzyme linked immunosorbent assay for the diagnosis of *Brucella melitensis* in sheep”. Vet. Res. 34 (2003): 297-305. DOI:10.1051/vetres:2003005.
- Ferreira Ana Cristina, Chambel Lelia, Tenreiro Tania, Cardoso Regina, Flor Lidia, et al. “MLVA16 typing of Portuguese human and animal *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* isolates”. PLoS ONE 7, 8 (Aug. 2012): e42514. DOI:10.1371/journal.pone.0042514.
- Fiori, P.L. et al. “*Brucella abortus* infection acquired in microbiology laboratories”. Journal of Clinical Microbiology, 38, 5 (2000): 2005-2006.
- Fischer Dominik, Lorenz Nadja, Heuser Wenke, Kampf Peter, Scholz Holger. C. and Lierz Michael. “Abscesses associated with a *Brucella inopinata*-like bacterium in a big-eyed tree frog (*Leptopelis vermiculatus*)”. J Zoo Wildl Med 43, 3 (Sep. 2012): 625–628. DOI:10.1638/2011-0005R2.1.
- Foster Geoffrey, Osterman Bjorn S, Godfroid Jacques, Jacques Isabelle, Cloeckaert Axel: “*Brucella ceti* sp. nov. and *Brucella pinnipedialis* sp. nov. for *Brucella* strains with cetaceans and seals as their preferred hosts”. Int J Syst Evol Microbiol 57 (Nov. 2007): 2688-2693. DOI:10.1099/ijs.0.65269-0.
- Foster Jeffrey T, Beckstrom-Sternberg Stephen M, Pearson Talima, Beckstrom-Sternberg James S, Chain Patrick S, et al. “Whole genome-based phylogeny and divergence of the genus *Brucella*”. J Bacteriol 191, 8 (Apr. 2009): 2864-2870. DOI:10.1128/JB.01581-08.
- Foster T Jeffrey, Lance B Price, Stephen M Beckstrom-Sternberg, Talima Pearson, William D Brown, Danika M Kiesling, Christina A Allen, Cindy M Liu, James Beckstrom-Sternberg, Frank F Roberto and Keim Paul. “Genotyping of *Brucella species* using Clade Specific SNPs”. BMC Microbiology 12, 1 (June 2012):110. DOI:10.1186/1471-2180-12-110.
- Frothingham Richard, Meeker-O’Connell Winifred A. “Genetic diversity in the Mycobacterium tuberculosis complex based on variable numbers of tandem DNA repeats”. Microbiology 144, 5 (1998): 1189-1196.
- Gall D, Nielsen K, Forbes L, et al. “Validation of the fluorescence polarization assay and comparison to other serological assays for the detection of serum antibody to *Brucella abortus* in bison”. J. Wildl. Dis. 36 (2000): 469-76.
- Gall D, Nielsen K, Vigliocco A, Smith P, Perez B, et al. “Evaluation of an indirect-linked immunoassay for presumptive serodiagnosis of *B. ovis* in sheep”. Small Rum Res 48, 3 (June 2003): 173-179. DOI:10.1016/S0921-4488(03)00013-0.

- Gall, D., Nielsen, K. "Serological diagnosis of bovine brucellosis: a review of test performance and cost comparison". *Rev. sci. tech.* 23, 3 (Dec. 2004): 989-1002.
- Gall, D., Nielsen, K., Forbes, L., Cook W., Leclair D., Balsevicius S., Kelly L., Smith P. and Mallory M. "Evaluation of the fluorescence polarization assay and comparison to other serological assays for detection of brucellosis in cervids". *Journal of Wildlife Diseases* 37, 1(Jan. 2001):110-118. DOI: <http://dx.doi.org/10.7589/0090-3558-37.1.110>.
- Garcia-Yoldi David, Clara M. Marin, Maria J. De Miguel, Pilar M. Munoz, Jose L. Vizmanos and Ignacio Lopez-Goni. "Multiplex PCR Assay for the Identification and Differentiation of all *Brucella* Species and the Vaccine Strains *Brucella abortus* S19 and RB51 and *Brucella melitensis* Rev1". *Clin Chem.* 52, 4 (April 2006): 779-781. DOI:10.1373/clinchem.2005.062596.
- Garin-Bastuji Bruno, Marin Clara M., Blasco Jose M., Albert D. "The diagnosis of brucellosis in sheep and goats, old and new tools". 62, 1-2 (March 2006): 63-67. DOI:10.1016/j.smallrumres.2005.08.004.
- Garin-Bastuji Bruno, Jose-Maria Blasco, Maggy Grayon, Jean-Michel Verger. „*Brucella melitensis* infection in sheep: present and future“. *Veterinary Research, BioMed Central*, 29 (3-4) (1998): 255-274.
- Garin-Bastuji, B., Blasco, J.M. "Caprine and ovine brucellosis (excluding *Brucella ovis* infection)", In: *Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines, 3 edn., 1996*, Office International des Epizooties, Paris, France (1997): 350-362.
- Garin-Bastuji, B., Blasco, J.M. "Caprine and ovine brucellosis (excluding *B. ovis*)". In: *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, fifth ed.* OIE, (2004): 598-606.
- Gee Jay E, De Barun K, Levett Paul N, Whitney Anne M, Novak Ryan T. and Popovic Tanja "Use of 16S rRNA gene sequencing for rapid confirmatory identification of *Brucella* isolates". *J. Clin. Microbiol.* 42, 8 (Aug 2004): 3649-3654. DOI:10.1128/JCM.42.8.3649-3654.2004.
- Godfroid J., Scholz H.C., Barbier T., Nicolas C., Wattiau P., Fretin D., Whatmore A.M., Cloeckaert A., Blasco J.M., Moriyon I., Saegerman C., Muma J.B., Al Dahouk S., Neubauer H. and Letesson J.J. "Brucellosis at the animal/ecosystem/human interface at the beginning of the 21<sup>st</sup> century". *Prev.vet. Med.*, 102, 2 (Nov 2011): 118-131. DOI:10.1016/j.prevetmed.2011.04.007.
- Godfroid Jacques, Axel Cloeckaert, Jean-Pierre Liautard, Stephan Kohler, David Fretin, et al. "From the discovery of the Malta fever's agent to the discovery of a marine mammal reservoir, brucellosis has continuously been a re-emerging zoonosis". *Veterinary Research*, 36, 3 (May-June 2005): 313-326. DOI:10.1051/vetres:2005003.

- Godfroid Jacques, Nielsen Klaus, Saegerman Claude “Diagnosis of brucellosis in livestock and wildlife”. *Croat Med J* 51, 4 (Aug 2010): 296–305. DOI:10.3325/cmj.2010.51.296.
- Good Edwin S., and Smith Wallace V. “*Bacillus abortus* (Bang) as an etiological factor in infectious abortion in swine”. *J. Bact.*1, 4 (July 1916): 415-422. PMID: PMC378663.
- Gopaul Krishna, Koylass Mark, Smith Caterine and Whatmore Adrian. “Rapid identification of *Brucella* isolates to the species level by real time PCR based single nucleotide polymorphism (SNP) analysis”. *BMC Microbiol.* 8 (June 2008): 86. DOI:10.1186/1471-2180-8-86.
- Gupta, V.K., Verma, D.K., Singh, K., Kumari, R., Singh, S.V. and Viham, V.S. “Single-step PCR for detection of *Brucella melitensis* from tissue and blood of goats”. *Smal Rumin Res* 66 (2006):169–174.
- Halling Shirley M, Tatum Fred M, Bricker Betsy J. „Sequence and characterization of an insertion sequence, IS711, from *Brucella ovis*”. *Gene* 133, 1 (Oct 1993): 123-7. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(93\)90236-V](https://doi.org/10.1016/0378-1119(93)90236-V).
- Halling, Shirley M., Peterson-Burch, Brooke D., Bricker, Betsy J., Zuerner, Richard L., Qing, Zhang, Li, Ling-Ling, Kapur Vivek, Alt, David P. and Olsen Steven C. „Completion of the genome sequence of *Brucella abortus* and comparison to the highly similar genomes of *Brucella melitensis* and *Brucella suis*. *J. Bacteriol.* 187,8 (Apr 2005): 2715–2726. DOI:10.1128/JB.187.8.2715-2726.2005.
- Havas A. Karyn “A Systemic Review of Brucellosis in the Kakheti Region of the Country of Georgia: An Evaluationa of the Disease Ecology, Risk Factors and Suggestions for Disease Control”. PhD diss., Colorado State University, Fort Collins, 2011.
- Henderson, I., Duggleby, C.J. and Turnbull, P.C. “Differentiation of *Bacillus anthracis* from other *Bacillus cereus* group bacteria with the PCR. *International Journal of Systematic Bacteriology* 44, 1 (Jan 1994): 99–105.
- Herman L, De Ridder H. “Identification of *Brucella* spp. by using the polymerase chain reaction”. *Appl Environ Microbiol.* 58, 6 (Jun 1992): 2099 - 2101. PMID: PMC195734.
- Hernandez-Mora G., Palacios-Alfaro J.D. and Gonzalez-Barrientos R. “Wildlife reservoirs of brucellosis:*Brucella* in aquatic environments”. *Rev. sci. tech.* 32,1 (2013): 89-103.
- Hill W., “Standardization of the complement fixation test for brucellosis”. *Bull. OIE* 60 (1963) 401-410.
- Hinic Vladimira, Brodard Isabelle, Petridou Evanthia, Filioussis George, Contos Vasilis, Frey Joachim, Abril Carlos. “Brucellosis in a dog caused by *Brucella melitensis* Rev 1.”

Veterinary Microbiology, 141, 3-4 (March 2010): 391-392.  
DOI:10.1016/j.vetmic.2009.09.019.

- Hofer Erwin, Revilla-Fernández Sandra, Al Dahouk Sascha, Riehm Julia M., Nöckler Karsten, Zygmunt Michel S., et al. “A potential novel *Brucella* species isolated from mandibular lymph nodes of red foxes in Austria”. *Vet. Microbiol.* 155, 1 (Feb 2012): 93–99. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.08.009>
- Hollender D, Conde SB, Salustio E, Samartino LE. “Detection of clonal complex with *Brucella abortus* biovar 2 genotypes as founder in *B. abortus* isolates from Argentina”, *Rev Argent Microbiol.* 45,4 (Oct-Dec 2013):229-39. DOI:10.1016/S0325-7541(13)70029-4.
- Hornitzky M. and Searson J. “The relationship between the isolation of *Brucella abortus* and serological status of infected, non-vaccinated cattle”. *Aust. Vet. J.* 63 (1986):172-174.
- Horrocks WH and Kennedy JC. „Goats as a means of dissemination of Mediterranean fever”. *Reports of the MFC Part IV (1906): 37–69.*
- Horrocks WH. “Preliminary note on goats as a means of propagation of Mediterranean fever”. *Reports of the MFC Part III (1905): 84–90.*
- Hubalek Z, Scholz HC, Sedlacek I, Melzer F, Sanogo YO, Nesvadbova J. “Brucellosis of the common vole (*Microtus arvalis*)”. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 7,4 (2007): 679–87. DOI:10.1089/vbz.2007.0143.
- Huddleson I.F. “The differentiation of the species of the genus *Brucella*” *Tech. Bull. Mich. Agric. exp. sta.*, 100 (1929) 1-16.
- Hughes, M.L. “The natural history of certain fevers occurring in the Mediterranean”. *Mediterranean Nature.* 2 (1893): 325–327.
- Hunter D. and Allen J. “An evaluation of milk and blood tests used to diagnose brucellosis”. *Veterinary Record*, 91, 13 (1972): 310-312.
- Huynh Lynn Y, Van Ert Matthew N, Hadfield Ted, Probert William S, Bellaire Bryan H, Dobson Michael, Burgess Robert J, Weyant Robbin S, Popovic Tanja, Zanecki Shaylan, et al. “Multiple Locus Variable Number Tandem Repeat (VNTR) Analysis (MLVA) of *Brucella spp.* identifies species specific markers and insights into phylogenetic relationships”. In V.S. Georgiev et al., (eds) *National Institute of Allergy and Infectious Disease, NIH. Infectious disease.* Humana press. (2008):47-54. DOI:10.1007/978-1-59745-569-5\_6.
- Ica Tuba, Aydin Fuat, Gumussoy Semih, Percin Duygu, Sumerkan Ahmet Bulent, Ocak Fulya et al., “Conventional and molecular biotyping of *Brucella* strains isolated from cattle, sheep and human”. *Ankara Univ. Vet. Fak. Derg.* 59 (2012): 259-264.

- Ilhan Z, Solmaz H, Aksakal A, Gulhan T, Ekin IH, Boynukara B. "Detection of *Brucella melitensis* DNA in the milk of sheep after abortion by PCR assay". Arch Med Vet 40 (2008b): 141-146.
- Ilhan Z., Aksakal A., Ekin I.H., Gulhan T., Solmaz H. and Erdenlig S. "Comparison of culture and PCR for the detection of *Brucella melitensis* in blood and lymphoid tissues of serologically positive and negative slaughtered sheep" Letters in Applied Microbiology 46, 3 (Mar 2008a): 301-306. DOI:10.1111/j.1472-765X.2007.02309.x.
- Isidoro-Ayza Marcos, Ruiz-Villalobos Nazareth, Perez Lola, Guzman-Verri Caterina, Munoz Pilar, Alegre Fernando, Barberan Montserrat, Chacon-Diaz Carlos, Chaves-Olarte Esteban, Gonzalez-Barrientos Rocio, Moreno Edgardo, Blasco Jose Maria, Domingo Mariano. "*Brucella ceti* infection in dolphins from the Western Mediterranean sea". BMC Veterinary Research 10 (Sep 2014): 206. DOI:10.1186/s12917-014-0206-7.
- Jacques I, Olivier-Bernardin V, Dubray G. "Efficacy of ELISA compared to conventional tests (RBPT and CFT) for the diagnosis of *Brucella melitensis* infection in sheep". Vet Microbiol 64,1 (Nov 1998):61-73. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(98\)00250-8](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(98)00250-8).
- Jiang Hai, Wang Heng, Xu Liquing, Hu Guiying, Ma Junying, et al. "MLVA Genotyping of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* Isolates from Different Animal Species and Humans and Identification of *Brucella suis* Vaccine Strain S2 from Cattle in China". PLoS ONE 8,10 (Oct 2013): e76332. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076332>.
- Jimenez de Bagues, M.P., Marin, C.M., Blasco, J.M., Moriyon I. and Gamazo, C. "An ELISA with *Brucella* lipopolysaccharide antigen for the diagnosis of *B. melitensis* infection in sheep and for the evaluation of serological responses following subcutaneous orconjunctival *B. melitensis* strain Rev 1 vaccination". Vet. Microbiol. 30, 2-3 (Feb 1992):233-241.
- Kattar Mireille M, Zalloua Pierre, Araj George F, Samaha-Kfoury Joumana, Shbaklo Hadia, Khalife Simon, Kanj Souha S. and Deeb Mary "Development and evaluation of real-time PCR assays on whole blood and paraffin-embedded tissues for rapid diagnosis of human brucellosis". Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 59, 1 (Sep 2007): 23-32. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2007.04.002>.
- Kattar, M.M., Jaafar, R.F., Araj, G.F., Le, F.P., Matar, G.M., Rached, R.A., Khalifa, S. and Vergnaud G. "Evaluation of a multilocus variable-number tandem-repeat analysis scheme for typing human *Brucella* isolates in a region of brucellosis endemicity". J. Clin. Microbiol. 46 (2008):3935-3940.
- Keefer Chester S.: "Report of a Case of Malta Fever Originating in Baltimore, Maryland", Bull. Johns Hopkins Hosp. 35, 395 (Jan 1924):6-14.

- Keim P., Price LB., Klevytska AM., Smith KL., Schupp JM., Okinaka R., Jackson PJ., Hugh-Jones ME. "Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis reveals genetic relationships within *Bacillus anthracis*". J. Bacteriol. 182, 10 (May 2000): 2928-36.
- Kılıc Selcuk, Ivanov Ivan N., Durmaz Rıza, Bayraktar Mehmet Refik, Ayashoglu Ergin, Uyanık M. Hamidullah, Alıskan Hikmet, Yasar Ekrem, Bayramoglu Gulcin, Arslanturk Ahmet, Vergnaud Gilles and Kantardjiev Todor V. "Multiple-Locus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis Genotyping of Human *Brucella* Isolates from Turkey". J. clinical microbiology, 49,9 (Sept. 2011): 3276-3283. DOI:10.1128/JCM.02538-10.
- Klevytska Alexandra M, Price Lance B, Schupp James M, Worsham Patricia L, Wong Jane, Keim Paul. "Identification and characterization of variable-number tandem repeats in the *Yersinia pestis* genome". J Clin Microbiol 39, 9 (Sep 2001): 3179-85. DOI:10.1128/JCM.39.9.3179-3185.2001.
- Le Fleche Philippe, Jacques Isabelle, Grayon Maggy, Al Dahouk Sascha, Bouchon Patrick, Denoeud France, et al. "Evaluation and selection of tandem repeat loci for a *Brucella* MLVA typing assay". BMC Microbiol. 6 (Feb 2006): 9. DOI:10.1186/1471-2180-6-9.
- Leal-Klevezas, Diana Sara, Mart'inez-V'azquez, Irma Olivia, L'opez-Merino, Ahide, Mart'inez-Soriano and Juan Pablo. "Single-step PCR for detection of *Brucella* spp. from blood and milk of infected animals". J. Clin.Microbiol. 33, 12 (Dec 1995):3087-3090.
- Lopes LB, Nicolino R and Haddad JPA "Brucellosis - Risk Factors and Prevalence: A Review". The Open Veterinary Science Journal 4,1 (2010): 72-84. <http://dx.doi.org/10.2174/1874318801004010072>.
- López-Goñi I, García-Yoldi D, Marin CM, de Miguel MJ, Muñoz PM, Blasco J M, Jacques I, Grayon M, Cloeckert A, Ferreira AC, Cardoso R, Corrêa de Sá MI, Walravens K, Albert D, Garin-Bastuji B. "Evaluation of a multiplex PCR assay (Bruce-ladder) for molecular typing of all *Brucella* species, including the vaccine strains". J. Clin. Microbiol., 46, 10 (Oct 2008): 3484-3487. DOI:10.1128/JCM.00837-08.
- Lopez-Goni Ignacio and Moriyon Ignacio. *Brucella: Molecular and Cellular Biology 1<sup>st</sup> ed.* Universidad de Navarra, Pamplona, Spain 2005.
- Lucero, N.E., Ayala, S.M., Escobar, G.I. and Jacob N.R. "*Brucella* isolated in humans and animals in Latin America from 1968 to 2006" Epidemiol. infect. 136,4 (April 2008):496-503. DOI:10.1017/S0950268807008795.
- Luchsinger DW and Anderson RK. "Longitudinal studies of naturally acquired *Brucella abortus* infection in sheep." Am J Vet Res 40, 9 (Sep 1979): 1307-12.

- MacMillan, A. "Conventional serological tests". In: Nielsen Klaus, Duncan, Robert J. (Eds.), *Animal Brucellosis*. CRC Press, Boca Raton, Florida, (1990): 153–198.
- MacMillan, A.P., Greiser-Wilke, I., Moennig, V. and Mathias, L.A. "A competition enzyme immunoassay for brucellosis diagnosis". *Dtsch. Tierarztl. Wochensch.*, 97, 2 (1990): 83-85.
- Maloney GE, Fraser WR. CBRNE. Brucellosis. Omaha, Nebraska, eMedicine, 2004. <http://www.emedicine.com/emerg/topic883.htm>.
- Mamisashvili Eliso, Kracalik Ian T., Tinatin Onashvili, Lela Kerdzevadze, Ketevan Goginashvili, Tamar Tigilauri, Marina Donduashvili, Marina Nikolaishvili, Irma Beradze, Marina Zakareishvili, Maka Kokhraidze, Makvala Gelashvili, Nino Vepkhvadze, Elizabeth Rácz S., Elzerd Philip H., Nikolich Mikeljon P., Blackburn Jason K. "Seroprevalence of brucellosis in livestock within three endemic regions of the country of Georgia". *Preventive Veterinary Medicine* 110, 3-4 (July 2013): 554-557. DOI:10.1016/j.prevetmed.2012.12.005.
- Maquart Marianne, Le Fleche Philippe, Foster Geoffrey, Tryland Morten, Ramisse Françoise et al., "MLVA-16 typing of 295 marine mammal *Brucella* isolates from different animal and geographic origins identifies 7 major groups within *Brucella ceti* and *Brucella pinnipedialis*". *BMC Microbiology* 9 (July 2009):145. DOI:10.1186/1471-2180-9-145.
- Marín C., Alabart J.L., Blasco J.M. "Effect of antibiotics contained in two brucella selective media on growth of *Brucella abortus*, *B. melitensis* and *B. ovis*", *Vet. Rec.* 34, 2 (Feb. 1996a): 426-428.
- Marín C., Jimenéz de Bagüés M.P., Barberán M., Blasco J.M. "Comparison of two selective media for the isolation of *Brucella melitensis* from naturally infected sheep and goats", *Vet. Rec.* 138, 17 (Apr. 1996b): 409-411.
- Marston, J.A., "Report on fever (Malta)", *Medical Report for 1861*. Army Medical Department, London, 3 (1863): 486-521.
- Matar Ghassan M, Khneisser Issam A, and Abdelnoor Alex M. "Rapid laboratory confirmation of human brucellosis by PCR analysis of a target sequence on the 31-kilodalton *Brucella* antigen DNA". *J Clin Microbiol*, 34, 2 (Feb. 1996):477–478. PMID: PMC228827.
- Mathew C, Stokstad M, Johansen T.B, Klevar S, Mdegela RH, Mwamengele G, Michel P, Escobar L, Fretin D, and Godfroid J. "First isolation, identification, phenotypic and genotypic characterization of *Brucella abortus* biovar 3 from dairy cattle in Tanzania" *BMC Veterinary Research* 11 (July 2015): 156. DOI:10.1186/s12917-015-0476-8.



- Mayer-Scholl Anne, Draeger Angelika, Gollner Cornelia, Scholz Holger C. and Nockler Karsten. "Advancement of a multiplex PCR for the differentiation of all currently described *Brucella* species". J. microbiol. Meth., 80, 1 (Jan. 2010): 112–114. DOI:10.1016/j.mimet.2009.10.015.
- McDonald WL, Jamaludin R, Macereth G, Hansen M, Humphrey S, Short P, Taylor T, Swingler J, Dawson CE, Whatmore AM, Stubberfield E, Perrett LL, Simmons G. "Characterisation of a *Brucella* sp. strain as a marine-mammal type despite isolation from a patient with spinal osteomyelitis in New Zealand". J Clin Microbiol 44,12 (Dec. 2006): 4363–4370. DOI:10.1128/JCM.00680-06.
- McGiven, J.A., Tucker, J.D., Perrett, L.L., Stack, J.A., Brew, S.D., MacMillan, A.P. "Validation of FPA and CELISA for the detection of antibodies to *Brucella abortus* in cattle sera and comparison to SAT, CFT and IELISA". J. Immunol. Methods 278, 1-2 (Jul 2003): 171–178. [https://doi.org/10.1016/S0022-1759\(03\)00201-1](https://doi.org/10.1016/S0022-1759(03)00201-1).
- Meltzer Eyal, Sidi Yechezkel, Smollen Gill, Banai Menachem, Bardenstein Svetlana and Schwartz Eli. « Sexually transmitted Brucellosis in humans», Clin. Infect. Dis. 51, 2 (Jul. 2010):e12-15. DOI:10.1086/653608.
- Memish Ziad A. and Balkhy Hanan H. "Brucellosis and international travel". J. Travel Med. 11, 1(Jan-Feb 2004):49-55. DOI:10.2310/7060.2004.13551.
- Meyer, K.F., and Shaw, E.B. "A comparison of the morphologic, cultural, and biochemical characteristics of *B. abortus* and *B. melitensis*". J. Infect. Dis. 27, 3(Sep. 1920): 173-184. DOI: <https://doi.org/10.1093/infdis/27.3.173>.
- Minas, A., Stournara, A., Minas, M., Papaioannou, A., Krikelis, V.,Tselepidis, S. "Validation of fluorescence polarization assay (FPA) and comparison with other tests used for diagnosis of *B. melitensis* infection in sheep". Veterinary Microbiology 111, 3-4 (Dec. 2005):211–221. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2005.10.009>.
- Montagnaro S, Longo M, Mallardo K, et al. "Evaluation of fluorescence polarization assay for the detection of serum antibodies to *Brucella abortus* in water buffalo (*Bubalus bubalis*)". Vet. Immunol. Immunopathol. 125, 1-2 (May 2008): 135-42. DOI:10.1016/j.vetimm.2008.05.017.
- Moreno Edgardo, Cloeckert Axel and Moriyon Ignacio. "Brucella evaluation and taxonomy". Vet. Microbiol. 90, 1-4 (2002):209-227. DOI:10.1016/S0378-1135(02)00210-9.
- Moreno, Edgardo and Moriyon, Ignacio, 2002. „Brucella melitensis: a nasty bug with hidden credentials for virulence". Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99, 1 (Jan. 2002):1–3. DOI:10.1073/pnas.022622699.

- Morgan W., Mackinnon D., Lawson J., Cullen G., “The Rose Bengal plate agglutination test in the diagnosis of brucellosis”. *Vet. Rec.* 85, 23 (Dec. 1969): 636-637.
- Navarro E., J. Escribano, J.A. Fernandez and J. Solera et al., “Comparison of three PCR methods for detection of *Brucella spp.* in human blood samples”. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 34 (2002):147-151.
- Nicoletti Paul. “Brucellosis: past, present and future”, *Prilozi*, 31, 1 (2010):21–32.
- Nicoletti, Paul. “A short history of brucellosis”. *Vet. Microbiol.* 90, 1-4 (Dec. 2002):5-9. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(02\)00209-2](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(02)00209-2).
- Nicoletti, Paul. “Further evaluation of serologic procedures used to diagnose brucellosis”. *Am. J. Vet. Res.* 30, 10 (Oct. 1969):1811-1821.
- Nicoletti, Paul. “Utilization of the card test in brucellosis eradication”. *J. Am.Vet. Med. Assoc.*151 (1967):1778-1781.
- Nielsen K and Yu WL, “Serological diagnosis of brucellosis”. *Section of Biological Medical Sciences, The Macedonian Academy of Sciences and Arts (MASA)*, 31(1) (2010):65–89.
- Nielsen K., Gall D., Smith P., Balsevicius S., Garrido F., Durán Ferrer M., Biancifiori F., Dajer A., Luna E., Samartino L., Bermudez R., Moreno F., Renteria T. and Corral A. “Comparison of serological tests for the detection of ovine and caprine antibody to *Brucella melitensis*”. *Rev. Sci. Tech.* 23, 3 (Dec. 2004): 979-987.
- Nielsen K., Smith P., Yu WL., Elmgren C., Halbert G., Nicoletti P. *et al.* “Validation of a second generation competitive enzyme immunoassay (CELISA) for the diagnosis of brucellosis in various species of domestic animals”. *Vet Immunol Immunopathol* 125 (2008): 246–50.
- Nielsen KH, Kellya L, Galla D, Nicoletti P, Kelly W. “Improved competitive enzyme immunoassay for the diagnosis of bovine brucellosis”. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 46 (1995):285–291.
- Nielsen Klaus, Lin Min, Gall David, and Jolley Michael. „Fluorescence polarization immunoassay: detection of antibody to *Brucella abortus*”. *Methods* 22, 1 (Sep. 2000):71-76. <https://doi.org/10.1006/meth.2000.1038>.
- Nielsen O, Nielsen K, Braun R, *et al.* „A comparison of four serological assays for screening for *Brucella* exposure in Hawaiian monk seals”. *J Wildl. Dis.* 41,1 (Jan. 2005):126-33. DOI: <https://dx.doi.org/10.7589/0090-3558-41.1.126>.
- Nielsen, K., Cherwonogrodzky, J.W., Duncan, J.R., Bundle, D.R. “Enzyme-immunoassay for differentiation of the antibody response of cattle naturally infected with *Brucella*

- abortus or vaccinated with strain 19". *American Journal of Veterinary Research* 50, 1 (Jan. 1989): 5–9.
- Nielsen, K., Gall, D., Jolley, M., Leishman, G., Balsevicius, S., Smith, P., Nicoletti, P., Thomas, F. "A homogeneous fluorescence polarization assay for detection of antibody to *Brucella abortus*". *J. Immunol. Methods* 195, 1-2 (Sep. 1996a): 161–168.
- Nielsen, K., Gall, D., Smith, P., Vigliocco, A., Perez, B., Samartino, L., Nicoletti, P., Dajer, A., Elzer, P., Enright, F. "Validation of the fluorescence polarization assay as a serological test for the presumptive diagnosis of porcine brucellosis". *Vet. Microbiol.* 68 (1999): 245–253.
- Nielsen, K.H., Kelly, L., Gall, D., Balsevicius, S., Bosse, J., Nicoletti, P.L., Kelly, W. "Comparison of enzyme immuno assays for the diagnosis of bovine brucellosis". *Prev. Vet. Med.* 26 (1996): 7–32.
- Nielsen, Klaus and Gall, David. "Fluorescence polarization assay for the diagnosis of brucellosis: a review". *Journal of Immunoassay and Immunochemistry* 22, 3 (2001): 183–201.
- Nielsen, Klaus, "Diagnosis of brucellosis by serology". *Veterinary Microbiology* 90, 1-4 (Dec. 2002): 447–459. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(02\)00229-8](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(02)00229-8).
- Norton, J.H. and Thomas, Anette D. "*Brucella suis* infection in pregnant cattle", *Austral. Veterinary J.* 55, 11 (Nov. 1979): 525-527. DOI:10.1111/j.1751-0813.1979.tb07016.x.
- Nymo Ingebjorg H, Tryland Morten and Godfroid Jacques. "A review of *Brucella* infection in marine mammals, with special emphasis on *Brucella pinnipedialis* in the hooded seal (*Cystophora cristata*)". *Veterinary Research*, 42 (Aug. 2011):93. DOI:10.1186/1297-9716-42-93.
- O'Leary Seonadh, Sheahan Michael, Sweeney Torres. "*Brucella abortus* detection by PCR assay in blood, milk and lymph tissue of serologically positive cows". *Res. Vet. Sci.* 81, 2 (Oct. 2006): 170-176. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2005.12.001>.
- OIE "Bovine brucellosis diagnostics". *World Organization for Animal Health Terrestrial Manual*. World Organization for Animal Health, (2008a): 624-659.
- OIE "Bovine brucellosis" *World Organization for Animal Health Terrestrial Manual*. World Organization for Animal Health, Paris, France (2009).
- OIE "Bovine brucellosis". *Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines*. OIE, Paris, (2000a):328–345.

- OIE “Caprine and Ovine Brucellosis (excluding *Brucella ovis*)”. *World Organization for Animal Health Terrestrial Manual*. World Organization for Animal Health, Paris, France (2008b): 978-982.
- OIE “List of Tests for International Trade”. *World Organization for Animal Health Terrestrial Manual*. World Organization for Animal Health, Paris, France (2008c).
- OIE “Porcine brucellosis”. *Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines*. OIE, Paris, (2000d): 623–629.
- OIE Office International des Epizooties, “Caprine and ovine brucellosis (excluding *Brucella ovis*)”. In: *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, fifth ed.* OIE, Paris. (2004b): (Chapter 2.4.2).
- OIE World Organisation for Animal Health. 2001.
- OIE. “Bovine brucellosis”. *Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines for terrestrial animals*. OIE, Paris. (2008): 624–59.
- Osterman B. and Moriyon I., International Committee on Systematic of Prokaryotes; Subcommittee on the taxonomy of *Brucella*: minutes of the meeting, 17 September 2003, Pamplona, Spain. *Int. J. syst. evolut. Microbiol.*, 56, 5 (2006): 1173-1175.
- Palanduz A. et al., “Brucellosis in a mother and her young infant: Probable transmission by breast milk”. *Int. J. Infect. Dis.* 4 (2000): 55-6.
- Pappas Georgios, Panagopoulou Photini, Christou Leonidas, Akritidis Nicolaos. “*Brucella* as a biological weapon”. *Cell Mol Life Sci.* 63 (19-20) (Oct. 2006a): 2229 - 2236.
- Pappas Georgios, Papadimitriou Photini, Akritidis Nicolaos, Christou Leonidas and Tsianos Epameinondas V. “The new global map of human brucellosis”. *Lancet Infect Dis* 6, 2 (Feb. 2006b): 91–9. DOI:10.1016/S1473-3099(06)70382-6.
- Paulsen I.T., Seshadri R., Nelson K.E., Eisen J.A., Heidelberg J.F., Read T.D., Dodson R.J., Umayam L., Brinkac L.M., Beanan M.J., Daugherty S.C., Deboy R.T., Durkin A.S., Kolonay J.F., Madupu R., Nelson W.C. et al. “The *Brucella suis* genome reveals fundamental similarities between animal and plant pathogens and symbionts”. *Proc. natl Acad. Sci. USA*, 99, 20 (2002): 13148–13153.
- Poester, Fernando Padilla, Nielsen, Klaus, Samartino Luis Ernesto and Yu Wei Ling. „Diagnosis of Brucellosis”. *The Open Veterinary Science Journal* 4 (2010): 46-60.
- Prenger-Berninghoff E, Siebert U, Stede M, König A, Weiss R, Baljer G. “Incidence of *Brucella* species in marine mammals of the German North Sea”. *Dis Aquat Organ* 81, 1 (Aug. 2008): 65-71. DOI:10.3354/dao01920.

- Qin Xuan, Emerson Julia, Stapp Jenny, Stapp Lynn, Abe Patrick and Burns Jane L. “Use of real-time PCR with multiple targets to identify *Pseudomonas aeruginosa* and other non-fermenting gram-negative bacilli from patients with cystic fibrosis”. *J. Clin. Microbiol* 41, 9 (Sep. 2003): 4312-4317. DOI:10.1128/JCM.41.9.4312-4317.2003.
- Quahrani, S., Michaux, S., Widada, J.S., Bourg, G., Tournebize, R., Ramuz, M., Liautard, J.P. “Identification and sequence analysis of IS6501, an insertion sequence in *Brucella* spp.: relationship between genomic structure and the number of IS6501 copies”. *J. Gen. Microbiol.* 139, 12 (Dec 1993):3265–3273.
- Queipo-Ortuño Maria Isabel, Juan D. Colmenero, Nuria Muñoz, Guillermo Baeza, Encarna Clavijo and Pilar Morata “Rapid Diagnosis of *Brucella* Epididymo-Orchitis by Real-Time Polymerase Chain Reaction Assay in Urine Samples”. *The journal of urology.* 176, 5 (Dec. 2006): 2290-2293. DOI:10.1016/j.juro.2006.07.052.
- Ramirez-Pfeiffer C, Nielsen K, Marin-Ricalde F, et al. „Comparison of fluorescence polarization assay with card and complement fixation tests for the diagnosis of goat brucellosis in a high prevalence area”. *Vet Immunol Immunopathol* 110, 1-2 (March 2006): 121-7. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2005.09.011>.
- Ramirez-Pfeiffer C, Nielsen K, Smith P, et al. „Application of the fluorescence polarization assay for detection of caprine antibodies to *Brucella melitensis* in areas of high prevalence and widespread vaccination”. *Clin. Vaccine Immunol* 14, 3 (Mar. 2007):299-303. DOI:10.1128/CVI.00350-06.
- Ramirez-Pfeiffer Carlos, Diaz-Aparicio Efren, Gomez-Flores Ricardo, Rodriguez-Padilla Cristina, Molares-Loredo Alberto and Alvarez Ojeda Genoveva. “Use of the *Brucella melitensis* native hapten to diagnose brucellosis in goats by a simple, rapid and specific fluorescence polarization assay”. *Clin. Vaccine Immunol.*15, 6 (Jun. 2008): 211-5. DOI:10.1128/CVI.00046-08.
- Refai Mohamed “Incidence and control of brucellosis in the Near East region”. *Vet. Microbiol.* 90, 1-4 (Dec. 2002):81-110. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(02\)00248-1](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(02)00248-1).
- Renukaradhya G.J., Isloor S.,Rajasekhar M. “Epidemiology, zoonotic aspects, vaccination and control/eradication of brucellosis in India”. *Veterinary Microbiology*, 90, 1-4, 20 (Dec. 2002): 183-195. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(02\)00253-5](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(02)00253-5).
- Riccardo De Santis, Ciammaruconi Andrea, Faggioni Giovanni, D'Amelio Raffaele, Marianelli Cinzia and Lista Florigio “Lab on a chip genotyping for *Brucella* spp. based on 15-loci multi locus VNTR analysis” *BMC Microbiol.* 9 (Apr. 2009): 66. DOI:10.1186/1471-2180-9-66.
- Robinson, A. “Guidelines for coordinated human and animal brucellosis surveillance”, *FAO Animal Production and Health Paper*, Rome, Italy. 156 (2003): 45.

- Romero, C., Pardo, M., Grill' o, M.J., D'iaz, R., Blasco, J.M., Lopez-Goñi, I. "Evaluation of PCR and indirect enzyme-linked immunosorbent assay on milk samples for diagnosis of brucellosis in dairy cattle". J. Clin. Microbiol. 33, 12 (Dec. 1995b): 3198–3200.
- Romero, Conchi, Gamazo, Carlos, Pardo, Marisa, Lopez-Goni, Ignacio. "Specific detection of *Brucella* DNA by PCR". J. Clin. Microbiol. 33, 3 (Mar.1995a): 615–617.
- Ross, H.M., Foster G., Reid RJ., Jahans KL., MacMillan AP. "Brucella species infection in sea-mammals". Veterinary Record, 134, 14 (May 1994):359. DOI:10.1136/vr.134.14.359-b.
- Rotz, Lisa D., Khan, Ali S., Lillibridge, Scott R., Ostroff, Stephen M., Hughes, James M. "Public health assessment of potential biological terrorism agents". Emerging Infectious Diseases 8, 2 (Feb. 2002):225–230. DOI:10.3201/eid0802.010164.
- Ruben B., Band J.D., Wong P. and Colville J. "Person-to-person transmission of *brucella melitensis*". Lancet, 337, 8732 (Jan. 1991):14-15. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0140-6736\(91\)93332-4](http://dx.doi.org/10.1016/0140-6736(91)93332-4).
- Saegerman Claude, Vo T KO, De Waele L, Gilson D, Bastin A, Dubray G, Flanagan P, Limet JN, Letesson Jean-Jacques, Godfroid Jacques. "Diagnosis of bovine brucellosis by skin test: conditions for the test and evaluation of its performance". Vet. Rec. 145, 8 (Sep.1999):214-218.
- Samadi Assadullah, Ababneh Mustafa, Giadinis Netarios, and Lafi Shawkat. "Ovine and Caprine Brucellosis (*Brucella melitensis*) in Aborted Animals in Jordanian Sheep and Goat Flocks". Veterinary Medicine International 2010, 3 (Oct. 2010):458695.
- Samartino L., Gregoret R., Gall D. and Nielsen K. "Fluorescence polarization assay: application to the diagnosis of bovine brucellosis in Argentina". J. Immunoassay, 20, 3 (1999a):115-126.
- Samartino, Luis, Gall, D., Gregoret, R., Nielsen, K. "Validation of enzyme-linked immunosorbent assays for the diagnosis of bovine brucellosis". Vet. Microbiol. 70, 3-4 (Dec. 1999):193–200. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(99\)00122-4](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(99)00122-4).
- Scholc Holger Christian And Vergnaud Gilles "Molecular characterisation of *Brucella* species". Rev. sci. tech. Off. int. Epiz. 32, 1 (2013):149-162.
- Scholz Holger C., Hubalek Zdenek, Nesvadbova Jirina, Tomaso Herbert, Vergnaud Gilles, Le Flèche Philippe, Whatmore Adrian M., Al Dahouk Sascha, Kruger Monika, Lodri Csilla and Pfeffer Martin. "Isolation of *Brucella microti* from soil". Emerg. infect. Dis. 14, 8 (Aug. 2008):1316–1317. DOI:10.3201/eid1408.080286.

- Scholz Holger C., Hubalek Zdenek, Sedlacek Ivo, Vergnaud Gilles, Tomaso Herbert, Al Dahouk Sascha, Melzer Falk, Kampfner Peter, Neubauer Heinrich, Cloeckert Axel, Maquart Marianne, Zygmunt Michel S., Whatmore Adrian M., Falsen Enevold, Bahn Peter, Göllner Cornelia, Pfeffer Martin, Huber Birgit, Busse Hans-Jurgen. and Nöckler Karsten “*Brucella microti* sp. nov., isolated from the common vole *Microtus arvalis*”. Int. J. syst. evolut. Microbiol. 58 (Pt 2) (Feb. 2008b): 375–382. DOI:10.1099/ijs.0.65356-0.
- Scholz Holger Christian, Hofer Erwin, Vergnaud Gilles, Le Fleche Philippe, Whatmore Adrian M., Al Dahouk Sascha, Pfeffer Martin, Krüger Monika, Cloeckert Axel and Tomaso Herbert „Isolation of *Brucella microti* from mandibular lymph nodes of red foxes, *Vulpes vulpes*, in lower Austria”. Vector Borne Zoonotic Dis. 9, 2 (Apr. 2009):153–6. DOI:10.1089/vbz.2008.0036.
- Scholz Holger Christian, Nöckler Karsten, Göllner Cornelia, Bahn Peter, Vergnaud Gilles, Tomaso Herbert, Al Dahouk Sascha, Kampfner Peter, Cloeckert Axel, Maquart Marianne, Zygmunt Michel S., Whatmore Adrian M., Pfeffer Martin, Huber Birgit, Busse Hans-Jurgen and De Barun Kumar “*Brucella inopinata* sp. nov., isolated from a breast implant infection”. Int. J. syst. evolut. Microbiol. 60 (Pt 4) (Apr. 2010): 801–808. DOI:10.1099/ijs.0.011148-0.
- Scott, Julie C., Koylass, Mark S., Stubberfield, Michael R. and Whatmore, Adrian M. “Multiplex assay based on single-nucleotide polymorphisms for rapid identification of *Brucella* isolates at the species level”. Appl. Environ. Microbiol. 73, 22 (Nov. 2007):7331–7337. DOI:10.1128/AEM.00976-07.
- Silva M, Cruz H, Rossetti O, et al. “Development of an optical immunosensor based on the fluorescent of cyanini-5 for veterinarian diagnostics”. Biotechnol Lett 26 (2004):993-7.
- Sohn Annette H., Probert Will S., Glaser Carol A., Gupta Nalin, Bollen Andrew W., Wong Jane D., Grace Elizabeth M, and McDonald William C. “Human neurobrucellosis with intracerebral granuloma caused by a marine mammal *Brucella* spp”. Emerg Infect Dis 9, 4 (Apr. 2003): 485-488. DOI:10.3201/eid0904.020576.
- Stemshorn B.W., Forbes L., Eaglesome M., Nielsen K., Robertson F., Samagh B. “A comparison of the standard serological tests for diagnosis of bovine brucellosis”. Can. J. Comp. Med. 49,4 (Oct.1985): 391-394. PMID: PMC1236197.
- Stoenner H.G., and Lakman D.B. “A new species of *Brucella* isolated from the desert wood rat, *Neotoma lepida* Thomas” Am. J. Vet. Res. 18, 69 (Oct. 1957): 947-951.
- Stournara A, Minas Anastasios, Bourtzi-Chatzopoulou E, et al. “Assessment of serological responses of young and adult sheep to conjunctival vaccination with Rev 1 vaccine by fluorescence polarization assay (FPA) and other serological tests for *B. melitensis*”. Vet. Microbiol. 119, 1 (2007):53-64. DOI:10.1016/j.vetmic.2006.08.004.

- Tiller Rebekah V., De Barun K., Boshra Marie., Huynh Lynn Y., Van Ert Matthew N., Wagner David M., Klena John, Mohsen TS, El-Shafie SS, Keim Paul, et al. "Comparison of two multiple locus variable number tandem repeat (VNTR) analysis (MLVA) methods for molecular strain typing human *Brucella melitensis* isolates from the Middle East". *Journal of Clinical Microbiology* 47, 7 (July 2009): 2226-2231. DOI:10.1128/JCM.02362-08.
- Tiller, Rebekah V., Gee, Jay E., Frace, Michael A., Taylor, Trevok K., Setubal, Joao C., Hoffmaster, Alex R. and De, Barun K. "Characterization of novel *Brucella* strains originating from wild native rodent species in North Queensland, Australia". *Appl Environ Microbiol* 76, 17 (Sep. 2010a): 5837–5845. DOI:10.1128/AEM.00620-10.
- Tiller, Rebekah V., Gee, Jay E., Lonsway, David R., Gribble, Sonali, Bell, Scott C., Jennison, Amy V., Bates, John, Coulter, Chris, Hoffmaster, Alex R. and De, Barun K. "Identification of an unusual *Brucella* strain (BO2) from a lung biopsy in a 52-year old patient with chronic destructive pneumonia". *BMC Microbiol.* 10 (Jan. 2010b): 23. DOI:10.1186/1471-2180-10-23.
- Trap, D., and Gaumont R. "Le diagnostic serologique de la brucellose bovine et ovine par l'epreuve a l'antigene tamponne". *Dev. Biol. Stand.* 31(1975): 136-140.
- Traum J. "Report of the chief of the bureau of animal industry". USDA. Washington, DC. (1914):30-5.
- Traxler Rita M., Lehman Mark W., Bosserman Elizabeth A., Guerra Marta A., Smith Thereza L. „A literature review of laboratory-acquired brucellosis" *J of Clin Microbiol* 51, 9 (Sep. 2013):3055-3062. DOI:10.1128/JCM.00135-13.
- Verger Jean-Michel, Grimont Francine, Grimont Patrick AD, and Grayon Maggy. "*Brucella* A monospecific genus as shown by deoxyribonucleic acid hybridization". *Int J Syst Bacteriol* 35, 3 (July 1985):292-5. DOI:10.1099/00207713-35-3-292.
- Weiner Marcin, Wojciech Iwaniac and Krzysztof Szulowsky. "Comparison of PCR-based AMOS, Bruce-Ladder, and MLVA assays for typing of brucella species". *Bull Vet Inst Pulawy* 55, 4 (Jan. 2011): 625-630.
- Weynants V, Tibor A, Denoel PA, Saegerman C, Godfroid J, et al. "Infection of cattle with *Yersinia enterocolitica* O:9 a cause of the false positive serological reactions in bovine brucellosis diagnostic tests". *Veterinary Microbiology* 48, 1-2 (Jan. 1996): 101–112.
- Whatmore Adrian M, Dawson Claire, Groussaud Pauline, Koylass Mark S, King Amanda, Shankster Stephen J, Sohn Annette H, Probert Will S, and McDonald Wendy L. "A marine mammal *Brucella* genotype associated with zoonotic infection". *Emerg Inf Dis.* 14, 3 (Mar. 2008):517-518. DOI:10.3201/eid1403.070829.



- Whatmore Adrian M, Perrett Lorraine L, and Macmillan Alastair P. “Characterisation of the genetic diversity of *Brucella* by multilocus sequencing”. BMC Microbiol. 7 (Apr. 2007):34. DOI:10.1186/1471-2180-7-34.
- Whatmore Adrian M., Dale Emma-Jane, Stubberfield Emma, Muchowski Jakub, Koylass Mark, Dawson Claire, et al. “Isolation of *Brucella* from a White's tree frog (*Litoria caerulea*)”. JMM Case Rep. (2015):2. DOI:10.1099/jmmcr.0.000017.
- Whatmore, Adrian M., Davison, Nicholas, Cloeckert, Axel, Al Dahouk, Sascha, Zygmunt, Michel. S., Brew, Simon D., Perrett, Lorraine L., Koylass, Mark. S., Vergnaud, Gilles, et al., “*Brucella papionis* sp. nov. isolated from baboons (*Papio* spp.)”. Int J Syst Evol Microbiol 64 (Pt 12) (Dec. 2014):4120–4128. DOI:10.1099/ijms.0.065482-0.
- Wright A.E. and Smith F. “On the application of the serum test to the differential diagnosis of typhoid and Malta fever”. Lancet 1(1897):656-9.
- Wyatt HV. “Lessons from the history of brucellosis”. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz., 32, 1(Apr. 2013): 17-25.
- Xavier, Mariana N, Silva, Teane MA, Costa, Erica A, Paixao Tatiane A, Moustacas Valeria S, et al. “Development and evaluation of a species-specific PCR assay for the detection of *Brucella ovis* infection in rams”. Vet. Microbiol. 145, 1-2 (Sep. 2010b): 158-164. DOI:10.1016/j.vetmic.2010.02.037.
- Xavier, Mariana N., Paixao, Tatiane A., Hartigh, Andreas B., Tsohis, Renee M. and Santos, Renato L. “Pathogenesis of *Brucella* spp”. The Open Veterinary Science Journal, 4 (2010a): 109-118. DOI:10.2174/1874318801004010109.
- Yagupsky Pablo and Baron Ellen Jo “Laboratory exposures to brucellae and implications for bioterrorism”. Emerg Infect Dis 11, 8 (Aug. 2005): 1180–1185. DOI:10.3201/eid1108.041197.
- Yu, Wei Ling and Nielsen, Klaus “Review of Detection of *Brucella* spp. by Polymerase Chain Reaction”. Croat Med J. 51, 4 (Aug. 2010): 306-313. DOI:10.3325/cmj.2010.51.306.
- Zammit T, and Caruana Scicluna G. “Intermittent fever in Malta”. BMJ. 1 (1905):711.cited in Wyatt HV. “Sir. Themistocles Zammit: his medical and scientific career” Malta Medical Journal 22, 01 (2010): 38-43.
- Zowghi E., Ebadi A. and Mohseni B. “Isolation of *Brucella* organisms from the milk of seronegative cows” Rev. sci. tech. Off. Int. Epiz. 9, 4 (Dec.1990): 1175-1178.
- Zowghi, E. and Ebadi, A. “Naturally Occurring *Brucella melitensis* infection in cattle in Iran”. Revue of Scientific Technics Office International de Epizeoties, 4 (1985): 811-814.

- Абиджанов М.С. Гринько В.К., Назарова С.А. *Розбенгал проба в диагностике бруцеллёза животных*. Ташкент, 1980.
- Авилов В.М., Косилов И.А., Аракелян П.К. «Состояние и перспектива специфической профилактики бруцеллеза овец». *Ветеринария*, 3 (1999): 8-12.
- Белозеров Е. Г. *Бруцеллез мелкого рогатого скота*. Москва: Медицина, 1985.
- Вершилова П.А. *Бруцеллёз*. Москва: Медицина, 1961.
- Вершилова П.А. *Бруцеллёз*. Москва: Медицина, 1972.
- Вершилова П.А., Князева З.Н., Чернышева М.И. *Патогенез и иммунология бруцеллеза*. Москва: Медицина, 1974.
- Вессели Ю.И. «К вопросу о передаче бруцеллёза от человека человеку». *Клин. мед.*, 2(1936): 273.
- Вышелесский С.М. *Бруцеллез сельскохозяйственных животных*. Медицина, 1955.
- Глухова В.Н. Влияние бруцеллёза на основные половые функции женского организма. *Тр. Сталингр. мед. инст.* 8 (1951): 213.
- Дегтяренко Л.В., Кондауров Б.И. „Получение и испытание бруцеллезного антигена, окрашенного розовым бенгальским для пластинчатой реакции агглютинации”. *Сб. науч. Работ*. Новосибирск: Нестор, 1978.
- Орлов Е.С. «Бруцеллёз». *В. кн. болезни птиц*. Москва 1962.
- Ременцова М.М. Бруцеллёз диких животных. Алма-Ата: Академия наук, 1962.
- Степанов Н.Н. «Эпидемиология бруцеллёзов Туркмении». *Тр. Туркм. гос. мед. инст.*, 1951.
- Таран И.Ф., Лямкин Г.И. «Бруцеллез» (*микробиология, иммунология, эпидемиология, профилактика*). Ставрополь: БОТХН, 1996.
- Харлампович С.И. «К вопросу о бруцеллёзе диких животных в Туркмении». *природная очаговость болезней человека и краёваиа эпидемиология*. 1955.
- Яковлев А.Г., Шенков Н.В., Ярцева Н.Н. «Персистентные свойства *Brucella abortus*, выделенных из разных источников» *Ж. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* 4 (2002): 123-124.

## Molecular-Genetic study of *Brucella melitensis* strains isolated in Georgia

### Summary

**Introduction.** Brucellosis has been one of the wide-spread economically prejudicial infectious disease known since ancient period.

Brucellosis was described even by Hipocrates (B.C. 460-377). Scientific study of disease has started since the mid. 19<sup>th</sup> century, in particular, since 1887, when English military physician David Bruce isolated pure culture from the spleen of the soldier, being dead in Malta and named it *Micrococcus melitensis*.

At the beginning of the 21<sup>st</sup> century, brucellosis still remains one of the urgent problems for public health care and veterinary in many countries of the world. Basing on the data reported by WHO, approximately 500 000 humans are affected by brucellosis all over the world annually. *Brucella* are found on every continent.

*Brucella* genus includes 10 species: *B. melitensis* biovar 1-3, *B. abortus* biovar 1-6, 9, *B. suis* biovar 1-5, *B. canis*, *B. ovis*, *B. neotomae*, *B. maris* – *B. pinnipediae* and *B. cetaceae*, *B. microti*, *B. inopinata*.

The major causatives of brucellosis in a human are the following species: *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis* (biovar 1-4), rarely *B. canis* and *B. maris*, but human diseases caused by *B. ovis*, *B. neotomae* and *B. suis* biovar-5 haven't been reported.

The leading role belongs to brucellosis caused by the strains of *Brucella melitensis*, that are worldwide spread and affect both animal and human health. In comparison with the other *Brucella* species, for human, *Brucella melitensis* is the most virulent and characterized by severe run, but in animals it causes infertility and milk reduction.

Georgia is endemic focus for brucellosis. Cases of human and animal diseases are found throughout the country, but spread intensity is unequal.

As a result of animal serological research on brucellosis performed by National Food Agency throughout the Georgia in 2011 the affected small ruminants and cattle were revealed in 15 regions of Georgia.

Nowadays, there's a tendency for increasing risk factors of human and animal diseases. The probable cause of the above-mentioned may be lack of proper veterinary

surveillance, absence of vaccination and incomplete animal registration in the country within last decades.

It must be taken into account, that the discussion on real epizootic state of brucellosis is still difficult in our country, since the massive examination of cattle has started only since 2014 gradually in a number of regions and according to the current data the whole Georgia hasn't been involved in this process yet and also massive examinations in small ruminants haven't been carried out yet.

In many countries of the world, including nearby countries of Georgia, brucellosis spread and existence of undesirable foci points to the fact, that, there's an urgent need for performing veterinary sanitation measures against the disease. It's particularly important to carry out such measures in Georgia, playing a role of transit country, leading to the necessity for creating buffer zone for brucellosis as an especially dangerous infectious disease.

The above-mentioned points to the need for performing researches associated with brucellosis in Georgia.

Basing on the historical reports it was known, that *B. abortus* was circulating in east Georgia and *B. melitensis* – west Georgia. Though, these data weren't confirmed by molecular-genetic study. That's why it was very interesting to define *Brucella* species really circulating in Georgia today. For this purpose our goal was isolation and their characterization by current (molecular-genetic) techniques.

**Goal:** The key goal of research was to isolate *Brucella melitensis* strains in Georgia within 2009-2011 and their genetic characterization. The following particular tasks were determined to be fulfilled:

1. Study of statistic data on brucellosis spread in domestic animals (2007-2012).
2. Screening (Rose Bengal test) of domestic animals with brucellosis. Confirmation of brucellosis in small ruminants (Rose Bengal test, C-ELISA and FPA).
3. Development of accelerated modification of agglutination reaction and evaluation of its diagnostic value.
4. Isolation of causative cultures of brucellosis from animals and their molecular-genetic study.
5. Determination of peculiarities of *Brucella* strains spread in Georgia regions.

**Methods:** The research work connected with the given subject was performed in NCDC, LTD „Immunogen” and LMA using current methods meeting biosafety standards.

Research sample size was calculated by the version C survey-2.0 of computer software.

Within the research work collected sera of small ruminants and cattle were studied using the following methods: Rose Bengal test, Accelerated agglutination reaction modified by us, tube (Wright) agglutination reaction, C-ELISA and FPA.

To recover *Brucella* cultures the animal samples were plated on both, *Brucella* selective and non-selective media. The isolated cultures were stained by Gram's method and studied by biochemical techniques according to the algorithm suggested by DTRA and their belonging to the genus *Brucella* was confirmed using real-time PCR.

Because of the actual worldwide problem of antibiotic resistance, we studied antibiotic sensitivity to the isolated cultures. Antibiotic sensitivity was evaluated according to CLSI standards evaluation zones.

For differentiation of *Brucella* species the isolated strains were typed by AMOS PCR and SNP methods and characterized by MLVA-8 method using capillary phoresis apparatus and dendrogram was built up by means of BioNumerics software version 6.1.

To evaluate affection risk of small ruminant and cattle in the regions of Georgia statistical analysis of the obtained results was performed by SPSS version 20 software. To make up maps ArcGIS 10.2 version was used.

**Results:** Within the research work, as a result of testing 991 samples of blood sera (627 cattle, 333 sheep and 31 goat) by Rose Bengal test, 19.07% of animals turned out to have positive response. Out of which 13.74% were small ruminants and 22.17% cattle.

To evaluate affection risk of small ruminant and cattle in the regions of Georgia as a result of statistic analysis of the research outcomes the highest morbidity rate in cattle was revealed in Mtskheta-Mtianeti (OR=2,64; CI – 1,63-4,43) and Kakheti (OR=2,17; CI – 1,10-4,28), but in small ruminants - in Tbilisi municipality (OR=12,53; CI – 2,39-65,58) Kvemo Kartli and Samtskhe-Javakheti (OR=1.65; CI – 0,29-9,40).

19.07% of sera positive By Rose Bengal assay, were parallelly studied by accelerated agglutination reaction and similar results were obtained.

Of 991 sera, 33 sheep ones were studied in the LMA by confirmatory competitive ELISA and Fluorescence Polarization assay (FPA) and in consequence of which 22 confirmed to be positive and 11 equivocal responses were evaluated as negative.

We parallelly studied the above-mentioned 33 sheep sera by accelerated agglutination reaction and obtained identical results (22 positive and 11 negative) confirmed by C-ELISA and FPA.

20 sheep sera were studied by accelerated agglutination and tube agglutination reactions and again in this case identical results were obtained, which proves reliability of the accelerated agglutination reaction developed within the research work. Along with this, suggested modification reduces the time duration required for research and unlike Rose Bengal test it gives a possibility to determine titres of antibodies in 5-6 minutes.

In addition, unlike Rose Bengal test the above-mentioned test gives an opportunity for both, qualitative (positive, negative) and quantitative (titre) evaluation. If necessary, accelerated agglutination reaction may replace Rose Bengal test as well as Wright reaction. It's also remarkable, that preparation of diagnosticum for accelerated agglutination reaction is possible in Georgia, which will significantly reduce research expenses in comparison with import commercial diagnosticums.

Out of 405 samples of pathological material taken from serologically positive and randomly selected cattle and small ruminants morphologically *Brucella*-like 13 isolates were recovered out of which 5 were typed as *B. abortus*, 3 – *B. melitensis* and typing of 5 cultures (*Brucella* spp.) was unable. It's remarkable that the given 5 cultures were more or less different from the other cultures by morphological (comparatively large, rough coccobacilli), cultural (comparatively large-sized, mucous colonies), serological (absence of agglutination with *Brucella* positive polyclonal serum) properties. Further molecular-genetic study demonstrated that given cultures belonged to the genus *Ochrobactrum*. As a result of biochemical study of 13 isolated cultures, all isolates turned out to be oxidase and catalase positive and TSI (Triple Sugar Iron Agar) negative which is characteristic to *Brucella* cultures. Out of 13 isolates, 4 turned out to be urease negative, but all cultures produced H<sub>2</sub>S. As a result of agglutination of 13 isolates with *Brucella* positive polyclonal serum, 8 isolates were positive and 5 negative and in consequence of interaction with acriflavine all isolates were homogenous.

In consequence of studying 13 strains isolated within the research process by real-time PCR all cultures belonged to genus *Brucella*. Using AMOS PCR able to differentiate isolated strains by species, 3 isolates were typed as *B. melitensis*. Due to certain limits of the

given research method all isolates couldn't be identified, thus it was predicted that non amplified strains would belong to other biovars of different species. To prove this conception all 13 isolates were studied by SNP. Also DNAs of 8 *B. melitensis* cultures isolated by LMA within GG-17 project and confirmed by AMOS PCR but not studied by SNP were included into the research. The obtained results proved our opinion that the given strains belonged to the *B. melitensis* species, but SNP profile of DNA of 5 strains untyped by AMOS PCR turned out to be identical to profile of control *B. abortus* species. The rest 5 strains (*Brucella* spp.) couldn't be typed by SNP method. Later, these isolates were identified as representatives of genus *Ochrobactrum* by K. Sidamonidze using Whole Genome Sequence. At the following stage of the research in order to reveal possible differences inside the species of the isolated *Brucella* strains and classify them into subgroups 11 *B. melitensis* and 5 *B. abortus* strains isolated within the research work were characterized by MLVA-8 method, where DNAs of *B. ovis* and *B. abortus* S19 were used as controls.

On the base of Dendrogram built up by BioNumerics v.6.1 software 2 large branches (*B. melitensis* and *B. abortus*) were obtained, which were divided into 9 sub-groups (5 *B. abortus*, 4 *B. melitensis*). Certain interest was focused on single strain of *B. melitensis* and *B. abortus*, which differed from the rest of sub-groups only by one locus and so we considered it to be reasonable to classify them as separate sub-groups.

Basing on the results of molecular-genetic researches carried out by us, we can suppose, that *B. abortus* 3, 5, 6 and/or 9 biovars are more frequently spread, than *B. abortus* 1, 2 and 4 in Georgia. It's remarkable, that according to the available literature, reports in our neighbour countries, in Turkey and Russia, majority of isolated cultures are typed as biovar-3 of *B. melitensis* and *B. abortus* (there's no information about cases in Azerbaijan and Armenia). Basing on this fact, we can say, that application of AMOS PCR method is limited not only in our country, but in other neighbor countries too.

In conclusion, it's remarkable that antibiotic resistance is the most actual problem in human and veterinary medicine all over the world today. In veterinary, antibiotic resistance has been less studied, than in healthcare. Particularly, little is known about the antibiotic resistance against *Brucella* strains. Since, brucellosis is a zoonotic disease, animal *Brucella* strains circulate in humans too respectively. For this purpose, within the research work we studied antibiotic sensitivity to isolated cultures. Particular attention must be paid to the

antibiotics which are used in dealing with brucellosis in humans (rifampicin, gentamicin, streptomycin, tetracycline, doxycycline, chloramphenicol and tobramycin). As a result of study of antibiotic sensitivity against *Brucella* strains isolated within our research work it turned out that resistance tendency to therapeutic preparations was revealed mainly in *Brucella abortus* and *Brucella* spp. (*Ochrobactrum* representatives) strains. This fact must be foreseen while selecting therapeutic antibiotics and also it points to an urgent need of routine epid surveillance of antibiotic resistance not only in healthcare system, but also in veterinary field.

**Conclusion:**

- Evidences of the molecular-genetic research first have confirmed the existence of *B. melitensis* and *B. abortus* strains circulating in the area of Georgia.
- Dendrogram constructed using MLVA-8 method, detected their genetic diversity and necessity for continuation of a large-scale molecular-biological researches in this direction.
- Modification of accelerated agglutination reaction developed within the research, demonstrated, that its involvement in the complex of researches for *Brucella* laboratory diagnostic is reasonable, since it is reliable, cheap, rapid and simply performed test and unlike Rose Bengal test it gives possibility for defining antibody titres in a short time.
- Application of MLVA method in the daily practice of healthcare and veterinary reference laboratories will allow to determine causative identification, source of infection and infection spread ways.