

ივანე ჯავახიშვილის სახელობის თბილისი სახელმწიფო უნივერსიტეტი მედიცინის
ფაკულტეტი

ქეთევან სიდამონიძე

საქართველოში გამოყოფილი *Brucella*-ს შტამების შესწავლა,
მოლეკულური ტიპირება და ფილოგენეტიკური ანალიზი

მედიცინის დოქტორის აკადემიური ხარისხის მოსაპოვებლად წარმოდგენილი
დისერტაცია

სამეცნიერო ხელმძღვანელი

შოთა ცანავა

მედიცინის აკადემიური დოქტორი, ასოცირებული პროფესორი
ივანე ჯავახიშვილის სახელობის თბილისის სახელმწიფო უნივერსიტეტის მედიცინის
ფაკულტეტის საზოგადოებრივი ჯანდაცვის დეპარტამენტი

თბილისი, 2018 წელი

სარჩევი

1. შესავალი	4
1.1. აქტუალობა	4
1.2. მიზანი.....	5
1.3. ამოცანები	5
1.4. მეცნიერული სიახლე	5
2. ლიტერატურული მიმოხილვა	6
2.1. ისტორიული ექსკურსი	6
2.2. ბრუცელოზის ეტიოლოგია.....	7
2.3. ბრუცელოზის ეპიდემიოლოგია	9
2.4. ბრუცელოზის კლინიკა	12
2.5. ბრუცელოზის გავრცელება მსოფლიოში	14
2.6. ბრუცელოზის გავრცელება საქართველოს მოსაზღვრე ქვეყნებში	16
2.7. ბრუცელოზის გავრცელება საქართველოში	18
2.8. ბრუცელოზის ვაქცინაცია	20
2.9. ბრუცელოზის ლაბორატორიული დიაგნოსტიკა.....	21
2.10. ბრუცელას შტამების მოლეკულური გენოტიპირება	21
3. კვლევის მასალა და მეთოდები	26
3.1. შემოსული ნიმუშების პირველადი დამუშავება.....	26
3.2. სეროლოგიური დიაგნოსტიკა.....	27
3.3. ბაქტერიოლოგიური კვლევები	28
3.4. მოლეკულური კვლევები	30
3.4.1. დნმ-ის ექსტრაქცია	30
3.4.2. პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქცია რეალურ დროში	30
3.4.3. AMOS პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქცია (AMOS პჯრ).....	32
3.4.4. ერთ-ნუკლეოტიდური პოლიმორფიზმი (SNP).....	34
3.4.5. მრავლობითი ლოკუსების ტანდემურად განმეორებადი თანამიმდევრობების ცვლადი რაოდენობის ანალიზი	41
3.4.6. Brucellader პჯრ.....	48

3.4.7.	დნმ-ის ექსტრაქცია სრული გენომური სექვენირებისათვის	51
3.4.8.	სრული გენომის სექვენირება	53
4.	კვლევის შედეგები.....	55
5.	შედეგების განხილვა.....	86
6.	დასკვნები.....	92
7.	პრაქტიკული რეკომენდაციები.....	92
8.	ლიტერატურა	93
9.	დანართი 1. სადისერტაციო ნაშრომის ინგლისურენოვანი რეზიუმე.....	105
10.	დანართი 2. საერთაშორისო ჟურნალებში გამოქვეყნებული შრომები	110
11.	დანართი 3. საერთაშორისო კონფერენციებზე წარდგენილი მოხსენებები	111

1. შესავალი

1.1. აქტუალობა

ბრუცელოზი გლობალურად გავრცელებული ზოონოზური დაავადებაა, რომლითაც ყოველწლიურად 500.000-ზე მეტი ადამიანი ავადდება და იწვევს სოფლის მეურნეობაში მნიშვნელოვან ეკონომიკურ ზარალს. ბრუცელა მისი ზოგიერთი სახეობის მაღალი ინფექციურობის გამო ადამიანისთვის მე-3 რისკ-ჯგუფის ბიოლოგიური საფრთხის პათოგენს მიეკუთვნება.

ბრუცელოზი საქართველოში ენდემური დაავადებაა. მისი კერები უპირატესად აღმოსავლეთ საქართველოში გვხვდება. ბრუცელოზის გავრცელების ინტენსიური შესწავლა საქართველოში დაიწყო მეოცე საუკუნის 30-იანი წლებიდან. უკანასკნელ წლებში ბრუცელოზის შემთხვევები საქართველოს ყველა რეგიონში ფიქსირდება და შემთხვევების კლების ტენდენცია არ ფიქსირდება. ბრუცელოზი ასევე ენდემურია საქართველოს მეზობელი ქვეყნებისთვისაც (სომხეთი, აზერბაიჯანი, თურქეთი და რუსეთი).

ბრუცელას შტამების დახასიათება სახეობის და ბიოვარის დონეზე შესაძლებელია სხვადასხვა მიკრობიოლოგიური მეთოდებით. ამასთან, ბიოტიპირების ეს მეთოდები დიდ დროს მოითხოვს და პოტენციურად საშიშია ლაბორატორიის პერსონალისთვის. ზოგიერთ სახეობასა და ბიოვარს შორის შეზღუდულმა ვარიაციებმა კი შეიძლება გამოიწვიოს ურთიერთსაწინააღმდეგო მონაცემები და გაართულოს მიღებული შედეგების ინტერპრეტაცია. სწორედ ამიტომ ბიოტიპირების ბაქტერიოლოგიური მეთოდები ნაკლებად გამოიყენება იმ ეპიდემიოლოგიური კვლევებისათვის, სადაც აუცილებელია ბრუცელოზის გამომწვევის უფრო ზუსტი იდენტიფიკაცია. აქედან გამომდინარე, მიზანშეწონილია ბრუცელას შტამების გენეტიკური დახასიათება თანამედროვე მოლეკულური მეთოდების საშუალებით.

1.2. მიზანი

საქართველოში ბრუცელოზის ზედმხედველობისათვის თანამედროვე მოლეკულური მეთოდების შემუშავება და დანერგვა.

1.3. ამოცანები

- საქართველოში უკანასკნელ წლებში გამოყოფილი ბრუცელას შტამების მოლეკულური მეთოდებით შესწავლა;
- ბრუცელას სხვადასხვა სახეობის შტამების გენოტიპირების მეთოდების შედარებითი ანალიზი;
- საქართველოში მოცირკულირე ბრუცელას შტამების გენეტიკური მრავალფეროვნების შესწავლა;
- *Brucella melitensis* და *Brucella abortus*–ის შტამების სრული გენომური სექვენირება და ფილოგენეტიკური ანალიზი.

1.4. მეცნიერული სიახლე

პირველად გენეტიკურად დადასტურა საქართველოში, *Brucella*-ს ორი სახეობის (*B. abortus* და *B. melitensis*) აქტიური ცირკულაცია.

მრავლობითი ლოკუსების ტანდემურად განმეორებადი თანმიმდევრობების ცვლადი რაოდენობის ანალიზის (MLVA) ტიპირებით დადგინდა საქართველოში მოცირკულირე *B. abortus*-ის და *B. melitensis* -ის შტამების გენეტიკური მრავალფეროვნება;

სრული გენომური სექვენირებისა და ფილოგენეტიკური ანალიზის საშუალებით დადგინდა საქართველოში გამოყოფილი ბრუცელას შტამების გენეტიკური პროფილის სიახლოვე მსოფლიოს სხვადასხვა ადგილებში გავრცელებულ ბრუცელას შტამებთან;

ბრუცელას შტამების MLVA ტიპირებით დადგინდა საქართველოსა და თურქეთს შორის ბრუცელას შტამების მიგრაცია;

საქართველოში ბრუცელოზის ზედმხედველობისათვის შემუშავდა თანამედროვე მოლეკულური მეთოდები.

2. ლიტერატურული მიმოხილვა

2.1. ისტორიული ექსკურსი

ბრუცელოზი თითქმის მთელ მსოფლიოში გავრცელებული ზოონოზური ინფექციაა, რომლის კლინიკური სიმპტომებიც ცნობილია ჰიპოკრატეს დროიდან.¹ ვიდრე ბრუცელოზის ეტიოლოგია დადგინდებოდა, დაავადების დასახელებას უკაბშირებდნენ მის გეოგრაფიულ გავრცელებას (მალტის, გიბრალტარის, ხმელთაშუა ზღვის, კვიპროსის, კრეტის ცხელება) ან კლინიკურ ნიშნებს (ტალღისებური, ინტერმისიული, ტიფომალარიული და ფუკომალარიული ცხელება).²

დამოუკიდებელ ნოზოლოგიურ ერთეულად ბრუცელოზი (მალტის ცხელების სახელით) დიფერენცირებულ იქნა 1861 წელს ჯეფრი ალან მარტსონის (Jeffrey Alan Marston) მიერ. 1887 წელს დევიდ ბრიუსმა (David Bruce) პირველად გამოყო ბრუცელოზის გამომწვევი გარდაცვლილი პაციენტის ელენთიდან და მას *Micrococcus melitensis* უწოდა (შემდგომში ბრიუსის პატივსაცემად *Brucella melitensis* ეწოდა).^{3,4} 1897 წელს ბერნარდ ბანგმა (Bernard Bang) ძროხებიდან ეპიზოოტიური აბორტის დროს გამოყო მიკროორგანიზმი, რომელსაც უწოდა *Bacterium abortus bovis*. 1914 წელს ტრაუმმა (Traum) აბორტირებული ღორიდან გამოყო ბრუცელას მესამე სახეობა და უწოდა *Bacterium abortus suis*.⁵ 1920 წელს მეიერმა (Karl Meyer) და შოუმ (Shaw) სამივე მიკრობი: *Micrococcus melitensis*, *Bacterium abortus bovis* და *Bacterium abortus suis* ერთ ჯგუფში გააერთიანა, საერთო სახელწოდებით *Brucella*.⁶

XX საუკუნის 50-იან წლებში ახალ ზელანდიაში ბადლმა (Buddle) და ავსტრალიაში სიმონსმა (Simmons) და ჰალმა (Hall) გამოყვეს მიკროორგანიზმი, რომელიც ცხვრებში

იწვევდა ეპიდემიის. ბადლიმ აღნიშნული მიკროორგანიზმი მიაკუთვნა ბრუცელას გვარს და უწოდა *Brucella ovis*.⁷

1957 წელს სტონერმა (Stoenner) და ლეკმანმა (Lackman) აშშ-ში უდაბნოს ვირთაგვებისაგან გამოყვეს მიკროორგანიზმი, რომელიც ბრუცელას იდენტური აღმოჩნდა და *Brucella neotomae* უწოდეს.⁸ 1966 წელს კარმაიკლმა გამოყო ძაღლებში ბრუცელოზის გამომწვევი და *Brucella canis* უწოდა.⁹

1897 წელს ელმროტ რაიტმა (Almroth Wright), დევიდ სემპლემ (David Semple) და ჰორტონ სმიტმა (Horton Smith) დაადგინეს, რომ ბრუცელოზით დაავადებული ადამიანის სისხლის შრატს შეუძლია მოახდინოს ძაღლის მიკროკოკის კულტურის აგლუტინაცია, რაც საფუძვლად დაედო ბრუცელოზის სეროდიაგნოსტიკას (რაიტის რეაქცია).¹⁰

2.2. ბრუცელოზის ეტიოლოგია

ბრუცელოზის გამომწვევი ბაქტერიები მიეკუთვნებიან გვარს *Brucella*, რომელშიც დღეისათვის 10 სახეობა შედის: *B. melitensis* (3 ბიოვარი), *B. abortus* (7 ბიოვარი), *B. suis* (5 ბიოვარი), *B. canis*, *B. ovis*, *B. neotomae*, *B. ceti*, *B. pinnipediae*, *B. microti* და *B. inopinata*^{11,12} ადამიანისათვის მაღალპათოგენურად ითვლება *B. melitensis* და *B. suis*, ზომიერად პათოგენურად *B. abortus* და *B. canis*.¹³

ბრუცელები გრამუარყოფითი ბაქტერიებია, არ წარმოქმნიან სპორებს. ახასიათებთ პოლიმორფიზმი - კოკისებური და ჩხირისებური ფორმები, ზომით 0,5 – 0,7 X 0,6 – 1,5 მკმ.^{14,15} ბრუცელებს შეუძლიათ რევერსია S-, R- და L- ფორმებში, არსებობა როგორც უჯრედის შიგნით, ასევე უჯრედის გარეშე. ბრუცელების გენომის საშუალო მოლეკულური მასა 2,37X10⁹ დალტონია.¹⁶

ბრუცელები ევზოტოქსინს არ გამოიმუშავენ. მათი დაშლის შედეგად გამოიყოფა ენდოტოქსინი. ბრუცელების პათოგენურობის ძირითადი ფაქტორებია: ენდოტოქსინი,

ჰემოლიზინები, ადენინის და გუანინის მონოფოსფატი, რომლებიც აინჰიბირებენ ფაგოსომურ ენზიმებს და განაპირობებენ ფაგოციტოზისადმი მდგრადობას.¹⁷

ბრუცელები ნაკლებად გამძლენი არიან მაღალი ტემპერატურისადმი. თხევად გარემოში +60°C-ზე იღუპებიან 30 წუთში, +80-85°C-ზე 5 წუთში, +100°C-ზე მაშინვე. გააჩნიათ მდგრადობა დაბალი ტემპერატურისადმი. ხანგრძლივი დროის მანძილზე ინარჩუნებენ სიცოცხისუნარიანობას მაცივარში შენახულ საკვებ პროდუქტებში. მზის პირდაპირი სხივების ზემოქმედებით იღუპებიან 4-5 საათში, სიცოცხისუნარიანობას ნიადაგში და წყალში ინარჩუნებენ დაახლოებით 100 დღის მანძილზე. ცხოველურ ნედლეულში ორი კვირიდან ოთხ თვემდე. ბრუცელები მგრძობიარენი არიან სხვადასხვა დეზინფექტანტების მიმართ. ფენოლის 2%-იანი ხსნარის ან ლიზოლის 3%-იანი ხსნარის ზემოქმედების შედეგად იღუპებიან რამდენიმე წუთში. ბრუცელოზზე საექვო მასალის დათესვა წარმოებს შოკოლადისებრ, მაკ-კონკის და ბრუცელას სელექტიურ საკვებ ნიადაგებზე. ბრუცელებს ბიოქიმიური აქტივობა სუსტად აქვთ გამოხატული; შედეგებულ შრატს და ჟელატინს არ ალღობენ, ინდოლს არ წარმოქმნიან და რძეს არ ადედებენ. გოგირდწყალბადის წარმოქმნა სახეობრივი თვისებაა. ზოგიერთი შტამი შლის გლუკოზას, არაბინოზას, გალაქტოზას, ქსილოზას და ლევულოზას. ასევე დამახასიათებელია კატალაზური აქტივობა.¹⁸

ცხრილი 1. ბრუცელას სახეობების კოლონიების მორფოლოგია და ბიოქიმიური აქტივობა

ბრუცელას სახეობა	კოლონიების მორფოლოგია	ოქსიდაზა	ურეაზული აქტივობა
<i>B. abortus</i>	გლუვი	+	+
<i>B. suis</i>	გლუვი	+	+
<i>B. melitensis</i>	გლუვი	+	+
<i>B. neotomae</i>	გლუვი	-	+
<i>B. ovis</i>	ხორკლიანი	-	-

<i>B. canis</i>	ხორკლიანი	+	+
<i>B. ceti</i>	გლუვი	+	+
<i>B. pinnipedialis</i>	გლუვი	+	+
<i>B. microti</i>	გლუვი	+	+
<i>B. inopinata</i>	გლუვი	+	+

2.3. ბრუცელოზის ეპიდემიოლოგია

ბრუცელოზის რეზერვუარია ცხვრები, თხები, ძროხები, ღორები. შედარებით იშვიათად ინფექციის წყარო შეიძლება იყვნენ ჩრდილოეთის ირმები, ცხენები, აქლემები და იაკები, რომლებიც რძესთან, შარდთან და ფეკალურ მასებთან ერთად გამოყოფენ ბრუცელებს. ადამიანებში ყველაზე ხშირად ბრუცელოზს იწვევს *B. abortus* და *B. melitensis*.¹⁹

ცხრილი 2. ბრუცელას სახეობები და მათი ძირითადი რეზერვუარები

ბრუცელას სახეობები	ძირითადი რეზერვუარი
<i>B. melitensis</i>	ცხვარი, თხა
<i>B. abortus</i>	მსხვილი რქოსანი პირუტყვი
<i>B. suis</i>	შინაური და გარეული ღორი, კურდღელი, ჩრდილოეთის და კანადის ირემი, მღრღნელები
<i>B. neotomae</i>	უდაბნოს ტყის ვირთაგვა
<i>B. ovis</i>	ყოჩი
<i>B. canis</i>	ძაღლი
<i>B. ceti</i>	ვეშაპისნაირები
<i>B. pinnipedialis</i>	ბრტყელტერფა ცხოველები
<i>B. microti</i>	ნიადაგი, ვირთხა, მელია
<i>B. inopinata</i>	უცნობია

ადამიანის ბრუცელოზით დაინფიცირება უპირატესად ხდება ფეკალურ-ორალური გზით. შესაძლებელია ასევე კონტაქტური (დაზიანებულ კანსა და ლორწოვან გარსებზე ბრუცელოზის გამომწვევის მოხვედრა) და აეროგენული გზით დაინფიცირებაც. ყველაზე მეტ საშიშროებას წარმოადგენენ ბრუცელოზით დაავადებული მსხვილფეხა და წვრილფეხა პირუტყვის უმი რძე და რძის პროდუქტები, ხორცი და ნედლეული (ტყავი, ბეწვეული). ბრუცელოზით დაავადებული ცხოველები ბრუცელებით აბინძურენ წყალს და ნიადაგს, რამაც შემდგომში აგრეთვე შეიძლება განაპირობოს ადამიანის დაინფიცირება. ასპირაციული გზით ბრუცელოზით დაინფიცირება შესაძლებელია ცხვრის გაკრეჭვის, ბეწვის და ტყავის დამუშავების დროს. ბრუცელებმა შეიძლება ორგანიზმში შეაღწიონ თვალის კონიუქტივის ლორწოვანი გარსის საშუალებითაც. აღწერილია ლაბორატორიული პერსონალის ბრუცელოზით აეროგენული დაინფიცირების შემთხვევები. ცნობილია ადამიანთა წყლის საშუალებით ბრუცელოზით დაინფიცირების შემთხვევები, თუმცა ეპიდემიოლოგიური თვალსაზრისით, ინფექციის გავრცელების აღნიშნული გზა უმნიშვნელოა.¹⁸

ბრუცელოზით უპირატესად ავადდებიან სასოფლო-სამეურნეო ცხოველები: ცხვრები, თხები, მსხვილფეხა რქოსანი პირუტყვი, ღორები, აქლემები, ჩრდილოეთის ირმები და სხვა. ცხოველების ყოველი სახეობა, როგორც წესი, ინფიცირდება ბრუცელების განსაზღვრული სახეობით. ამასთან, *B. melitensis* და *B. abortus* შეუძლიათ მიგრირება სხვა სახეობის ცხოველებშიც. განსაკუთრებული მნიშვნელობა გააჩნია *B. melitensis* მიგრაციას მსხვილფეხა რქოსანი პირუტყვში. მსხვილფეხა რქოსანი პირუტყვიდან *B. suis* ბიოვარი 1 გამოიყო ავსტრალიაში,²⁰ ჩრდილოეთ ამერიკაში^{21,22} და სამხრეთ ამერიკაში,^{23,24,25} *B. suis* ბიოვარი 2 კი ევროპაში (პოლონეთსა და დანიაში).^{26,27}

ცხოველთა დაცვის მსოფლიო ორგანიზაციის მონაცემებით, უკანასკნელ წლებში სოფლის მეურნეობის ცხოველებს შორის ბრუცელოზის შემთხვევები მხოლოდ 38

ქვეყანაში არ აღირიცხება. ევროკავშირის ქვეყნების უმრავლესობაში მსხვილფეხა რქოსანი პირუტყვის ბრუცელოზით ავადობა ლიკვიდირებულია და ევროკავშირის 64/432/EEC დირექტივის თანახმად ითვლებიან „მსხვილფეხა რქოსანი პირუტყვის ბრუცელოზისაგან თავისუფლად“.²⁸

ამერიკელი და ბრიტანელი მეცნიერების მიერ დადგინდა *B. maris* ციკლაცია ზღვის ძუძუმწოვრებს შორის. კერძოდ, ქვესახეობა *B. pinnipedialis* ფეხფარფლიანებში (სელაპი, ზღვის ლომი და ლომვეშაპი), ხოლო *B. ceti-s* ვეშაპისებრთა ოჯახის წარმომადგენლებში (ვეშაპი, დელფინი და ზღვის ღორები).^{29,30} ზღვის ძუძუმწოვრებს შეუძლიათ ბრუცელოზით დააინფიცირონ, როგორც ხმელეთის ძუძუმწოვრები, ასევე ადამიანიც, რადგან *B.maris* იწვევს ხმელეთის ძუძუმწოვრებსა და ადამიანში ბრუცელოზს.³¹

ბრუცელები ცხოველების ორგანიზმში აღწევენ საჭმლის მომწელებელი ტრაქტის, სასქესო და სასუნთქი გზების ლორწოვანი გარსების და კონიუქტივის საშუალებით. აგრეთვე კანის საფარველიდან, თუ მისი მთლიანობა დაღვეულია.

ცხოველებში ბრუცელოზის კლინიკური სურათი ხასიათდება პოლიმორფიზმით. ამასთან, ძირითადი კლინიკური ნიშანია აბორტი. აბორტებს გააჩიათ გადაძწყვეტი მნიშვნელობა ბრუცელოზის ეპიზოოტოლოგიასა და ეპიდემიოლოგიაში, რადგან აბორტს თან ახლავს აბორტირებულ ნაყოფთან და პლაცენტასთან ერთად ბრუცელების მასიური და ხანგრძლივი გამოყოფა. ბრუცელოზით დაავადებული ცხოველები გამოყოფენ ბრუცელებს რძესთან და შარდთან ერთად. ავადმყოფი ცხოველების მიერ აბორტისას და მშობიარობისას, აგრეთვე რძესთან ერთად დიდი რაოდენობით ბრუცელების გამოყოფა შიდა მეურნეობებსა და ფერმებში ბრუცელოზის გავრცელების ძირითადი ფაქტორია. ბრუცელოზით დაავადებულ ცხოველებს აბორტის გარდა შეიძლება აღენიშნებოდეთ ართრიტი, ტენდოვაგინიტი, ბურსიტი, მასტიტი და სასქესო ორგანოების ანთება (მდედრებს – ენდომეტრიტი და ვაგინიტი, მამრებს კი ორქიტი და ეპიდიდმიტი). ცხოველებში ბრუცელოზი შეიძლება მიმდინარეობდეს

ლატენტურად და გამოვლინდეს მხოლოდ სპეციალური გამოკვლევის შედეგად. ზოგიერთი ცხოველი შეიძლება იყოს ბრუცელოზის მტარებელი და გამოყოფდეს ბრუცელებს ხუთი და მეტი წლის მანძილზე.^{32,33}

2.4. ბრუცელოზის კლინიკა

ბრუცელები ადამიანის ორგანიზმში აღწევენ დაზიანებული კანის საფარველის ან ლორწოვანი გარსების საშუალებით. კანისა ან ლორწოვანი გარსების გავლის შემდეგ ბრუცელას შთანთქავენ პოლიმორფონუკლეარული ან მონონუკლეარული ფაგოციტები. მიკროორგანიზმს შეუძლია აიცილოს ფაგოციტების მომაკვდინებელი მოქმედება ამ უკანასკნელში მიმდინარე ფაგოსომ-ლიზოსომური დაშლის ინჰიბირებით. ლიმფოგენური გზით ბრუცელები აღწევენ ლიმფურ კვანძებამდე და იქ მრავლდებიან. ინფექციის მიმდინარეობის აღნიშნულ ფაზას ეწოდება ლიმფოგენური და შეესაბამება დაავადების ინკუბაციურ პერიოდს, რომელიც საშუალოდ 1-4 კვირა გრძელდება. იშვიათად შეიძლება 2-3 თვემდეც გაგრძელდეს¹⁸.

ბრუცელოზის საწყის სტადიაში პაციენტებს ხშირად აღინიშნებათ ბაქტერიემია, რაც შესაძლებელს ხდის სისხლიდან კულტურის მიღების.³⁴

განასხვავებენ ბრუცელოზის ოთხ კლინიკურ ფორმას: მწვავე (ხანგრძლივობა 1,5 თვემდე), ქვემწვავეს (4 თვემდე), ქრონიკულს (4 თვეზე მეტი) და რეზიდუალურს. ბრუცელოზით დაავადებულებს შესაძლებელია განუვითარდეთ ნეფრიტი³⁵ მენინგიტი³⁶ და ეპიდიდიმოორქიტი.^{37,38,39} ბრუცელოზით დაავადებულთა გარდაცვალების ძირითადი მიზეზია გულ-სისხლძარღვთა პათოლოგია (უპირატესად ენდოკარდიტი, პერიფერიული და ცერებროვასკულარული ანევრიზმა, არტერიული და ვენური თრომბოზები.⁴⁰

ბრუცელოზის დროს ჰემოგრამაში აღინიშნება შემდეგი ცვლილებები: ლეიკოპენია, შედარებითი ლიმფოციტოზი, მონოციტოზი, ტრომბოციტოპენია და ზომიერად მომატებული ედს-ი.¹⁷

მწვავე ბრუცელოზით დაავადებულთა ოჯახის წევრებს, მსგავსი კვების რაციონის გამო, ბრუცელოზით დაინფიცირების მაღალი რისკი გააჩნიათ, რაზეც მიუთითებს საუდის არაბეთში, თურქეთსა და ირანში ჩატარებული კვლევები.^{41,42,43,44,45}

ადამიანიდან ადამიანზე ბრუცელოზის გადაცემის შემთხვევები ძალიან იშვიათია. სამეცნიერო ლიტერატურაში აღწერილია ბრუცელოზის გადაცემა სქესობრივი გზით,⁴⁶ სისხლის გადასხმით,⁴⁷ ორგანოთა ტრანსპლანტაციით,⁴⁸ დედის რძით⁴⁹ და ტრანსპლაცენტარული.⁵⁰

ძალიან მწირი ინფორმაცია არსებობს ქალებში ორსულობაზე ბრუცელოზის გავლენის შესახებ. პავანის (Pavan) აზრით, ბრუცელოზის გამო ნაადრევი მშობიარობის და აბორტების რისკი მცირეა, რადგან ცხოველების პლაცენტისაგან განსხვავებით, ადამიანის პლაცენტა არ შეიცავს ერთრიტს, რომელიც ბრუცელების ცხოველმყოფელობის სტიმულატორია⁵¹. მაგრამ არსებობს საწინააღმდეგო მოსაზრების სამეცნიერო პუბლიკაციებიც.⁵² გუსლუნის (Gulsun) კვლევებმა აჩვენა, რომ ბრუცელოზმა შეიძლება გამოიწვიოს ნაადრევი მშობიარობა, ქორიოამნიონიტი და მშობიარობის შემდგომი ენდომეტრიტი. ჩამოთვლილ პათოლოგიათა პრევენცია შესაძლებელია ბრუცელოზის მკურნალობით.⁵³

აშშ-ს დაავადებათა კონტროლისა და პრევენციის ცენტრების (CDC) განსაზღვრების მიხედვით ბრუცელას ექსპოზიციის რისკი შეიძლება იყოს მხოლოდ მაღალი ან საშუალო. ექსპოზიციის მაღალ რისკს მიეკუთვნება უშუალო კონტაქტი ბრუცელასთან. მაგალითად, ლაბორატორიაში ბრუცელას შტამებზე მუშაობა ბიოუსაფრთხოების შესაბამისი ზომების დაცვის გარეშე.⁵⁴

ბრუცელოზი არაიშვიათად ლაბორატორიულ კვლევებთან ასოცირებული ინფექციაა.^{55,56,57,58} ბრუცელას მახასიათებლები განაპირობებენ ლაბორატორიულ პირობებში პერსონალის ბრუცელოზით დაავადებას. *Brucella spp.* ადვილად გადადის აეროზოლურ მდგომარეობაში და გააჩნია მაინფიცირებელი დოზა 10-100 მიკროორგანიზმი.⁵⁹ ქვეყნებში (მაგალითად, ამერიკის შეერთებულ შტატები), სადაც იშვიათია მოსახლეობის ბრუცელოზით დაავადება, სამედიცინო და ლაბორატორიული პერსონალი შესაძლებელია ნაკლებად

იცნობდეს დაავადების კლინიკურ ნიშნებსა და ბრუცელას მახასიათებლებს, რამაც შეიძლება განაპირობოს ბრუცელოზის ლაბორატორიულ კვლევებთან ასოცირებული ინფექცია.^{60,61,62}

2.5. ბრუცელოზის გავრცელება მსოფლიოში

ადამიანებში ბრუცელოზის კლინიკური შემთხვევები უპირატესად აღირიცხება ახლო აღმოსავლეთში,^{63,64,65,66,67,68,69} აზიაში,^{70,71,72,73,74,75,76} აფრიკაში,^{77,78,79,80,81,82,83,84} სამხრეთ და ცენტრალურ ამერიკაში^{85,86}, ხმელთაშუა ზღვის აუზის ქვეყნებსა^{87,88,89,90} და კარიბის ზღვის კუნძულებზე.⁹¹

ცხრილი 3. ბრუცელოზის ინციდენტობა ქვეყნების მიხედვით⁹²

ქვეყანა	კვლევის დონე	(100 000 მოსახლეზე)
ჩრდილოეთ აფრიკა და ახლო აღმოსავლეთი		
ეგვიპტე	სუბ-ნაციონალური	0.28-70.00
ერაყი	სუბ-ნაციონალური	52.29-268.81
ირანი	სუბ-ნაციონალური	0.73-141.60
იორდანია	ნაციონალური	25.70-130.00
ომანი	სუბ-ნაციონალური	11.01
პალესტინა	სუბ-ნაციონალური	8.00
საუდის არაბეთი	ნაციონალური	137.61
თურქეთი	სუბ-ნაციონალური	11.93-49.54
სუბ-საჰარული აფრიკა		
ჩადი	სუბ-ნაციონალური	34.86
დასავლეთ ევროპა		
გერმანია	ნაციონალური	0.03
საბერძნეთი	სუბ-ნაციონალური	4.00-32.49

იტალია	ნაციონალური	1.40
ცენტრალური აზია		
ყირგიზეთი	ნაციონალური	88.00
ცენტრალური და სამხრეთ ლათინური ამერიკა		
არგენტინა	სუბ-ნაციონალური	12.84
მექსიკა	სუბ-ნაციონალური	25.69
ჩრდილოეთ ამერიკა		
აშშ	სუბ-ნაციონალური	0.02-0.09

ბრუცელას სახეობების გეოგრაფიული გავრცელება განსხვავებულია. *B. abortus* უპირატესად გვხვდება იმ ქვეყნებში, სადაც მსხვილფეხა რქოსანი პირუტყვის მოშენებას მისდევენ. გარდა იმ ქვეყნებისა (კანადა, იაპონია, ევროპის ზოგიერთი ქვეყანა, ავსტრალია, ახალი ზელანდია და ისრაელი), სადაც მოხდა ბრუცელოზის ერადიკაცია. *B. melitensis* ფართოდ გავრცელებულია ხმელთაშუა ზღვისპირა ქვეყნებში. *B. melitensis* მიერ გამოწვეული კლინიკური შემთხვევები ასევე აღინიშნება შუა აღმოსავლეთში, ცენტრალურ აზიაში, სპარსეთის ყურეში, ცენტრალური ამერიკის ზოგიერთ ქვეყანაში, აფრიკასა და ინდოეთში. *B. melitensis* არ არის ენდემური სკანდინავიის ქვეყნებისთვის, ჩრდილოეთ ამერიკისთვის (გარდა მექსიკისა), სამხრეთ-აღმოსავლეთ აზიისათვის, ავსტრალიისა და ახალი ზელანდიისთვის.¹⁹

B. ovis უპირატესად გავრცელებულია იმ ქვეყნებში, სადაც მეცხვარეობას მისდევენ (ავსტრალია, ახალი ზელანდია, ჩრდილოეთ და სამხრეთ ამერიკა, სამხრეთ აფრიკა და ევროპის რამდენიმე ქვეყანა). უკანასკნელ წლებში *B. suis* გავრცელება აღინიშნება იმ ქვეყნებშიც, რომლებშიც მეღორეობას მისდევენ. ამასთან აშშ-ში, კანადასა და ევროპის რამდენიმე ქვეყანაში გატარებული პრევენციული ღონისძიებათა შედეგად, მოხდა შინაურ ღორებში *B. suis* ერადიკაცია, თუმცა გარეულ ღორებში იგი კვლავ ცირკულირებს. *B. suis* ბიოვარი 1 და 3 მსოფლიოში ფართოდაა გავრცელებული, ხოლო სხვა ბიოვარებს გააჩნიათ

შეზღუდული გეოგრაფიული გავრცელება. ბიოვარი 2 უპირატესად გავრცელებულია ევროპაში, ბიოვარი 4 კი ჩრდილოეთ ამერიკისა და რუსეთის არქტიკულ რეგიონში (ციმბირის ჩათვლით), ალიასკასა და კანადაში.⁴¹ *B. canis* გავრცელებულია მთელს მსოფლიოში, გარდა ავტრალიისა და ახალი ზელანდიისა.⁹³

2.6. ბრუცელოზის გავრცელება საქართველოს მოსაზღვრე ქვეყნებში

რაც შეეხება ბრუცელოზის გავრცელებას საქართველოს მოსაზღვრე ქვეყნებში, სომხეთში, 1996-2005 წლებში, ადამიანის ბრუცელოზის ინციდენტობის საშუალო მაჩვენებელი 100.000 მოსახლეზე შეადგენდა 3,57. 2006 და 2007 წლებში აღნიშნული მაჩვენებელი მნიშვნელოვნად გაიზარდა (შესაბამისად 5,79 და 8,24). ამასთან, ზოგიერთი მკვლევარის აზრით მოსახლეობაში ბრუცელოზის გავრცელება ბევრად მაღალია, მაგრამ რადგან მოსახლეობის მნიშვნელოვანი ნაწილისათვის კვალიფიციური სამედიცინო მომსახურება ხელმიუწვდომელია ბრუცელოზის ყველა შემთხვევის რეგისტრაცია არ ხდება.⁹⁴ სომხეთში ბრუცელოზის შემთხვევების 84,0% მოდის სოფლის მოსახლეობაზე, 16,0% კი ქალაქების მოსახლეობაზე. 2006/2007 წლებში, სომხეთში, Thibaud Porphyre-ს კვლევაში მონაწილე 858 შინამეურნეობიდან; 29,0%-ში აღინიშნა მსხვილფეხა რქოსანის პირუტყვის ბრუცელოზი, 21,0%-ში კი წვრილფეხა რქოსანი პირუტყვის ბრუცელოზი.⁹⁵

აზერბაიჯანში ბრუცელოზის პირველი კლინიკური დიაგნოზი დაისვა 1922 წელს. შემდგომი 30 წლის განმავლობაში ბრუცელოზის გავრცელება აღინიშნა ამ ქვეყნის ტერიტორიის თითქმის 70%-ზე.⁹⁶ 1995 წლიდან 2009 წლამდე აზერბაიჯანში ბრუცელოზის 7.983 შემთხვევა დაფიქსირდა. აღნიშნულ პერიოდში ბრუცელოზის ყოველწლიური შემთხვევების რიცხვი მერყეობს 392-დან (2009 წელი) 756-მდე (1996 წელი). 15 წლის მანძილზე აზერბაიჯანის 66 რაიონიდან 65%-ში ყოველწლიურად ფიქსირდებოდა ადამიანის ბრუცელოზის ერთი შემთხვევა მაინც. აზერბაიჯანშიც

ბრუცელოზს ახასიათებს სეზონურობა. ყველაზე ხშირია შემთხვევები ზაფხულში, შემდეგ კი გაზაფხულზე.⁹⁷

ბრუცელოზი თურქეთში ენდემური დაავადებაა და ყოველწლიურად საშუალოდ 10.000 შემთხვევა რეგისტრირდება. ოფიციალურად, ინციდენტობა მილიონ მოსახლეზე არის 150.⁹⁸ თურქეთის სხვადასხვა რეგიონში ბრუცელოზის პრევალენტობა სხვადასხვაა, რაც განპირობებულია ისეთი ფაქტორებით, როგორცაა კვების თავისებურებები, რძის გადამუშავების მეთოდები, კლიმატური პირობები და სოციალურ-ეკონომიური ფაქტორები. თურქეთში 1986 წლიდან 2004 წლამდე მნიშვნელოვნად იზრდებოდა ბრუცელოზის ინციდენტობა (100.000 მოსახლეზე შესაბამისად 3,03 და 25,65). 2004 წლიდან დაიწყო პროფილაქტიკური ღონისძიებების (წვრილფეხა და მხსვილფეხა რქოსანი პირუტყვის ვაქცინაცია, მოსახლეობის განათლება ბრუცელოზის საკითხებზე) გატარება, რამაც რამდენიმე წლის მანძილზე მნიშვნელოვნად შეამცირა მოსახლეობაში ბრუცელოზის შემთხვევები (2004 წელს ბრუცელოზის შემთხვევები – 18.563, 2008 წელს - 9,818).⁹⁹

ოფიციალურად, რუსეთის ფედერაციაში ბრუცელოზის პრევალენტობა 0,3-0,4 შემთხვევაა 100.000 მოსახლეზე. რეალურად აღნიშნული მაჩვენებელი გაცილებით მაღალია. ამასთან, ოფიციალურად რეგისტრირდება მხოლოდ მწვავე ბრუცელოზის შემთხვევები. ბრუცელოზის სხვა ფორმების რეგისტრაცია საერთოდ არ წარმოებს. შესაბამისად არ არსებობს რუსეთის ფედერაციაში ბრუცელოზის გავრცელების რეალური მონაცემები. ბრუცელოზის, როგორც ეპიდემიოლოგიური, ასევე ეპიზოოტოლოგიური თვალსაზრისით, განსაკუთრებით არაკეთილსაიმედო მდგომარეობაა ციმბირის ფედერალურ ოლქში და საქართველოს მეზობელ რეგიონებში - დაღესტნის რესპუბლიკა, ყალმუხეთი, ჩრდილოეთ ოსეთი, ყარაჩაი-ჩერქეზეთი, ყაბარდო-ბალყარეთი და სტავროპოლის მხარე. ზემოთ ჩამოთვლილ რეგიონებზე მოდის რუსეთის ფედერაციის მოსახლეობაში ოფიციალურად რეგისტრირებული ბრუცელოზის 72,7%. აღნიშნულ რეგიონებზე მოდის რუსეთის

ფედერაციაში ბრუცელოზით დაავადებული მსხვილფეხა რქოსანი პირუტყვის 78,8% და წვრილფეხა რქოსანი პირუტყვის 77,4%.¹⁰⁰.

ირანის სხვადასხვა რაიონებში ბრუცელოზის გავრცელება მერყეობს 0,5%-დან 10,9%-მდე.⁴⁴

ყოფილი საბჭოთა კავშირის ქვეყნებიდან ბრუცელოზით ავადობის ყველაზე მაღალი მაჩვენებელია ყირგიზეთში, სადაც 2007 წელს, 100.000 მოსახლეზე რეგისტრირებული იყო ბრუცელოზის 77.5 ახალი შემთხვევა, რაც მსოფლიოში ბრუცელოზის ინციდენტობის ერთ-ერთი მაღალი მაჩვენებელია. ყირგიზეთში ჩატარებულმა ეროვნულმა გამჭოლი კვებით კვლევამ აჩვენა, რომ ბრუცელოზის მიმართ სეროპრევალენტობა მოსახლეობაში შეადგენს 8,8% (95%, CI: 4,5-16,5%), მსხვილფეხა რქოსან პირუტყვში – 2,8% (95%, CI: 1,6-4,9%), ცხვრებში – 3,3% (95%, CI: 1,5-6,9%), თხეებში – 2,5% (95%, CI: 1,4-4,5%). ადამიანებში სეროპოზიტიურობის მაღალი მაჩვენებელი მნიშვნელოვნადაა განპირობებულია ცხვრების და თხების პრევალენტობით. ყოველწლიურად სეროლოგიური ტესტების საშუალებით გამოვლენილი ბრუცელოზის შემთხვევები ათჯერ მეტია, ვიდრე რეგისტრირებული კლინიკურად გამოვლენილი ბრუცელოზის შემთხვევები.⁷⁰

2.7. ბრუცელოზის გავრცელება საქართველოში

საქართველოში ბრუცელოზის პირველი შემთხვევა აღწერილ იქნა ნ. მახვილაძის მიერ 1921 წელს. ბრუცელას კულტურა კი პირველად გამოიყო 1923 წელს. საქართველოში მეოცე საუკუნის 30-იანი წლებიდან დაიწყო ბრუცელოზის გავრცელების ინტენსიური შესწავლა; მას შემდეგ რაც 1930 წლის გაზაფხულზე ნ. ტორჩინავას მიერ კახეთის რეგიონში გამოვლენილ იქნა ბრუცელოზის ენდემური კერა.¹⁰¹ საქართველოში მე-20 საუკუნის 80-იან წლებამდე იშვიათად ხდებოდა ბრუცელოზით დაავადებულთაგან *B. abortus*-ის შტამების გამოყოფა.¹⁰²

დღემდე საქართველოში ბრუცელოზის კერები უპირატესად აღმოსავლეთ საქართველოში გვხვდება. დასავლეთ საქართველოში ბრუცელოზი შედარებით იშვიათია.^{103,101,104} XX საუკუნის 50-იან და 60-იან წლებში ბრუცელოზის შემთხვევების 98%-ზე მეტი აღინიშნებოდა აღმოსავლეთ საქართველოში. ა. ნავდარაშვილის მონაცემებით 1976-1990 წლებში ბრუცელოზის შემთხვევების 94,53% რეგისტრირებული იყო აღმოსავლეთ საქართველოში, 5,47% კი დასავლეთ საქართველოში. 1991-2004 წლებში: აღმოსავლეთ საქართველოში - 96,68%, დასავლეთ საქართველოში - 3,32%. აღმოსავლეთ საქართველოში, როგორც XX საუკუნეში, ასევე უკანასკნელ წლებშიც, ბრუცელოზის მხრივ ყველზე მეტად გავრცელებულია კახეთის რეგიონში (დედოფლის წყაროს, ახმეტის და საგარეჯოს რაიონებში).^{105,106}

ვ. ანთაძის მონაცემებით, XX საუკუნის 50-იან წლებამდე თხებში დასავლეთ საქართველოში თითქმის არ გვხვდებოდა ბრუცელოზი, აღმოსავლეთ საქართველოში კი თხაც და ცხვარიც ბრუცელოზის ინფექციის წყარო იყო და საშიშროებას წარმოადგენდა მოსახლეობისათვის.¹⁰⁴

საქართველოში ბრუცელოზით ავადობას სეზონურობა ახასიათებს. დაავადებების შემთხვევები პიკს ივნის-ივლისში აღწევს. ბრუცელოზით უპირატესად ავადდებიან 20-50 წლის ასაკის მამაკაცები, რომელთა უმრავლესობაც დასაქმებულია მეცხოველეობაში.

საქართველოს დამოუკიდებლობის აღდგენის შემდეგ მეცხოველეობის სახელმწიფო მეურნეობების ნაცვლად წარმოიქმნა კერძო ფერმერული მეურნეობები, გაუქმდა სანიტარულ-ეპიდემიოლოგიური სამსახური, შესუსტდა ვეტერინარული ზედამხედველობა, რაც ბრუცელოზის პროფილაქტიკაში მნიშვნელოვან როლს ასრულებდა. ყოველივე ამან გამოიწვია როგორც წვრილფეხა, ასევე მსხვილფეხა რქოსან პირუტყვში და, შესაბამისად, მოსახლეობაში დაავადების შემთხვევების მატება. 2008 წელს საქართველოს სოფლის მეურნეობის სამინისტროს ლაბორატორიაში ბრუცელოზზე გამოკვლეული 3082 მსხვილფეხა პირუტყვის სისხლის შრატდან, როზ-ბენგალის

დადებითი ტესტი აღმოჩნდა 348-ს (11,30%), 2009 წელს - 10.75% (6740/724), 2010 წელს - 9,61% (3654/351), 2011 წელს კი 13,36%-ს (1699/227).

2.8. ბრუცელოზის ვაქცინაცია

დღემდე, ადამიანების ბრუცელოზის პრევენციისათვის უსაფრთხო და მაღალი დამცველობითი თვისების მქონე ვაქცინა შემუშავებული არ არის. 1952 წელს საბჭოთა კავშირში ბრუცელოზის საწინააღმდეგო ვაქცინაციისათვის გამოყენებულ იქნა *B. abortus*-ის შტამი 19-BA. ვაქცინა ეფექტური იყო მხოლოდ ერთი წლის განმავლობაში. მაქსიმალური ეფექტი აღინიშნებოდა მხოლოდ 5-6 თვის მანძილზე. აღნიშნული გარემოების გამო, სასურველი იყო, რომ ვაქცინაცია დამთხვეოდა ცხოველებში ბრუცელოზის სეზონურ პიკს. ზოგადად, მოზრდილები კანქვეშა ვაქცინაციას კარგად იტანდნენ, თუმცა დაახლოებით 76%-ს განუვითარდა ადგილობრივი რეაქციები (ჰიპერემია და ინდურაცია). ვაქცინირებულთა 3-7%-ს აღნიშნებოდა თავის ტკივილი, მილიანობა და ცხელება. ეპიდემიოლოგიურმა კვლევებმა აჩვენა, რომ ვაქცინა ეფექტური იყო ბრუცელოზის მაღალი რისკის რეგიონებში, სადაც მნიშვნელოვნად შეამცირა ბრუცელოზის შემთხვევები. ამასთან რევაქცინაცია იწვევდა ჰიპერმგრძობელობას და გააჩნდა უკუჩვენებები.¹⁰⁷

ჩინეთში ცოცხალ ატენუირებულ *B. abortus*-ის შტამს 104M იყენებდნენ ვაქცინაციისათვის.^{108,109,110} ის *B. abortus*-ის შტამ 19-BA-თან შედარებით უფრო მაღალი ვირულენტობით ხასიათდებოდა და იწვევდა სერიოზულ რეაქციებს.¹¹¹

2.9. ბრუცელოზის ლაბორატორიული დიაგნოსტიკა

დღეისათვის ბრუცელოზის დიაგნოსტიკის მრავალი მეთოდია გამოყენებული:

- ბაქტერიოლოგიური (კულტურის მიღება);

დაავადების ადრეულ სტადიაში პაციენტებში ხშირად აღინიშნება ბაქტერიემია, რომლის დროსაც შესაძლებელია სისხლიდან კულტურის მიღება.

- სეროლოგიური ანუ ბრუცელას საწინააღმდეგო ანტისხეულების აღმოჩენა;

ბრუცელოზის დამადასტურებელ სეროლოგიური მეთოდებს მიკუთვნება: მინაზე აგლუტინაცია, სინჯარაში აგლუტინაცია და ELISA.

- დნმ-ის დეტექცია (მოლეკულური მეთოდები);

თანამედროვე მოლეკულური მეთოდები გამოირჩევა მაღალი მგრძობელობით და მნიშვნელოვანი როლი ენიჭებათ ბრუცელოზის დიაგნოსტიკაში.

1990 წელს დ. ფეკეტიმ (D. Fekete) პირველმა მოახდინა ბრუცელას დეტექცია პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქციის საშუალებით.

დიაგნოსტიკისთვის აგრეთვე გამოიყენება პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქცია რეალურ დროში (Real-time PCR), რომელიც ემყარება ჰიბრიდიზაციული ზონდების (HybProbe) ფლოუორესცენტული რეზონანსული ენერჯის გადაცემის (fluorescence response energy transfer - FRET) პრინციპს. აღნიშნულ მეთოდს გააჩნია მაღალი სპეციფიკურობა და მიკრობის დეტექციის შესაძლებლობა ისეთ ნიმუშებში, სადაც მიკროორგანიზმის რაოდენობა სავარაუდოდ ძალიან დაბალია.

AMOS პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქცია (პჯრ) საშუალებას იძლევა მოვახდინოთ ბრუცელას ოთხი სახეობის (*B. abortus*, *B. melitensis*, *B. ovis* და *B. suis*) დიფერენციაცია.¹¹²

2.10. ბრუცელას შტამების მოლეკულური გენოტიპირება

უკანასკნელ წლებში განვითარდა პოლიმერაზულ ჯაჭვურ რეაქციაზე (პჯრ) დაფუძნებული ანალიზები ბრუცელების მოლეკულური გენოტიპირებისათვის. მაგალითად, განმეორებადი გენთაშორისი პალინდრომული სექვენს-პჯრ,¹¹⁴ შემთხვევითად

ამპლიფიცირებული პოლიმორფული დნმ-PCR (RAPD-PCR),¹¹³ ამპლიფიცირებული ფრაგმენტის სიგრძის პოლიმორფიზმი (AFLP),¹¹⁵ ერთ-ნუკლეოტიდური პოლიმორფიზმი (SNP),^{116,117} და - რესტრიქციული ფრაგმენტების სიგრძის პოლიმორფიზმი (PCR-RFLP).¹¹⁸

მოლეკულური გენოტიპირების ერთ - ერთი მნიშვნელოვანი მეთოდია დიდი რესტრიქციული ფრაგმენტების გელ-ელექტროფორეზი პულსირებად ველში (PFGE), რომელმაც, *B. Melitensis* შტამ 16M-ში გამოავლინა ორი დამოუკიდებელი ქრომოსომა; ზომით 2.12 და 1.15 მეგაბაზა.¹¹⁹ სრული გენომის სექვენირებამ აგრეთვე დაადასტურა ორი ქრომოსომის არსებობა. ორივე ქრომოსომას გააჩნია გუანინი + ციტოზინის თითქმის მსგავსი შემცველობა; პირველ ქრომოსომაში - 57.1%, მეორეში - 57.3%.¹²⁰ *B. suis* -ის ბიოვარი 3 იმით არის უნიკალური, რომ გააჩნია მხოლოდ ერთი ქრომოსომა, ზომით 3.1 მეგაბაზა.¹²¹

დნმ-დნმ გენომური ჰიბრიდიზაციის მიკროარეზების შედარებამ – *B. melitensis*, როგორც სუბსტრატი ბრუცელების სხვა ხუთი სახეობის მიმართ, აჩვენა, ბრუცელების ექვსივე სახეობის გენომების მსგავსება.¹¹

ბრუცელას შტამები საკმაოდ დიდი მრავალფეროვნებით გამოირჩევიან. ეპიდემიოლოგიური თვალსაზრისით ყოველთვის საინტერესოა დაავადების პირველ წყაროს მიკვლევა. ამისთვის გამოიყენება მოლეკულური გენოტიპირების რამოდენიმე მეთოდი.

ბრუცელების დახასიათება სახეობის და ბიოვარის დონეზე შესაძლებელია სხვადასხვა მიკრობიოლოგიური კვლევებით.¹²² ამასთან, ბიოტიპირების ეს მეთოდები დიდ დროს მოითხოვს და პოტენციურად საშიშია ლაბორატორიის პერსონალისთვის. ზოგიერთ სახეობასა და ბიოვარს შორის შეზღუდულმა ვარიაციებმა კი შეიძლება გამოიწვიოს ურთიერთსაწინააღმდეგო მონაცემები და გაართულოს მიღებული შედეგების ინტერპრეტაცია.¹²³ სწორედ ამიტომ ბიოტიპირების ბაქტერიოლოგიური მეთოდები ნაკლებად გამოიყენება იმ ეპიდემიოლოგიური კვლევებისათვის, სადაც აუცილებელია ბრუცელოზის გამომწვევის უფრო ზუსტი იდენტიფიკაცია. აქედან გამომდინარე,

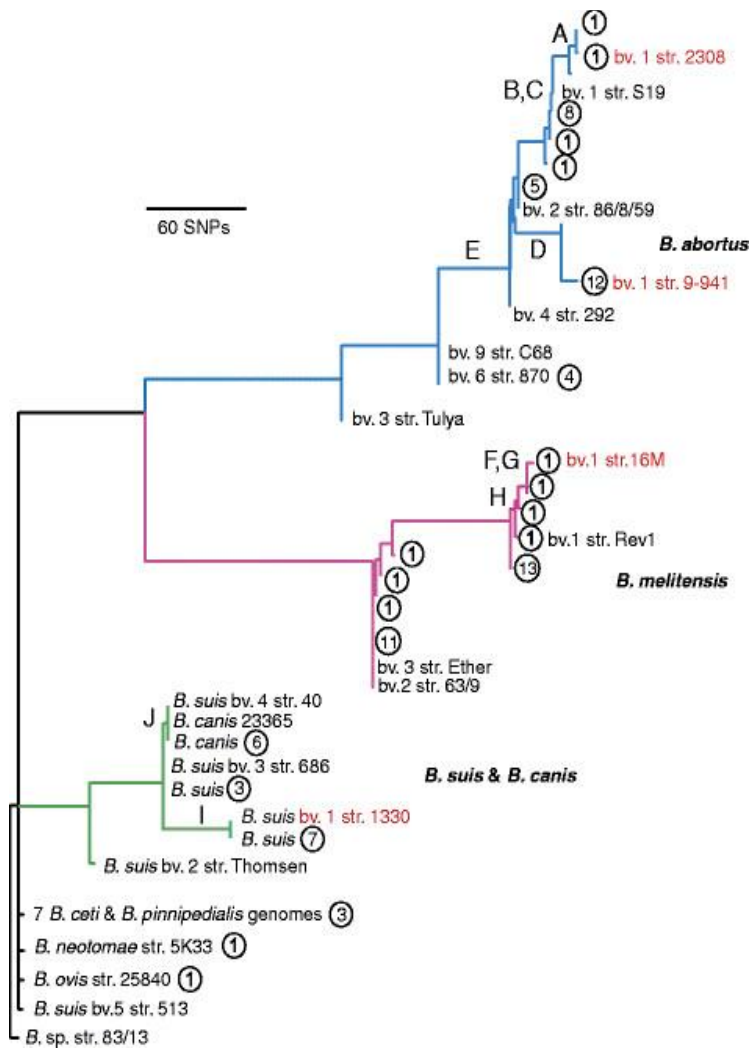
მიზანშეწონილია პათოგენის გენეტიკური დახასიათება თანამედროვე დნმ ტექნოლოგიების საშუალებით და სუბტიპირება სხვადასხვა მოლეკულურ-ბიოლოგიური მეთოდების გამოყენებით. ერთ-ერთი ასეთი მეთოდია მრავლობითი ლოკუსების ტანდემურად განმეორებადი თანმიმდევრობების ცვლადი რაოდენობის ანალიზი (Multi Locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis - MLVA). რაც მდგომარეობს ბრუცელას გენომის სხვადასხვა ლოკუსში ტანდემური განმეორებადი თანმიმდევრობების რაოდენობების შედარებაში. ეს საშუალებას გვაძლევს თვალი გავადევნოთ იზოლატების წარმომავლობას, ან დავადგინოთ აფეთქების წყარო და ხელი შევუწყოთ ეპიდემიოლოგიურ კვლევას. ეს მეთოდი შტამებს შორის ყველაზე მაღალი გარჩევადობის უნარით ხასიათდება და *Brucella*-ს ქვესახეობების კლასიფიკაციის, პოპულაციის სტრუქტურისა და ნაწილობრივი ფილოგენეტიკური კავშირების სურათს იძლევა.^{124,125,126,127,}

128

შტამების ევოლუციური პროცესის შესწავლის, ანუ მისი ფილოგენეტიკური ანალიზისათვის მრავალფეროვნება შესაძლოა ხელისშემშლელიც აღმოჩნდეს, რადგან ხშირად თავს იჩენს ე.წ. ჰომოპლაზია, მოვლენა, რომლის დროსაც ფილოგენეტიკურად ახლოს მდგომ შტამებს შესაძლოა საკმაოდ განსხვავებული MLVA პროფილები ჰქონდეთ, და პირიქით, ერთმანეთისაგან ფრიად დაშორებული და ამავდროულად მსგავსი ევოლუციური წარსულის მქონე შტამები მხოლოდ MLVA ტიპირებაზე დაყრდნობით შესაძლებელია ერთ ან ახლო მდგომ ჯგუფებში მოხვდნენ.¹²⁹ სხვადასხვა პათოგენების პოპულაციის სტრუქტურის უფრო ღრმა ანალიზისა და მისი გლობალური გავრცელების ისტორიულ პროცესზე დაკვირვების მიზნით გამოიყენება ერთ-ნუკლეოტიდური პოლიმორფიზმის (SNP) მეთოდი.^{130,131} ჩრდილოეთ არიზონის უნივერსიტეტის (აშშ) მიკრობული გენეტიკისა და გენომიკის ლაბორატორიის მეცნიერთა ჯგუფის მიერ ბრუცელას შტამები გამოკვლეულ იქნა SNP მეთოდით.¹³² თავდაპირველად მოხდა ბრუცელას შტამების სრული გენომური თანმიმდევრობის ერთმანეთთან შედარება. შერჩეული შტამების გენომების შედარების შედეგად აღმოჩენილი და ამორჩეული SNP ლოკუსების საფუძველზე აიგო მაღალი სიზუსტის ფილოგენეტიკური ხე (სურათი #1),

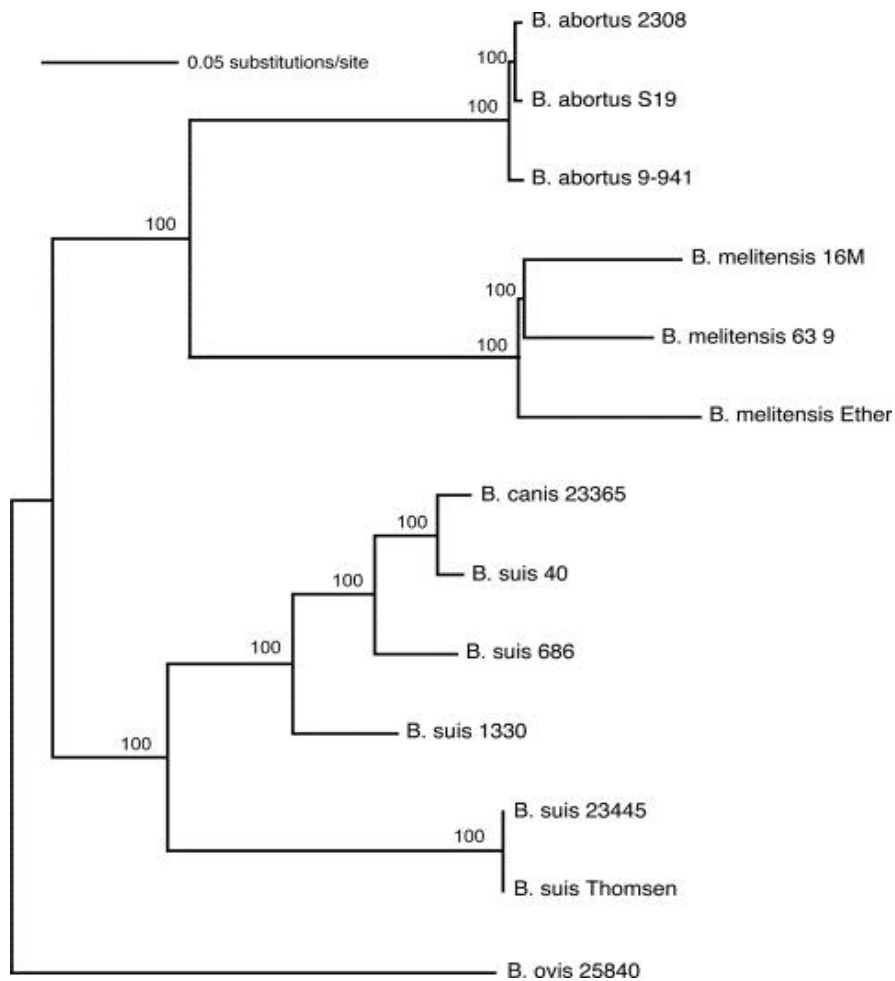
თითოეული მიღებული ქვეჯგუფისათვის მოხდა თითო სპეციფიკური SNP ლოკუსის შერჩევა, რომელთა ბაზაზეც შეიქმნა კანონიკური SNP ტესტი, რომელიც გამოყენებულ იქნა ბრუცელას გენეტიკურად და გეოგრაფიულად განსხვავებული შტამების ტიპირებისა და ქვეჯგუფების შიგნით დამატებითი ფილოგენეტიკური სტრუქტურის განსაზღვრისათვის.¹³⁰

სურათი #1



ბრუცელების ხუთი სახეობის (*B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. canis* და *B. ovis*) ტაქსონომიური და ევოლუციური კავშირის დასადგენად ჯეფრი ფორსტერის (Jeffrey Foster) მიერ შედარდა *B. suis*-ის ხუთი, *B. abortus*-ის და *B. melitensis* სამ-სამი, *B. canis* და *B. ovis* თითო-თითო შტამის სრული გენომური სექვენსი. მოლეკულური საათის გამოყენებით დადგინდა, რომ ბრუცელას სახეობების უმრავლესობა განსხვავდება მათი საერთო *B. ovis* წინაპრისაგან (დაახლოებით 200-300 ათასი წლის წინ), რაც წინ უსწრებდა პირუტყვის მოშინაურებას.¹³²

სურათი #2. ბრუცელას 5 სახეობისა და 13 შტამის ფილოგენეტიკური ხე



დღეისთვის შესწავლილია ბრუცელას 13 შტამის გენომი.^{132,133} მათ შორის ექსპერიმენტალური ბრუცელოზის გამომწვევი *B. abortus*-ის შტამის 2308 და სავაქცინო შტამის S19 გენომები.^{134,135} აღნიშნულმა კვლევებმა გააღრმავეს ცოდნა ბრუცელების ტაქსონომიის, სხვადასხვა სახეობებისა და ბიოვარების გენომის შესახებ, მათი ფილოგენეტიკური ურთიერთკავშირის და შესაძლო კავშირი წინაპარ შტამებთან.

ჩეინის (Chain) და ჰალინგის (Halling) მიერ ჩატარებულმა *B. abortus* და *B. melitensis* შტამების სრულმა გენომურმა სექვენსმა აჩვენა მათ შორის ახლო კავშირი.^{134, 112}

ბრუცელას შტამების გენომების შედარებით გამოვლინდა 20,154 ერთ-ნუკლეოტიდური პოლიმორფიზმი, რომელიც დამახასიათებელია ყველა გენომისათვის.¹³²

3. კვლევის მასალა და მეთოდები

3.1. შემოსული ნიმუშების პირველადი დამუშავება

ნიმუშების შეგროვება წარმოებდა დაავადებათა კონტროლისა და საზოგადოებრივი ჯანმრტელობის ეროვნული ცენტრის (დკსჯეც) და აშშ-ს საფრთხის შემცირების სააგენტოს (DTRA) მიერ ერთობლივად შემუშავებული და დამტკიცებული სტანდარტული ოპერაციული პროცედურების (სოპ) შესაბამისად.

კვლევის ყველა ეტაპი ტარდებოდა ბიოუსაფრთხოების სტანდარტების მკაცრი დაცვით. *Brucella spp.* განსაკუთრებით საშიში პათოგენების ჯგუფშია გაერთიანებული და ამიტომ ინფიცირებულ მასალის კვლევასთან დაკავშირებული პროცედურები ტარდებოდა ბიოუსაფრთხოები მესამე დონის ლაბორატორიაში (BSL-3), პერსონალური დაცვის საშუალებების (PPE) გამოყენებით. კვლევები ტარდებოდა ჯანმრთელობის მსოფლიო ორგანიზაციის (ჯანმო) და აშშ საფრთხის შემცირების სააგენტოს რეკომენდაციების საფუძველზე შემუშავებული ალგორითმების შესაბამისად. ლაბორატორიული კვლევის

შედგები შეგვქონდა დაავადებათა ზედამხედველობის ელექტრონულ ინტეგრირებულ სისტემაში (EIDSS).

საწყის ეტაპზე ადამიანის კლინიკური და შინაური ცხოველების (ძროხა, ცხვარი, თხა) ნიმუშები ითესებოდა სხვადასხვა საკვებ ნიაგადზე (მოდულიცირებული ტაიერ-მარტინისა და ბრუცელას სელექტიური ფარელის აგარი). ყოველი პაციენტის შრატის გამოკვლევა ხდებოდა სეროლოგიურად, *Brucella spp.*-ს საწინააღმდეგო ანტისხეულების არსებობაზე.

იზოლირებული ბრუცელას შტამების დამადასტურებელი დიაგნოსტიკისათვის გამოიყენებოდა სეროლოგიური (აგლუტინაცია სინჯარაში) და მოლეკულური (პჯრ) მეთოდები.

ბოლო ეტაპზე ხდებოდა უკვე დადასტურებული *Brucella*-ს შტამების სხვადასხვა მოლეკულური მეთოდით გენოტიპირება (AMOS PCR, Brucellader PCR, MLVA და SNP).

3.2. სეროლოგიური დიაგნოსტიკა

აგლუტინაცია სინჯარაში

ბრუცელოზის სეროლოგიური დიაგნოსტიკისათვის ანტიგენის სახით გამოიყენებოდა Becton Dickinson-ის ნაკრები.

პაციენტისგან აღებული სისხლის შრატი იტიტრებოდა 8 სინჯარაში: 200 მკლ (ul) შრატს ემატებოდა 800 მკლ ფიზიოლოგიური ხსნარი, ერეოდა პიპეტირებით, 500 მკლ ოდენობით გადაიტანებოდა ახალ სინჯარაში მოთავსებულ 500 მკლ ფიზიოლოგიურ ხსნარში და ა.შ. ყველა განზავებას ემატებოდა 500 მკლ ანტიგენი 1:50 განზავებით და 48 საათით იდგმებოდა თერმოსტატში 37°C-ზე. შრატში *Brucella*-ს საწინააღმდეგო ანტისხეულების არსებობის შემთხვევაში სინჯარის ძირზე ჩნდებოდა ქოლგისებური ნალექი.

3.3. ბაქტერიოლოგიური კვლევები

ცხოველური ნიმუშების კვლევა

ბრუცელების იზოლირებისათვის სისხლის შრატების (სეროლოგიურად როგორც დადებითი, ისე უარყოფითი) ნიმუშების 100-100 მკლ, ხოლო რძის ნიმუშებს – 200-250 მკლ ითესებოდა არასელექტიურ შოკოლადისებრ, 5%-იან ცხვრის სისხლიან აგარზე; აგრეთვე ფარელის და თაიერ-მარტინის ნიადაგებზე. ნათესების ინკუბაცია ხდებოდა თერმოსტატში 37°C-ზე, 5%-იან CO₂ გარემოში და დაკვირვება გრძელდებოდა 28 დღის განმავლობაში. იზოლატების იდენტიფიცირება ხდებოდა მორფოლოგიური, ბიოქიმიური და სეროლოგიური ტესტებით.

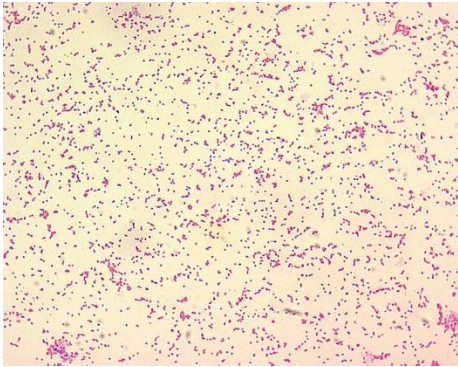
კლინიკური ნიმუშების კვლევა

სისხლის ნიმუშების 10 მკლ ითესებოდა თხევად საკვებ ნიადაგში (BD Bactec Blood Cმკulture Systems, Sparks, MD, USA) და ყოველ მე-5 დღეს ხდებოდა ამოთესვა მყარ საკვებ ნიადაგებზე 28 დღის განმავლობაში. ნათესების ინკუბაცია ხდებოდა 37°C-ზე, 5% CO₂ გარემოში. ამოთესვის შედეგები აღირიცხებოდა 5-10 დღის განმავლობაში.

ბრუცელების მორფოლოგიური და ბიოქიმიური თვისებების შესწავლა

გამოყოფილი ბრუცელას შტამების მორფოლოგიის შესასწავლად გამოიყენებოდა მიკროსკოპიის მეთოდი. მეთანოლში ფიქსირებულ ნაცხები იღებებოდა გრამის წესით (BD Becton Dickinson and Company, Sparks, Maryland, USA), მწარმოებლის მითითების შესაბამისად. პრეპარატში აღინიშნებოდა ბრუცელასთვის დამახასიათებელი ტიპური, გრამ-უარყოფითი; წვრილი, კოკობაცილები. (სურათი #3).

სურათი # 3. ბრუცელების მორფოლოგია



ბიოქიმიური აქტივობის შესწავლა ხდებოდა შემდეგი ბიოქიმიური ტესტების საშუალებით: დექსტროზას, ლაქტოზას და საქაროზას მეტაბოლიზმი, გოგირდწყალბადის წარმოქმნა, ოქსიდაზას, ურეაზას და კატალაზას ტესტები.

ბრუცელას სახეობათა იდენტიფიკაციისთვის გამოიყენებოდა გოგირდწყალბადის წარმოქმნისა და შაქრების მეტაბოლიზმის ტესტი.

აკრიფლავინის ტესტი გამოიყენებოდა გლუვი და ხორკლიანი კოლონიების წარმომქმნელი მიკროორგანიზმების დიფერენცირებისათვის.

ბრუცელას სახეობათა იდენტიფიკაციისათვის გამოიყენებოდა თიონინისა და ფუძე ფუქსინის საღებავიანი ნიადაგები.

B. melitensis, *B. canis*, *B. suis* და *B. ovis* სახეობების შტამები იზრდებოდნენ თიონინის შემცველ ნიადაგზე, ხოლო *B. neotomae*-ს და *B. abortus*-ის შტამების მიმართ თიონინს მაინჰიბირებელი მოქმედება გააჩნდა. ფუძე ფუქსინის შემცველ ნიადაგებზე ზრდა ახასიათებდა *B. melitensis*-ს და *B. abortus*-ს, ხოლო ბრუცელების სხვა სახეობებს ზრდა აღნიშნული საღებავის ზეგავლენით ითრგუნებოდა.

3.4. მოლეკულური კვლევები

3.4.1. დნმ-ის ექსტრაქცია

Brucella-ს შტამების დნმ-ის ექსტრაქცია ტარდებოდა დნმ-ის გამომყოფი ნაკრების (DNA Mini Kit, Qiagen) საშუალებით. პროცედურები სრულდებოდა მწარმოებლის ინსტრუქციის შესაბამისად:

1. ნიმუშის (ბრუცელას იზოლატი გახსნილი PBS ბუფერში) 200 მკლ-ს ემატებოდა 20 მკლ პროტეინაზა K-ს და 200 მკლ ლიზისის ბუფერი (AL); ნარევის შენჯღრევის შემდეგ ხდებოდა მისი ინკუბაცია 56°C-ზე 10წთ-ის განმავლობაში;
2. ინკუბაციის შემდეგ ნარევის ემატებოდა 200 მკლ ეთილის სპირტი, გადაგვქონდა მემბრანაიან სვეტზე და 1 წუთის განმავლობაში ცენტრიფუგირდებოდა 8000 ბრ/წთ. შედეგად საკვლევი ნიმუშის დნმ-ი რჩებოდა სვეტის მემბრანაზე;
3. ლიზატის მინარევების მოშორების მიზნით სვეტს ემატებოდა 500 მკლ პირველი გამრეცხი ბუფერი (AW1) და ხდებოდა ცენტრიფუგირება 8000 ბრ/წთ, 1 წთ;
4. სვეტს ემატებოდა 500 მკლ მეორე გამრეცხი ბუფერი (AW2) და ცენტრიფუგირდებოდა მაქსიმალურ სიჩქარეზე 14000 ბრ/წთ, 3 წთ;
5. სუფთა სინჯარში გადატანის შემდეგ სვეტს ემატებოდა 200 მკლ ელუციის (გამხსნელი) ბუფერი (AE), რომელიც ინკუბირდებოდა ოთახის ტემპერატურაზე 1 წთ და ცენტრიფუგირდებოდა 8000 ბრ/წთ, 1 წთ; მიღებული ექსტრაქტი შეიცავდა სუფთა დნმ-ს, რომელიც ხანგრძლივი დროის განმავლობაში ინახებოდა -20°C-ზე;
6. დნმ-ს უტარდებოდა სტერილობის ტესტი: დნმ-ის ხსნარის 10 მკლ ეწვეთებოდა შოკოლადისებრ აგარზე და ინკუბირდებოდა 37°C-ზე, 72 სთ-ის განმავლობაში.

3.4.2. პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქცია რეალურ დროში

პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქციისთვის რეალურ დროში, გამოიყენებოდა *Brucella*-ს სადიაგნოსტიკო ნაკრები (*Brucella* DetectionKit, Idaho Technology, Target2), რომელიც ემყარება ჰიბრიდიზაციული სინჯების პრინციპს. რეაქცია მიმდინარეობდა კაპილარულ თერმოციკლერში ექვსი ფლუორესცენტული ოპტიკური არხით (Light Cycler 2.0, Roche). 40

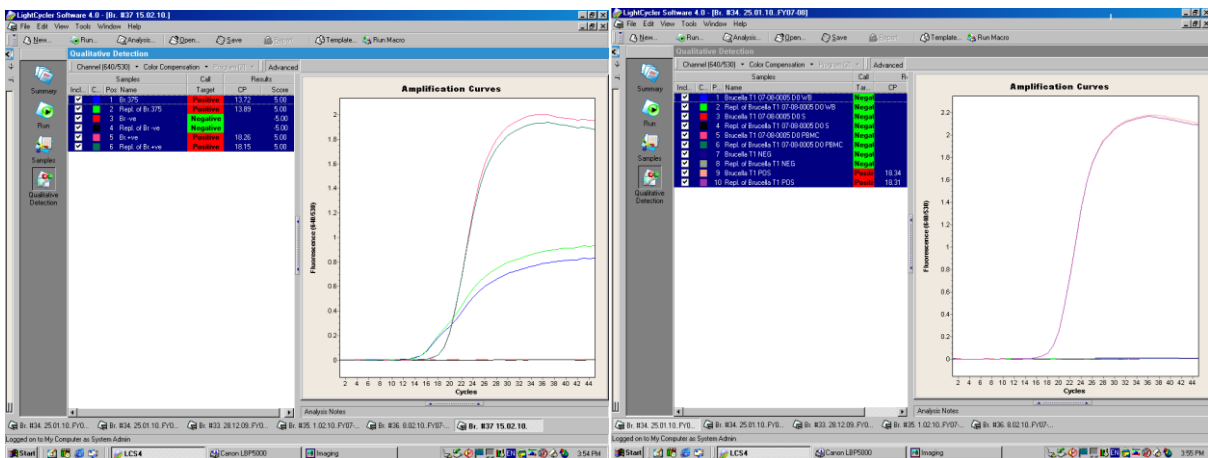
მკვლ დნმ-ი ემატებოდა მშრალ სარეაქციო არეს, რომელიც შეიცავდა ამპლიფიკაციისათვის აუცილებელ Mg+2-ის იონებს, Taq-პოლიმერაზას, სპეციფიკური უზნის პრაიმერებსა და ფლოროესცენტული საღებავით მონიშნულ ზონდს. ნარევი თანაბრად ნაწილდებოდა ორ კაპილარში და იდგმებოდა ამპლიფიკატორში შემდეგი სარეაქციო პირობებით (ცხრილი #4)

ცხრილი 4. პჯრ-ის პირობები

საწყისი დენატურაცია	95°C	2 წთ	45 ციკლი
დენატურაცია	95°C	1 წმ	
ამპლიფიკაცია	60°C	20 წმ	

შედეგების ვიზუალიზაცია რეაქციის მიმდინარეობის პარალელურად ხდებოდა, ხოლო მათი საბოლოო შეფასება რეაქციის დასრულებისთანავე იყო შესაძლებელი. რეაქციის სრული დრო 30 წუთს შეადგენდა.

სურათი #4. *Brucella spp.*-ს პჯრ რეალურ დროში



3.4.3. AMOS პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქცია (AMOS პჯრ)

AMOS პჯრ ბრუცელას შტამების ტიპირების ერთ-ერთი მეთოდია, რომელიც გამოიყენება ბრუცელას სახეობების დასადგენად. აღნიშნული რეაქცია პირველად დაინერგა 1994 წელს ცხოველთა დაავადების ეროვნულ ცენტრში (National Animal Disease Center) ბრიკერისა და ჰალინგის (Bricker, Halling) მიერ. AMOS არის აკრონიმი ბრუცელას იმ ოთხი სახეობისა (*B. abortus*, *B. melitensis*, *B. ovis* და *B. suis*), რომელთა დატიპირებაც შესაძლებელია აღნიშნული მეთოდით. აღნიშნულ პჯრ-ში რევერსული პრაიმერის სამიზნე არის ბრუცელა სპეციფიკური IS711 ინსერციული ელემენტი (ჩართული თანმიმდევრობა) და ოთხი სხვადასხვა სახეობა სპეციფიკური ფორვარდ პრაიმერი (Bricker B. და Halling S, 1994).

IS711 ფორვარდ (F) პრაიმერი: 5' – TGCCGATCACTTAAGGGCCTTCAT – 3'

B. abortus რევერს (R) პრაიმერი: 5' – GACGAACGGAATTTTTCCAATCCC – 3'

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

B. ovis R პრაიმერი: 5' – CGGGTTCTGGCACCATCGTCG – 3'

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

ბრუცელას სახეობების იდენტიფიკაცია ხდებოდა სახეობასპეციფიური ფრაგმენტების ზომის მიხედვით.

რეაქცია მიმდინარეობდა თერმოციკლერში (Techne TC-5 000 Thermal Cycler). 1მკლ დნმ-ს ემატებოდა 24 მკლ სარეაქციო არეს, რომელიც შეიცავდა: Taq PCR Master Mix Kit 2X ბუფერს (Qiagen), რომელიც შედგება: Taq-დნმ პოლიმერაზას (Taq DNA Polymerase), 3 მკმოლი (mM), Mg²⁺იონების (MgCl₂), ნუკლეოტიდების ნარევისაგან (dNTPmix-dATP/dCTP/dGTP/dTTP, თითოეულის კონცენტრაცია 400 მკმოლი) და 1მკლ 15 პრაიმერის (*B. abortus*, *B. melitensis*, *B. ovis*, *B. suis* და IS711) ნარევისაგან. სარეაქციო არეს საბოლოო მოცულობა შეადგენდა 25 მკლ.

ნარევი ნაწილდებოდა 0.2 მკლ-იან სინჯარებში და იდგმებოდა თერმოციკლერში შემდეგი სარეაქციო პირობებით (ცხრილი #5).

ცხრილი 5. AMOS პჯრ-ს პირობები

საწყისი დენატურაცია	94°C – 2 წთ
დენატურაცია	94°C – 30 წმ
გამოწვა	55.5°C - 30 წმ
ამპლიფიკაცია	72°C - 30 წმ
საბოლოო ელონგაცია	72°C – 2წთ
დაყოვნება	4°C

დენატურაცია და ამპლიფიკაციის ციკლი მეორდება 35-ჯერ.

პჯრ-ის შედეგად მიღებული დნმ-ის ფრაგმენტების ვიზუალიზაცია და ანალიზი წარმოებდა გელ-ელექტროფორეზის საშუალებით.

- 1,2%-იანი აგაროზის გელი მზადდებოდა 1xTBE ბუფერში და ისხმევოდა გელის ყალიბში;
- გელის სასტარტო მხარეს თავსდებოდა ე. წ. ”სავარცხელი”. გელის გამყარების შემდეგ მათი ამოღების შედეგად წარმოიქმნებოდა ფოსოები;
- თითოეულ ფოსოში შეგვექონდა გელში ჩასატვირთ საღებავთან (6x Gel loading blue) წინასწარ შერეული, 10µl მოცულობის, საკვლევი, საკონტროლო უარყოფითი და დადებითი ნიმუშები;
- ნიმუშების პარალელურად გელის საწყის და საბოლოო ფოსოში შეგვექონდა 2 µl 100bp მოლეკულური ზომის მარკერი (DNA Ladder);
- გელი თავსდებოდა ელექტროფორეზის აპარატში, ემატებოდა 1xTBE ბუფერი (გელის სრულად დაფარვამდე) და აპარატი უერთდებოდა დენის წყაროს (120V; 100mA), 40 წთ-ით;
- ელექტროფორეზის დამთავრების შემდეგ გელი იღებებოდა ეთიდიუმ ბრომიდის ხსნარით (100 მკლ/ლ) 10–15 წთ-ის განმავლობაში და ირეცხებოდა სტერილური წყლით;
- მიღებული პროფილის ვიზუალიზაცია ხდებოდა ტრანსილუმინატორზე, ულტრაიისფერი გამოსხივების (სპექტრი 290-330ნმ) საშუალებით.

ბრუცელას სახეობები დგინდებოდა წინასწარ ცნობილი, ამპლიფიცირებული პროდუქტის მოლეკულური წონის მიხედვით:

B. abortus (ბიოვარი 1, 2 და 4) - 498 bp

B. melitensis - 731 bp

B. ovis - 976 bp

B. suis - 285 bp

3.4.4. ერთ-ნუკლეოტიდური პოლიმორფიზმი (SNP)

B. abortus-ის ზოგიერთი ბიოვარის გამოვლენისათვის გამოვიყენეთ SNP ტიპირება, რისთვისაც თითოეული ნიმუშის სამ ლოკუსზე იდგმებოდა პჯრ.¹¹⁷

- *Glk* (glucokinase)
- *Omp* (omp – 25 kDa outer membrane proteine)
- *Trp* (anthranilate synthas)

ცხრილი #6 პრაიმერების სექვენსი, გამოყენებული SNP ტიპირებისთვის

1. პრაიმერის დასახელება	2. პრაიმერის თანმიმდევრობა(5'-3')
<i>glk</i> up	5'-TATGGAAMAGATCGGCGG-3'
<i>glk</i> down	5'-GGGCCTTGTCTCGAAGG-3'
<i>omp25</i> up	5'-ATGCGCACTCTTAAGTCTC-3'
1. პრაიმერის დასახელება	2. პრაიმერის თანმიმდევრობა(5'-3')
<i>omp25</i> down	5'-GCCSAGGATGTTGTCCGT-3'
<i>trpE</i> up	5'-GCGCGCMTGGTATGGCG-3'
<i>trpE</i> down	5'-CKCSCCGCCATAGGCTTC-3'
<u>ერთი ნუკლეოტიდით დაგრძელება</u>	
glk196R (<i>glk</i> -1344)	5_-CGCTAAGAATTTGYTCGCCGG-3_

glk427R (<i>glk</i> -1557)	5_-TTTTTTTTTTTGAAGGATGCGCAC CGGGATGC-3_
glk255R (<i>glk</i> -1403)	5_-TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAGGGTG GGCGTGATCTTGTCGGC-3_
omp151F (<i>omp</i> 25-3627)	5_-TGGCTATACCGGTCTTACCTTGG CTA-3_
omp239F (<i>omp</i> 25-3715)	5_-TTTTTTTTTTTTTTTTTCTTTGCTGG CTGGAACCTCCAG-3_
trp290R (<i>trpE</i> -2858)	5_-TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT TGAAACCTTGGCGCCCGTCTGG-3_

SNP ტიპირების მეთოდი შედგებოდა რამდენიმე ეტაპისაგან:

პირველი ეტაპი: პჯრ

პჯრ-ისთვის გამოიყენებოდა Invitrogen-ისნაკრები (Platinum PCR SuperMix High Fidelity), 1.1X ბუფერით (Invitrogen PCR 1.1X buffer), რომელიც შედგება:

- Taq-დნმ პოლიმერაზა;
- Pyrococcus სახეობის GB-D თერმოსტაბილურიპოლიმერაზა (Pyrococcus species GB-D thermostable polymerase);
- პლატინუმ-ტაკ ანტისხეულები (Platinum Taq Antibody);
- 66 მკმოლი Tris-SO4 (pH – 8.9), 19.8 მკმოლი (მმოლი) (NH4)2SO4;
- 2.4 მკმოლი MgSO4;
- 220 მკმოლი (მკმოლი) დეზოქსინუკლეოზიდტრიფოსფატები (dNTP);
- სტაბილიზატორები.

აღნიშნულ ნაკრებს ემატებოდა 50 მკმოლი პრაიმერების ნარევი (*glk*, *omp*, *trp*) და ბრუცელას იზოლატიდან ექსტრაგირებული 0.25 მკლ დნმ-ი. სარეაქციო არის მოცულობა შეადგენდა 25 მკლ-ს. ნარევი ნაწილდებოდა 0.2 მკლ სინჯარებშიდა იდგმებოდა თერმოციკლერში პჯრ-ის პროგრამის შესაბამისად (ცხრილი #7).

ცხრილი #7. პირველი ეტაპი: პჯრ-ის პირობები

საწყისი დენატურაცია	95°C	10 წთ
დენატურაცია	95°C	45 წმ
გამოწვა	53°C	45 წმ
ელონგაცია	72°C	45 წმ
საბოლოო ელონგაცია	72°C	7 წთ
დაყოვნება	4°C	

} 35 ციკლი

ამპლიფიცირებული უბნების სანახავად, 2მკლ ამპლიფიცირებულ პროდუქტს ემატებოდა 1 მკლ საღებავი და შეგვქონდა წინასწარ მომზადებულ 1.2 % აგაროზის გელში. გელის პირველ და ბოლო ფოსოებში შეგვყავდა 1მკლ, 100bp მოლეკულური წონის მარკერი.

მეორე ეტაპი: ExoSAP-ით გაწმენდა

ამპლიფიცირებული პროდუქტის, დეზოქსინუკლეოზიდ ტრიფოსფატებისგან (dNTPs) და პრაიმერებისგან გასაწმენდად, 5მკლ ნიმუშს ემატებოდა 2 მკლ ეგზოსაპი (ExoSAP-IT, USB Corporation, Ohio, USA) და თავსდებოდა თერმოციკლერში შემდეგი პროგრამის შესაბამისად:

ინკუბაცია – 37°C, 15 წთ

ინაქტივაცია – 80°C, 15 წთ

მესამე ეტაპი: ერთი ნუკლეოტიდით დაგრძელების რეაქცია - Single Base Extension (SBE)

Reaction:

ამ რეაქციისათვის საჭიროა Beckman codex-ის ნაკრები (GenomeLab SNPStart primer extension kit, Beckman codex). აღნიშნული ნარევი შეიცავდა:

- 10x ბუფერს
- დიდებოქსინუკლეოზიდ ტრიფოსფატებს – ddTTP, ddGTP, ddCTP, ddATP,
- პოლიმერაზას.

ერთი ნუკლეოტიდით დაგრძელების რეაქციისათვის მზადდებოდა პრაიმერების ნარევი (ცხრილი # 8).

ცხრილი # 8

SNP პრაიმერის სახელწოდება	საწყისი კონცენტრაცია (მკმოლი)	საბოლოო კონცენტრაცია (მკმოლი)	მოცულობა (მკლ)
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

ნარევის ემატებოდა 4,5 მკლ წყალი, პრაიმერების ნარევი და 0,8 მკლ გასუფთავებული პროდუქტი და თერმოციკლერში თავსდებოდა შემდეგი პროგრამის მიხედვით (ცხრილი #9).

ცხრილი #9

საწყისი დენატურაცია	95°C	5 წმ
დენატურაცია	96°C	20 წმ
გამოწვა	64°C	10 წმ
ელონგაცია	72°C	30 წმ
საბოლოო ელონგაცია	72°C	7 წმ
დაყოვნება	4°C	

28ციკლი

მეთხე ეტაპი: Shrimp Alkaline Phosphatase-ით (SAP) გაწმენდა

მესამე ეტაპის შემდეგ მიღებულ პროდუქტი, დარჩენილი დიდფოქსინუკლეოზიდ ტრიფოსფატების მოცილების მიზნით იწმინდებოდა 3 მკლ გამწმენდი ნარევით (0,25 მკლ Roche SAP, 1,30 მკლ SAP ბუფერი და 1,45 მკლ - H₂O) და იდგმებოდა თერმოცილკერში შემდეგ პროგრამაზე:

37°C 30 წთ

65°C 15 წმ

მეხუთე ეტაპი: კაპირალური ფორეზი

39 მკლ SLS (Beckman Coulter GenomeLab Sample Loading Solution) და მოლეკულური წონის სტანდარტის (Beckman Coulter CEQ DNA Size Standard 80) ნარევს ემატებოდა მეოთხე ეტაპის შედეგად მიღებული 0.5 მკლ საბოლოოდ გაწმენდილ ნიმუში. აღნიშნული ნარევი შეგვქონდა 96 ფოსოიან პლანშეტში, რომელიც თავსებადი უნდა ყოფილიყო Beckman Coulter CEQ System-ისთვის. შეტანილ ნიმუშებს ემატებოდა მინერალური ზეთის თითო წვეთი და თავსდებოდა კაპირალური ფორეზის აპარატში (CEQ 8000, Beckman Coulter CEQ System).

შედეგების ინტერპრეტაცია:

მიღებული შედეგების ინტერპრეტაცია ხდებოდა სპეციალური პროგრამის (CEQ/GenomeLab Software Version 8.0), პიკების ზომისა და ფერის მიხედვით. შედეგების ანალიზისათვის გამოიყენებოდა სპეციალური ცხრილი, რომელიც ასახავდა ბრუცელას ცალკეული სახეობებისათვის დამახასიათებელ სპეციფიკურ მარკერებს (ცხრილი # 10).

ცხრილი # 10.

ბრუცელას სახეობა	glk196R- 22 (glk-1344)	glk427R - 33 (glk-1557)	glk255R - 44 (glk-1403)	omp151F - 28 (omp25-3627)	omp239F - 40 (omp25-3715)	trp290R - 50 (trpE-2858)
<i>B. abortus</i> (გენოტიპი A)	T	C	G	T	C	C
<i>B. abortus</i> (გენოტიპი 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
<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 <i>Brucella</i>	T	C	G	C	C	T

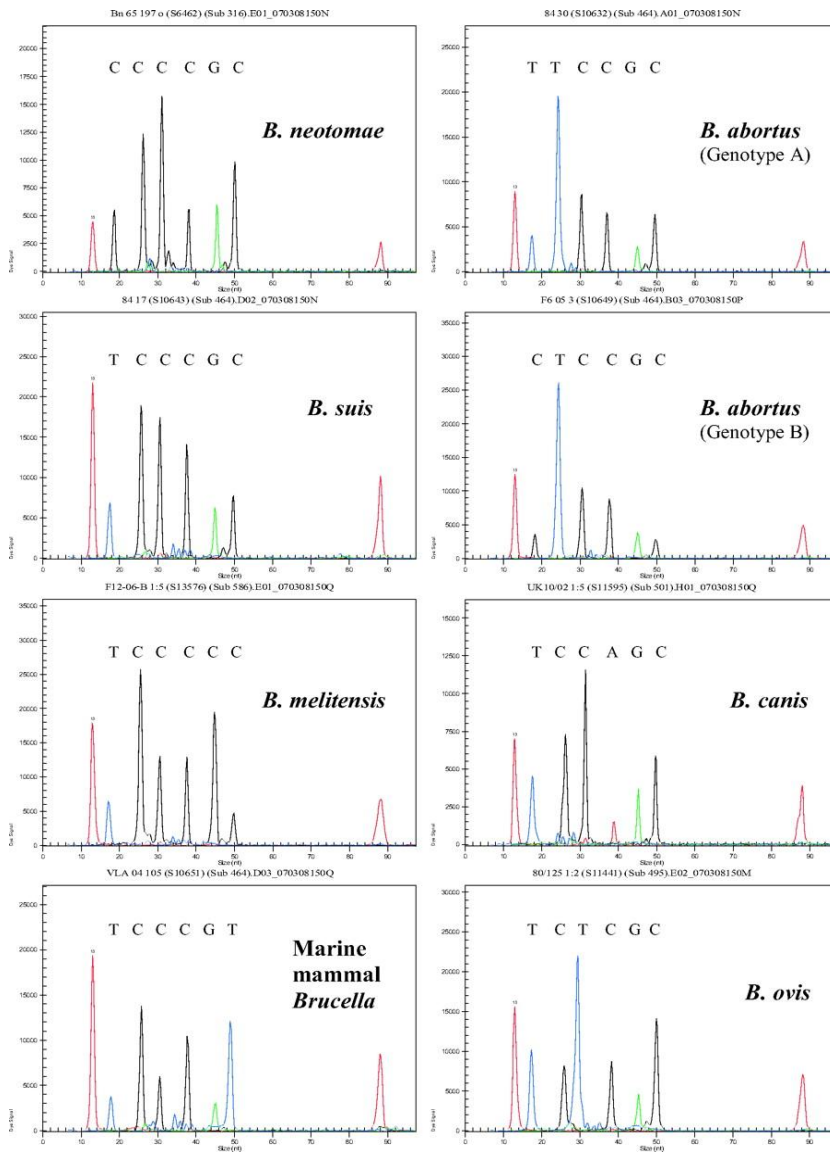
ცხრილი # 11. მულტიპლექს SNP ანალიზის პრაიმერების მაჩვენებლები¹¹⁷

პრაიმერის ერთი ნუკლეოტიდით დაგრძელება	დაკავშირების ადგილი	სახეობების იდენტიფიკაცია	საერთო/უნიკალური ნუკლეოტიდი	პრაიმერის ზომა	SNP ლოკუსის ზომა
<i>glk196R</i>	<i>glk-1344</i>	<i>B. neotomae</i>	C/T	21	18.9
<i>omp151F</i>	<i>omp25-3627</i>	<i>B. abortus</i>	T/C	27	26.0
<i>glk427R</i>	<i>glk-1557</i>	<i>B. ovis</i>	T/C	32	30.85
<i>omp239F</i>	<i>omp25-3715</i>	<i>B. canis</i>	A/C	39	38.0
<i>glk255R</i>	<i>glk-1403</i>	<i>B. melitensis</i>	C/G	43	45.1
<i>trp290R</i>	<i>trpE-2858</i>	Marine mammal <i>Brucella</i>	T/C	49	50.25

ბრუცელას რვა განსხვავებული გენოტიპის განსაზღვრა SNP ტიპირების მეთოდით, სახეობის დონეზე. პირველი და ბოლო პიკი არის ამსახველი მოლეკულური წონის მარკერის, ხოლო ექვსი სხვადასხვა პიკი თითოეულ სურათზე ასახავს *glk196*, *omp151*,

glk427, *omp239*, *glk255* და *trp290* პიკს. პიკის თითოეული ფერი დაკავშირებულია სხვადასხვა ნუკლეოტიდთან: T-ლურჯი, C-შავი, G-მწვანე და A-წითელი (სურათი # 5).¹¹

სურათი # 5

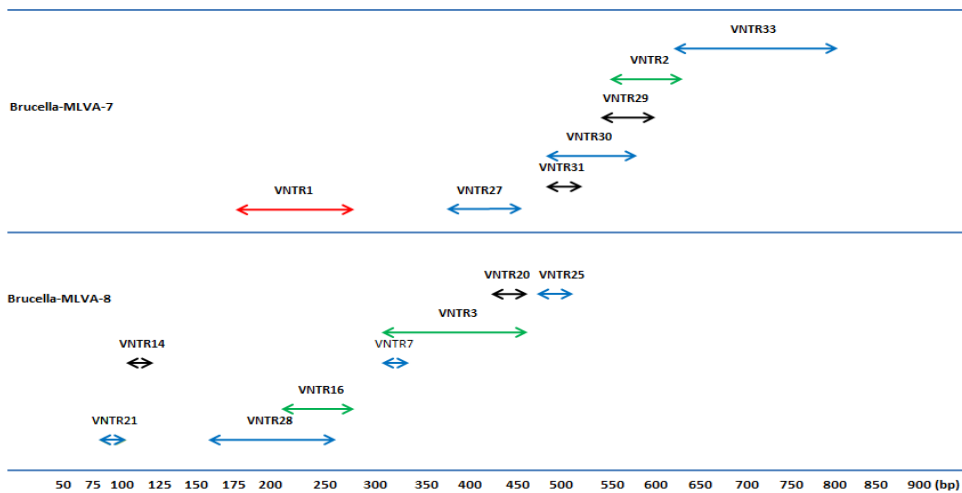


3.4.5. მრავლობითი ლოკუსების ტანდემურად განმეორებადი თანამიმდევრობების ცვლადი რაოდენობის ანალიზი

მოლეკულური ტიპირების მეთოდი MLVA (Multi Locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis) დაფუძნებულია ბაქტერიული გენომის სხვადასხვა ლოკუსებში ერთმანეთის მიმყოლი განმეორებადი თანამიმდევრობების (VNTR) რაოდენობების განსაზღვრაზე. გენომის ეს თავისებურება შტამებს შორის განსხვავებების გამოვლენის საშუალებას იძლევა. კვლევებმა აჩვენეს, რომ აღნიშნული მეთოდი უზრუნველყოფს ეპიდემიოლოგიური კვლევებისათვის ღირებული ინფორმაციის მიღებას.

ჩვენს მიერ გამოყენებულ MLVA სისტემაში შედიოდა *Brucella*-ს 15 ტანდემურად განმეორებადი თანამიმდევრობების ცვლადი რაოდენობის ლოკუსი. სამიზნე VNTR ლოკუსების ამპლიფიკაცია ტარდებოდა პჯრ-ით, ხოლო შემდგომ ამპლიკონის ზომების უფრო ზუსტად დასადგენად გამოიყენებოდა კაპილარული სექვენირების აპარატი ABI 3130xl, გენეტიკური ანალიზატორი. ამპლიკონის ზომა იცვლება სპეციფიურ ლოკუსში VNTR ასლების რაოდენობის მიხედვით (სურათი # 6).

სურათი # 6. სქემა MLVA-15 სადაც გამოიყენება 4 განსხვავებული ფლუორესცენტული საღებავით მონიშნული პრაიმერები; მწვანე-VIC, ლურჯი-FAM, შავი-NED, წითელი-PET



ცხრილი #12 პრაიმერების სექვენსი MLVA-15 პჯრ რეაქციისათვის

#	პრაიმერების დასახელება	პრაიმერების სექვენსი
1	Bruce1F-PET	GGC GGA CAG AGC CGT CGG TGG TTA C
2	Bruce1R	CCC GCG CCG GAG ATT GTT TTT GAT TAA TG
3	Bruce2F-VIC	GCG GAT CGA CTT CGA GAC ATT CAC GCT C
4	Bruce2R	GGG TCC GTA ATT GTC GGG CGC TCA G
5	Bruce3F-VIC	TCT CAT CGA CGG CAA GAT CGG CAT CAA GT
6	Bruce3R	CGC GAG GAC GAA GAG GGC ATT GC
7	Bruce7F-FAM	GAG CCC GAT GAT ATG CGG CCA ACG AT
8	Bruce7R	GGA TAT TGA CGA TAT TCT TGT GTC TTC CAG CAA AGT CAC
9	Bruce14F-NED	GGC CTG GCG CAT GCC TTG GTG
10	Bruce14R	GCG ATG TCC TGC CTG CCC CAG TTC
11	Bruce16F-VIC	GGC TAT GCG GGC GTG GAG AAC GAA CTC
12	Bruce16R	CTG CGC GCT TTG CAG GAT GCT ATG TTA GG
13	Bruce20F-NED	GCT GCG GCG GCC ATT ACC ACG C
14	Bruce20R	GCC GGC GGT TAT TCG TCC GGA TCG
15	Bruce21F-FAM	GGA AGC ATG AAA CAA ACA TCA ATA ACG GGA ACT G
16	Bruce21R	CAC AAC GGC CGC CAG ACC GAA TCT
17	Bruce25F-FAM	GAT GCG GGT CGA GGG CCT TGA GAG TG
18	Bruce25R	GAC AAT GGC CGC AAA AGC TTC CGA ACC
19	Bruce27F-FAM	GCC CGC GAC CAC GAG CGT CAA C
20	Bruce27R	GCC CGG CGA ATC TGG CTC GTC AG
21	Bruce28F-FAM	GTG CTG ACG AAG GGA AGG CAA TAA GGC AGT AG

22	Bruce28R	GCC GCC AAT GGC CGC AGG AAA G
23	Bruce29F-NED	GAG CCC GCC ATT GCA ATC GTG AAC AC
24	Bruce29R	CAC CGC TGT CCG CGC CCA CAT C
25	Bruce30F-FAM	GCC GAG GCT TGC CAT CAT TCT GAT CCT TTC
26	Bruce30R	GAC GCC AGC CTT CAA ATG TTA CCT CTC TAG CGC
27	Bruce31F-NED	CAC GGG CCC CTG CTT CTT TTC CAT TC
28	Bruce31R	GGC GCT CGC TGA TTG GCT GTG ATA TAG G
29	Bruce33F-FAM	GAT ATC ATG ACA CGC AGC CCG CGA AC
30	Bruce33R	GAA ATT CTG GCG CCC GGC TTT TTC TTC

პჯრ სარეაქციო არის მომზადება

რევერს და ფორვარდ პრაიმერების სამუშაო კონცენტრაცია უნდა ყოფილიყო 5 მკმოლი.

წინასწარ მომზადებული პრაიმერების ნარევეს ვინახავდით -20°C -ზე.

ცხრილი #13. MLVA-8 სისტემის პრაიმერების ნარევი

	კონცენტრაცია	ერთეული	საბოლოო კონცენტრაცია	ერთეული	ერთ რეაქციაზე	
რეაგენტი						
წყალი					4.35	მკლ
დნმ	10	მკგრ/მკლ	0.667	მკგრ/მკლ	1.00	მკლ
BRU-3- F&R	5	მკმოლი	0.117	მკმოლი	0.35	მკლ
BRU-7- F&R	5	მკმოლი	0.117	მკმოლი	0.35	მკლ
BRU-14- F&R	5	მკმოლი	0.05	მკმოლი	0.15	მკლ
BRU-20- F&R	5	მკმოლი	0.083	მკმოლი	0.25	მკლ
BRU-25- F&R	5	მკმოლი	0.117	მკმოლი	0.35	მკლ
BRU-16- F&R	5	მკმოლი	0.067	მკმოლი	0.20	მკლ
BRU-21- F&R	5	მკმოლი	0.1	მკმოლი	0.30	მკლ
BRU-28- F&R	5	მკმოლი	0.067	მკმოლი	0.20	მკლ
2x Taq PCR Master Mix	2	X	1	X	7.50	მკლ

საბოლოომოცულობა 15.00

ცხრილი #14. MLVA-7 სისტემის პრაიმერების ნარევი

	კონცენტრაცია	ერთეული	საბოლოო კონცენტრაცია	ერთეული	ერთ რეაქციაზე	
რეაგენტი						
წყალი					4.35	მკლ
დნმ	10	მკგრ/მკლ	0.667	მკგრ/მკლ	1.00	მკლ
Bruce-1-F&R	5	მკმოლი	0.117	მკმოლი	0.35	მკლ
Bruce-27-F&R	5	მკმოლი	0.117	მკმოლი	0.35	მკლ
Bruce-31-F&R	5	მკმოლი	0.05	მკმოლი	0.15	მკლ
Bruce-30-F&R	5	მკმოლი	0.083	მკმოლი	0.25	მკლ
Bruce-29-F&R	5	მკმოლი	0.117	მკმოლი	0.35	მკლ
Bruce-2-F&R	5	მკმოლი	0.067	მკმოლი	0.20	მკლ
Bruce-33-F&R	5	მკმოლი	0.1	მკმოლი	0.30	მკლ
2x Taq PCR Master Mix	2	X	1	X	7.50	მკლ

საბოლოომოცულობა 15.00

სხვადასხვა სინჯარაში მზადდებოდა VNTR-7 და VNTR-8 ნარევი.

MLVA 15 პჯრ რეაქციის პროგრამა: (ცხრილი # 15)

1. საწყისი დენატურაცია	95°C - 5 წთ	} 35 ციკლი
2. დენატურაცია	95°C - 30 წთ	
3. გამოწვა	60°C - 30 წამი	
4. ამპლიფიკაცია	72°C - 1 წთ	
5. საბოლოო ელონგაცია	72°C - 5 წთ	
6. დაყოვნება	4°C	

ამპლიფიცირებული პროდუქტის მომზადება ABI 3130xl გენეტიკურ ანალიზატორში გასაშვებად

ამპლიფიცირებული პროდუქტი ზავდებოდა 1:10. 2 მკლ ამპლიფიცირებულ პროდუქტს 18 მკლ ემატებოდა გამოხდილი წყალი. ცალკე სინჯარაში მზადდებოდა ფორმამიდისა და 1200LIZ ნარევი (19 მკლ ფორმამიდი და 0.5მ კლ 1200LIZ), რომელსაც ემატებოდა 1მკლ განზავებული ამპლიფიცირებული პროდუქტი.

პროდუქტის დენატურაციისათვის სინჯარები იდგმებოდა თერმოციკლერში 95°C-ზე 5წთ-ით.

პროგრამის დასრულებისთანავე სინჯარები თავსებოდა ყინულში, 3-5 წთ-ით. შემდგომი ეტაპი გრძელდებოდა 16-კაპილარიან გენეტიკურ ანალიზატორში (ABI 3130 XL Genetic Analyser), სადაც ელექტროფორეზი კაპილარებში მოთავსებულ თხევად პოლიმერში მიმდინარეობდა.

ფლუორესცენტულად მონიშნული ამპლიკონები მაღალი ძაბვის პირობებში მოლეკულური წონის მიხედვით განცალკევდებოდნენ.

ხოლო შედეგების ათვლის ფანჯარასთან მოხვედრის შემდეგ ლაზერული კამერა ფლუორესცენტულ ნათებას აფიქსირებდა.

რეაქციის დასრულების შემდეგ მიღებული შედეგები ამავე სისტემის ფრაგმენტული ანალიზის პროგრამაში მუშავდებოდა და ამპლიკონის ზუსტი ზომა მოლეკულური წონის სტანდარტთან შედარებით ისაზღვრებოდა. კონკრეტული ლოკუსისთვის VNTR-ის ვარიანტების დადგენა მიღებული გენოტიპების რაოდენობის საფუძველზე ხდებოდა.



სურათი #7. VNTR ალელების ფრაგმენტების ზომების განმსაზღვრელი რუკა

Appendix 3. Allele coding chart for *Brucella* spp. MLVA. All observed alleles are assigned a code.

vntr21 allele	vntr14 allele	vntr28 allele	vntr1 allele	vntr15 allele	vntr7 allele	vntr3 allele	vntr27 allele	vntr20 allele	vntr25 allele	vntr31 allele	vntr30 allele	vntr29 allele	vntr2 allele	vntr33 allele	CODE
75	79	144	147	185	276	282	341	397	458	477	466	502	511	612	A
80	88	152	155	193	284	290	349	408	463	481	474	510	519	620	B
85	97	160	163	201	292	298	357	419	468	485	482	518	527	628	C
90	106	168	171	209	300	306	365	430	473	489	490	526	535	636	D
95	115	176	179	217	308	314	373	441	478	493	498	534	543	644	E
100	124	184	187	225	316	322	381	452	483	497	506	542	551	652	F
105	133	192	195	233	320	330	389	463	488	501	514	550	559	660	G
110	142	200	203	241	324	338	397	474	493	505	522	558	567	668	H
115	151	208	211	249	328	346	405	485	498	508	530	566	575	676	I
120	160	216	219	257	332	354	413	496	503	512	538	574	583	684	J
125	169	224	227	265	336	362	422	507	508	516	546	582	591	692	K
130	178	232	235	273	340	370	430	518	513	520	554	589	599	700	L
135	187	240	243	281	344	378	438	529	518	524	562	597	607	708	M
140	196	248	251	289	348	386	446	540	523	528	570	605	615	716	N
145	205	256	259	298	352	394	454	551	528	532	578	613	623	724	O
150	214	264	267	298	356	402	462	562	533	536	586	621	631	732	P
155	223	272	275	305	360	410	470	573	538	540	594	629	639	740	Q
160	232	280	283	314	364	418	478	584	543	544	602	637	647	748	R
165	241	288	291	322	368	426	486	595	548	548	610	645	655	756	S
170	250	296	299	330	372	434	494	606	553	552	618	653	663	764	T
175	259	304	307	338	376	442	502	617	558	556	626	661	672	772	U
180	268	312	315	346	380	450	510	628	563	560	634	669	680	780	V
185	277	320	323	354	384	458	518	639	568	564	642	678	688	788	W
190	286	328	331	362	388	466	526	650	573	568	650	686	696	796	X
195	295	336	339	370	392	474	534	659	578	572	658	694	704	804	Y
200	384	344	348	378	396	482	542	668	583	576	666	702	712	812	Z

3.4.6. Brucellader პჯრ

აღნიშნული მეთოდი გამოიყენება ბრუცელას ქვემოთ ჩამოთვლილი სახეობების საიდენტიფიკაციოდ:

- *Brucella abortus*
- *Brucella melitensis*
- *Brucella suis*
- *Brucella canis*
- *Brucella ovis*
- *Brucella neotomae*
- *Brucella ceti*
- *Brucella pinnipedialis.*

BruceLadder პჯრ-ისთვის საჭირო რეაქტივები:

- Platinum® Taq DNA პოლიმერაზა (5მკლ) (Life technologies)
- 10X PCR ბუფერი (Life technologies)
- 2.5 მკმოლი dNTPs (Life technologies)
- 50 მკმოლი MgCl₂ (Life technologies)
- BruceLadder პრაიმერების ნარევი
- PCR სინჯარები
- გენომური დნმ-ი
- მოლეკულური კვლევებისათვის საჭირო სტერილური წყალი
- 6x დნმ-ის გელში ჩასატვირთი საღებავი
- 1 Kb მოლეკულური წონის მარკერი (Life technologies)
- აგაროზის გელის მოსამზადებელი ფხვნილი (Fisher Scientific)

ცხრილი #16. BruceLadder პჯრ-ის სარეაქციო არის მომზადება

რეაქტივები	მოცულობა
10X PCR ბუფერი	2.5 მკლ
2.5 მკმოლი dNTPs	2.5მკლ
50 მკმოლი MgCl ₂	1.5 მკლ
BruceLadder პრაიმერების ნარევი	2.0 მკლ
Platinum <i>Taq</i> DNA პოლიმერაზა (5u/ μl)	0.2 მკლ
წყალი	15.3 მკლ
დნმ	1მკლ
სულ	25 მკლ

ცხრილი # 17 BruceLadder პჯრ-ის რეაქციის პროგრამა

1. საწყისი დენატურაცია	95°C - 5 წთ	
2. დენატურაცია	95°C - 35 წთ	} 35 ციკლი
3. გამოწვა	63°C - 45 წამი	
4. ამპლიფიკაცია	72°C - 180 წამი	
5.საბოლოო ელონგაცია	72°C - 6 წთ	
6. დაყოვნება	4°C	

ტესტის დასადგმელად ლღვებოდა სარეაქციო არის ის რაოდენობა, რაც საკმარისია შესაბამისი რაოდენობის ნიმუშების, უარყოფითი და დადებითი კონტროლების ტესტირებისთვის. გამოლოლობის შემდეგ ნარევი პიპეტირდებოდა.

პირველადი გამოყინვის შემდეგ მზადდებოდა ალიქვოტები, რათა თავიდან აცილებულიყო ნარევის მრავალჯერადი გამოყინვა.

სარეაქციო ნარევი კომპონენტების რაოდენობების დასაანგარიშებლად გამოთვლები წარმოებდა დაახლოებით 10%-იანი მეტობით, პიპეტირების ცდომილების გათვალისწინებით.

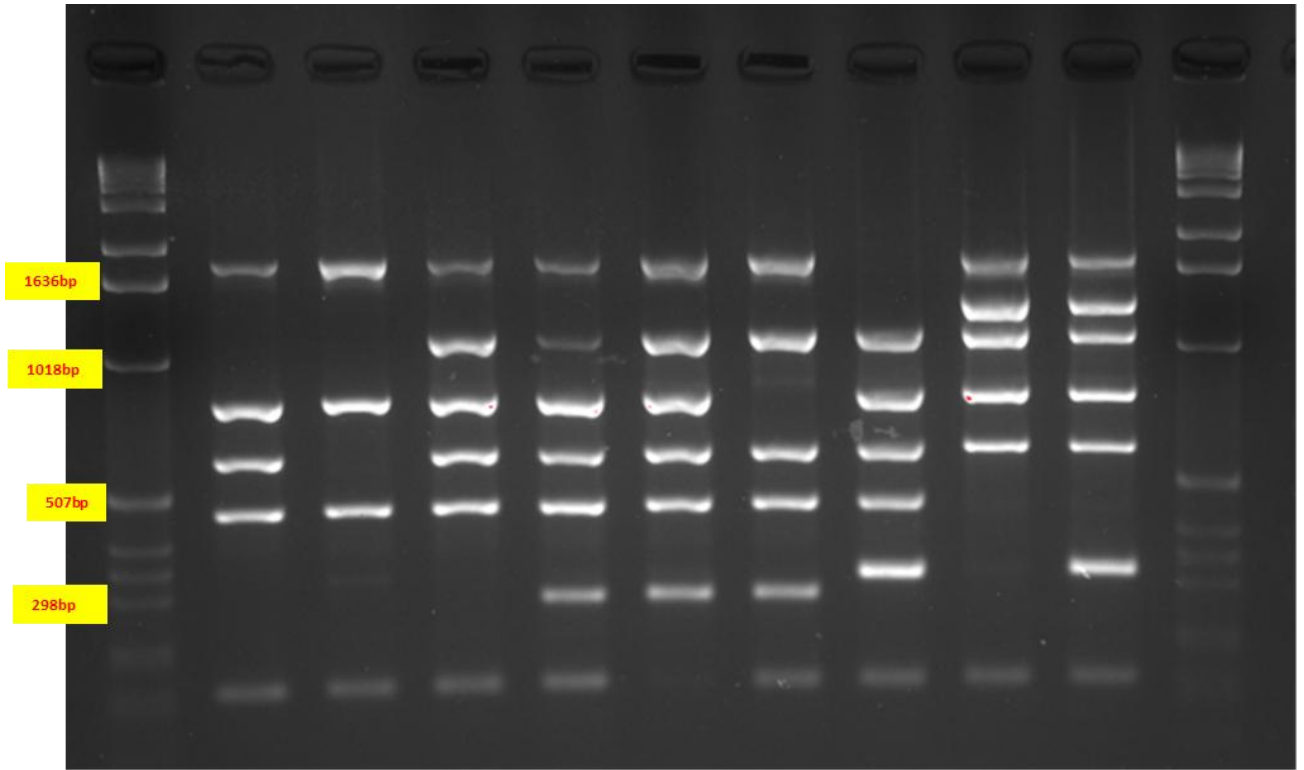
სარეაქციო ნარევი თანაბრად ნაწილდებოდა 0.2 მლ მოცულობის პჯრ-პოლიპროპილენის სინჯარებში. რეაქტივების ნარევის გამოყენება ხდებოდა მომზადებიდან ერთი საათის განმავლობაში, რადგან დაყოვნების შემთხვევაში მგრძნობიარე და ლაბილური კომპონენტები (ფერმენტები და dNTP') სწრაფად ფუჭდებოდნენ.

პჯრ-ს შედეგად მიღებული დნმ-ის ფრაგმენტების ვიზუალიზაცია და ანალიზი ტარდებოდა გელ-ელექტროფორეზის საშუალებით.

- 1,2%-იანი აგაროზის გელი მზადდებოდა 1xTBE ბუფერში და ისხმევოდა გელის ყალიბში;
- გელის სასტარტო მხარეს თავსდებოდა ე. წ. "სავარცხელი". გელის გამყარების შემდეგ მათი ამოღების შედეგად წარმოიქმნებოდა ფოსოები;
- თითოეულ ფოსოში შეგვექონდა გელში ჩასატვირთ საღებავთან (6x Gel loading blue) წინასწარ შერეული, 10 მკლ მოცულობის საკვლევი, უარყოფითი და დადებითი საკონტროლო ნიმუშები;
- ნიმუშების პარალელურად გელის საწყის და საბოლოო ფოსოში შეგვექონდა 2 მკლ 1Kb მოლეკულური ზომის მარკერი (DNA Ladder);
- გელი თავსდებოდა ელექტროფორეზის აპარატში, ემატებოდა 1xTBE ბუფერი (გელის სრულად დაფარვამდე) და აპარატი უერთდებოდა დენის წყაროს (120V; 100mA), 40 წთ-ით;
- ელექტროფორეზის დამთავრების შემდეგ გელი იღებებოდა ეთიდიუმ ბრომიდის ხსნარით (100 მგ/ლ) 10–15 წთ-ის განმავლობაში და ირეცხებოდა სტერილური წყლით;

- მიღებული პროფილის ვიზუალიზაცია ხდებოდა ტრანსილუმინატორით, ულტრაიისფერი გამოსხივების (სპექტრი 290-330ნმ) საშუალებით.

სურათი # 8. BruceLadder პჯრ-ის შედეგად მიღებული აგაროზის გელის სურათი



1 Kb მოლეკულური წონის მარკერი, 1: *B. abortus*; 2: *B. abortus* S19; 3: *B. melitensis*; 4, *B. suis*; 5, *B. neotomae*; 6. *B. canis*; 7: *B. ovis*; 8: *B. ceti*; 9: *B. pinnipedialis*; 1 Kb მოლეკულური წონის მარკერი.

3.4.7. დნმ-ის ექსტრაქცია სრული გენომური სექვენირებისათვის

სრული გენომის სექვენირებისათვის დნმ-ის ქლოროფორმით ექსტრაქცია ტარდებოდა ჩრდილო არიზონის უნივერსიტეტის (აშშ) მიერ მოწოდებული პროტოკოლის მიხედვით.

1. ორ პეტრის ფინჯან ფარელის ნიადაგზე გათესილი ბრუცელას იზოლატები გადაგვექონდა სინჯარაში, სადაც წინასწარ იყო ჩასხმული ბუფერი, რომელიც შეიცავდა 11 მკლ RNase A (100 მგ/მლ) და 11 მლ TE ნარევს;

2. ერთგვაროვან სუსპენზიას თავდაპირველად ვათავსებდით თხევად აზოტში 1 წთ-ით, სრულ გაყინვამდე ან მშრალ ყინულში (ამ ეტაპზე სუსპენზია შეიძლება ინახებოდეს გაყინულ მდგომარეობაში 3-7 დღე). შემდეგ 65°C-ზე წყლის აბაზანაში 5-10 წთ-ით, სრულ გამოდნობამდე. გაყინვა-გამოდნობის პროცედურას ვიმეორებდით 3-ჯერ;
3. სუსპენზიას ვაგრილებდით ოთახის ტემპერატურამზე 5 წთ-ის განმავლობაში, წყლის აბაზანაში ტემპერატურა ჩამოგვყავდა 55°C-მდე. სუსპენზიას ვამატებდით 225 მკლ 20%-იანი SDS-ს და 45 მკლ პროტეინაზა K-ს (20 მგ/მლ) და ფრთხილი შერევის შემდეგ (1-2 წთ) ვდგამდით 2 სთ-ით წყლის აბაზანაში, 55°C ინკუბაციაზე;
4. ინკუბაციის დასრულებისას წყლის აბაზანაში ტემპერატურა აგვყავდა 65°C-ზე;
5. ინკუბაციის დასრულების შემდეგ ნარევს ვამატებდით 2.5 მლ 5 M NaCl და 5 წთ განმავლობაში ფრთხილად ვურევდით;
6. თითოეულ სინჯარას ვამატებდით 1.4 მლ CTAB/NaCl-ს (10% ჰექსა-დეცილ-ტრიმეთილ-ამონიუმ ბრომიდი (CTAB), 0.7 M NaCl ხსნარში) და კვლავ ფრთხილად ვურევდით ერთმანეთს 10 წთ-ის განმავლობაში;
7. ნარევის 10 წთ-იან ინკუბაციას ვახდენდით 65°C-ზე წყლის აბაზანაში;
8. ინკუბაციის დაწყებისას ცენტრიფუგას ვაცივებდით 4°C-მდე;
9. ინკუბაციის შემდეგ ნარევს 5 წთ-ით ვაყოვნებდით ოთახის ტემპერატურაზე. შემდეგ სწრაფად ვუმატებდით 12 მლ წინასწარ მომზადებულ ქლოროფორმისა და იზოამილის ნარევს და 10 წთ-ის განმავლობაში ნელი მოძრაობით ვანჯღრევდით;
10. სინჯარები ვდგამდით წინასწარ 4°C-ზე გაციებულ ცენტრიფუგაში და 10 წთ-ის განმავლობაში 4000 ბრ/წთ (3220×g) სიჩქარით ვაცენტრიფუგირებდით;
11. ახალ სინჯარაში გადატანის შემდეგ ზედა გამჭვირვალე ფაზას ისევ ვამატებდით 12 მლ ქლოროფორმიზოამილის ნარევს და ვდგამდით ცენტრიფუგაში 4°C-ზე, 4000 ბრ/წთ (3220×g), 10 წთ-ის განმავლობაში;
12. ზედა ფაზა ვფილტრავდით 0.22 მკმ ფილტრში და ახალ სინჯარაში გადატანის შემდეგ ვამატებდით 0.6 მოცულობა იზოპროპანოლს, რომელიც კარგად ერეოდა დნმ-ს და ვათავსებდით ინკუბაციაზე -20°C მაცივარში, მთელი ღამის განმავლობაში;

13. მეორე დღეს სინჯარის ვაცენტრიფუგებდით 4000 ბრ/წთ სიჩქარეზე 4°C-ზე, 30 წთ-ის განმავლობაში, რათა სინჯარის ფსკერზე მიგველო კარგი ნალექი.

რეცხვის ეტაპი:

14. ცენტრიფუგირების დასრულების შემდეგ სუპერნატანტს ფრთხილად ვღვრიდით. ნალექს ვამატებდით 1 მლ 70%-იანი ეთანოლს და ვაცენტრიფუგირდით 4°C-ზე, 10 წთ-ის განმავლობაში, 4000 ბრ/წთ (3220×g) სიჩქარეზე;
15. სუპერნატანტის გადაღვის შემდეგ, ნალექი შრებოდა და ვამატებდით 300 მკლ სტერილურ TE ბუფერს და ვდგამდით 4°C-ზე მთელი ღამის განმავლობაში, რათა მომხდარიყო დნმ-ის სრული გახსნა;
16. ზემოთ ჩამოთვლილი ეტაპების დასრულების შემდეგ მიღებული მაღალკონცენტრირებული გენომურ დნმ-ს ვამოწმებდით სტერილობაზე;
17. 15 მკლ დნმ-ს ვაწვეთებთ ფარელის აგარს და ვახდენდით მის ინკუბაციას 37°C-ზე, 72 სთ-ის განმავლობაში. ნაზარდის წარმოქმნის შემთხვევაში დნმ-ს ხელმეორედ ვფილტრავდით 0.2 მკმ ფილტრში.

3.4.8. სრული გენომის სექვენირება

სრული გენომის სექვენირებისათვის დკსჯეც-ის კოლექციიდან შევარჩიეთ MLVA-15 კვლევით განსაზღვრული ძირითადი გენეტიკური კლასტერებისგან ათი შტამი, რომლებიდანაც ჩავატარეთ გენომური დნმ-ის ექსტრაქცია და გენომის სექვენირება ვოლტერ რიდის სამხედრო კვლევით ინსტიტუტში (WRAIR) Roche GS FLX სექვენსის პლათფორმაზე (Roche 454Life Sciences, Branford, CT).

დღეისათვის სრული გენომის სექვენირებისათვის სხვადასხვა ტექნოლოგიები გამოიყენება. 10 ბრუცელას შტამის სექვენირებისთვის მოკლე ფრაგმენტების წაკითხვის პრინციპით (50 bp ჩავატარეთ სექვენირება 454 Life Sciences-ის აპარატის გამოყენებით.

ზემოაღწერილი მეთოდით ექსტრაგირებული დნმ იჭრებოდა სპეციალური ფერმენტით მოკლე, 400-600 ნუკლეოტიდურ ფრაგმენტად. სექვენირების პროცესი მიმდინარეობდა ჩიპზე, სადაც დნმ-ის ადაპტორები იყო მიმაგრებული.

მოკლე დნმ-ის ფრაგმენტებს ემაგრებოდა ადაპტორები და ემატებოდა გრანულები, რომლებიც ადაპტორების თანამიმდევრობების კომპლიმენტარული იყო.

სპეციფიური უბნების გამრავლება ხდებოდა პჯრ-ს საშუალებით, რომლის შედეგადაც მიიღებოდა დნმ-ის ფრაგმენტის მილიონობით ასლი, რის შემდეგაც სარეაქციო არეს ვამატებდით პრაიმერს და ოთხ შექცევად ფლუორესცენტულ ტერმინატორულ ნუკლეოტიდს (A, G, T, C).

ციკლის დასრულების შემდეგ ხდებოდა ზედმეტი ნუკლეოტიდების გამოდევნა, ხოლო თითოეული ნუკლეოტიდური ფუძის დნმ-ში ჩართვის შედეგად წარმოიქმნებოდა ნათება და ლაზერული კამერა აფიქსირებდა ყოველი ახალი მიმაგრებული ფლუორესცენტული ზონდის ნათებას. ყოველი ციკლის შემდეგ დნმ-ის მატრიცაზე მხოლოდ ერთი ნუკლეოტიდური ფუძის მიმატება ხდებოდა.

ყოველი ციკლის წინ 3' ბოლოზე მიმაგრებული ფლუორესცენტული ზონდები ქიმიური დამუშავებით შორდებოდა და ახალი ნუკლეოტიდის მიერთების საშუალებას იძლეოდა. პროცესი დნმ-ის სრულ წაკითხვამდე გრძელდებოდა.

რეაქციის ბოლოს ასობით მილიონი წაკითხული თანამიმდევრობა სპეციალური კომპიუტერული პროგრამებით მუშავდებოდა და ხდებოდა საბოლოო სრული ჯაჭვის აწყობა, რაც ასობით ურთიერთგადაფარვადი ფრაგმენტის ანალიზის შედეგი იყო.

სექვენსის შედეგად მიღებული მონაცემების ანალიზი ტარდებოდა Roche GS Assembler პროგრამის (Newbler) გამოყენებით.

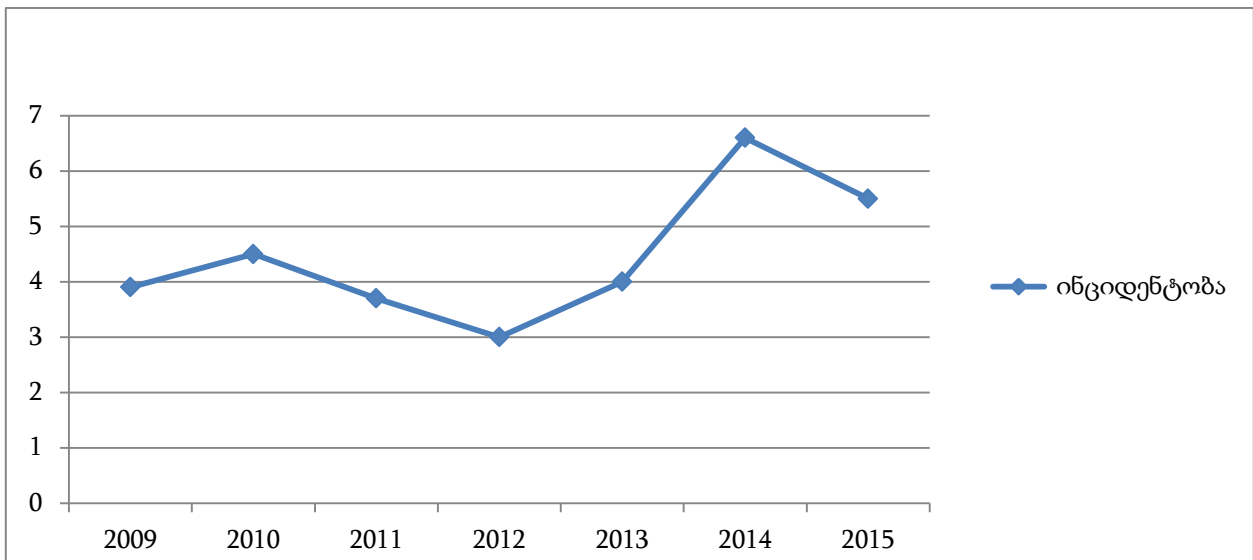
B. abortus და *B. melitensis* გენომის სექვენირების შედეგად მიღებული მონაცემები აიტვირთა გენომური ბანკის მონაცემთა ბაზაში GenBank BioProject PRJNA338234 და PRJNA339926 შესაბამისად.

4. კვლევის შედეგები

ბრუცელოზი საქართველოში (2009-2015 წწ.)

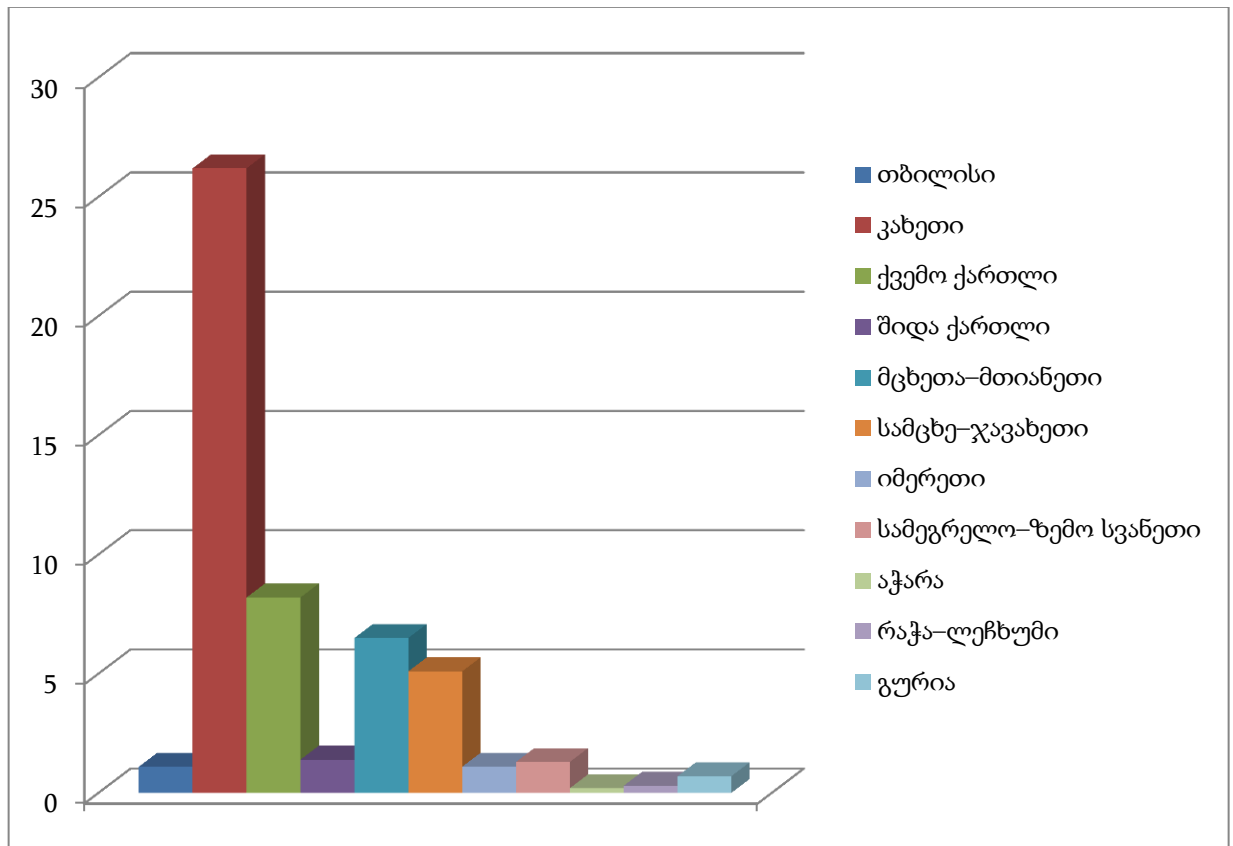
საქართველოში 2009-2015 წლებში რეგისტრირებული იყო ბრუცელოზის 1301 შემთხვევა. აღნიშნულ წლებში ბრუცელოზის ინციდენტობის (100,000 მოსახლეზე) ყველაზე დაბალი მაჩვენებელი აღინიშნა 2012 წელს - 2,98, ყველაზე მაღალი კი 2014 წელს - 6,6 (დიაგრამა #1).

დიაგრამა #1. საქართველოში ბრუცელოზის ინციდენტობის (100.000 მოსახლეზე) დინამიკა, 2009-2015 წწ.



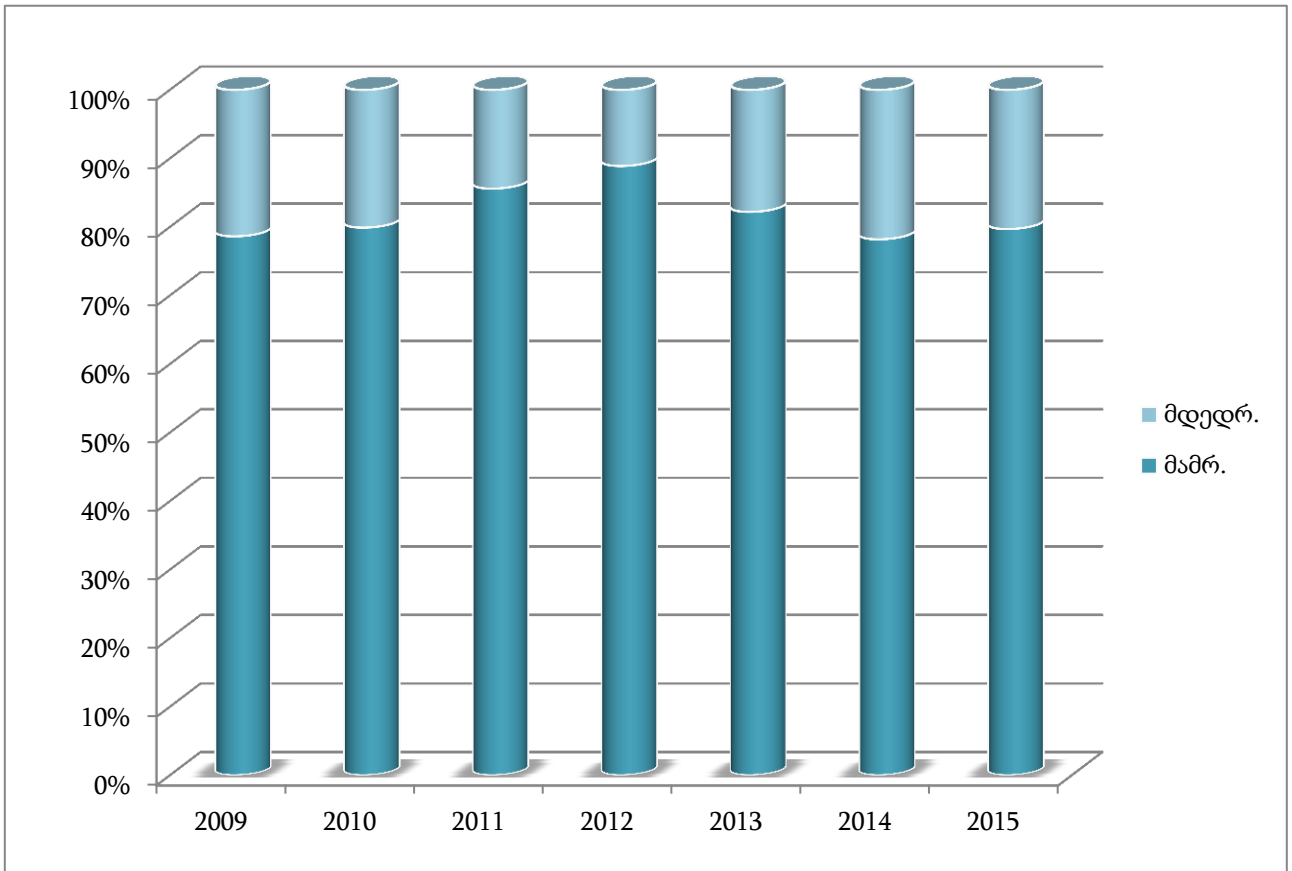
ბრუცელოზი შემთხვევები საქართველოს ყველა რეგიონში ფიქსირდება. დაავადება უპირატესად გავრცელებულია აღმოსავლეთ საქართველოში (შემთხვევათა 92,4%). ამასთან, ბრუცელოზის ინციდენტობის მაჩვენებელი (100.000 მოსახლეზე) ყველაზე მაღალია კახეთში (ინციდენტობის მაჩვენებლის დიაპაზონი: 17,4 /2012 წელი/ - 326 /2014 წელი/), ყველაზე დაბალი კი აჭარაში (0,2), რაჭა-ლეჩხუმსა (0,3) და გურიაში (0,7).

დიაგრამა # 2. ბრუცელოზის ინციდენტობა (100,000 მოსახლეზე) საქართველოს რეგიონების მიხედვით, 2009-2015 წწ.



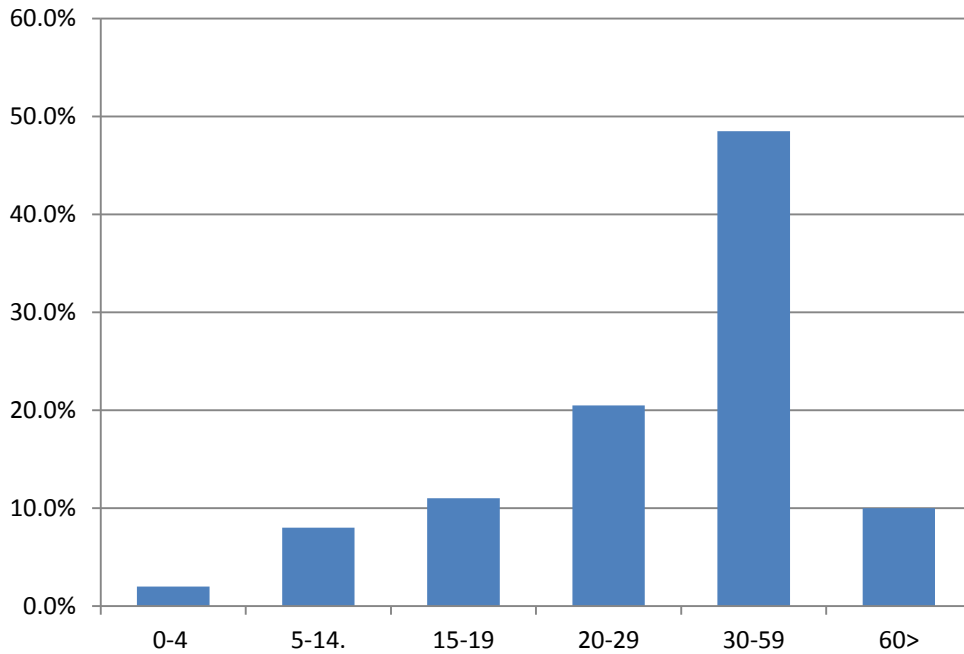
ბრუცელოზი უპირატესად მამაკაცთა შორისაა გავრცელებული (წლების მიხედვით, მამაკაცებში ბრუცელოზის შემთხვევების ხვედრითი წილის დიაპაზონია 78,2% - 88,9

დიაგრამა # 3. ბრუცელოზის შემთხვევათა სქესობრივი განაწილება (2009-2015 წწ.)



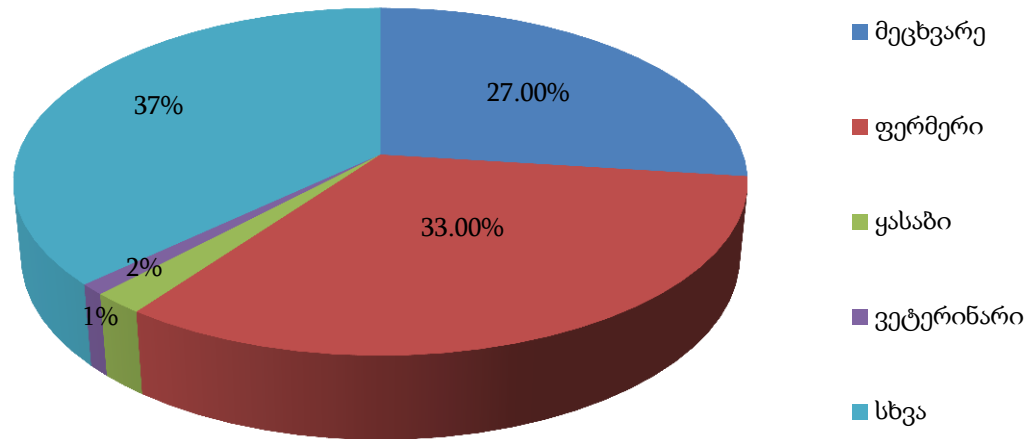
ბრუცელოზით ყველაზე ხშირად ავადდებიან 30-59 წლის პირები (ხვედრითი წილი - 48,5%), იშვიათად ბავშვები და ხანშიშესული პირები (60 და მეტი წელი) ამასთან, ბრუცელოზით დაავადებულ 30-59 წლის პირებს შორის მამაკაცები შეადგენენ 85,5%-ს.

დიაგრამა # 4. ასოკობრივი ჯგუფების მიხედვით ბრუცელოზის შემთხვევათა განაწილება (%)



ბრუცელოზით დაავადება უპირატესად დაკავშირებულია პროფესიულ საქმიანობასთან (ბრუცელოზის რეგისტრირებულ შემთხვევათა 63%) ბრუცელოზით ხშირად ავადდებიან მსხვილფეხა რქოსანი პირუტყვის ფერმერები (ბრუცელოზის შემთხვევათა 33%) და მეცხვარეები (27%).

დიაგრამა # 5. ბრუცელოზის შემთხვევათა პროცენტული განაწილება, პროფესიული ჯგუფების მიხედვით



ლაბორატორიული დიაგნოსტიკა

ბრუცელას შტამების კონფირმაცია

50 კლინიკური და 36 მსხვილფეხა და წვრილფეხა რქოსანი პირუტყვის ნიმუშებიდან მიკრობიოლოგიური მეთოდებით იდენტიფიცირებული ბრუცელას შტამების დასადასტურებლად გამოყენებულ იქნა მყისიერ დროში პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქცია (Idaho Technology, Inc, BioFire Diagnostics, Target 2). მყისიერ დროში პჯრ-მ დაადასტურა მიკრობიოლოგიური კვლევის შედეგები (ყველა შტამი ბრუცელას გვარს მიეკუთვნება).

მოლეკულური მეთოდებით ბრუცელას შტამების ტიპირება

Real-Time პჯრ-ით დადასტურებული ბრუცელას შტამების გენეტიკური ტიპირება ჩატარდა შემდეგი მოლეკულური მეთოდების: AMOS პჯრ,¹³⁶ ერთ-ნუკლეოტიდური პოლიმორფიზმის და *BruceLadder* პჯრ-ის საშუალებით (BruceLadder- PCR).

AMOS პჯრ-ის შედეგების ინტერპრეტაცია ამპლიფიცირებული ფრაგმენტების ზომების ანალიზის საშუალებით ხდებოდა. 86 შტამიდან დატიპირდა *B. abortus*-ის მხოლოდ ორი და *B. melitensis* 54 შტამი. ბრუცელას 30 შტამის დატიპირება აღნიშნული მეთოდის საშუალებით ვერ მოხერხდა (ცხრილი 18).

ცხრილი # 18. Real-time პჯრ-ით დადასტურებული ბრუცელას შტამების ტიპირება AMOS პჯრ-ის საშუალებით

N		ნიმუშის წყარო	მყისიერ დროში პჯრ	კვეთის წერტილი	AMOS პჯრ
1	FY 07-08 0002 D “0”,	ადამიანი	(+)	19	<i>B. melitensis</i>
2	FY 07-08 0002 D “2-3”	ადამიანი	(+)	20	<i>B. melitensis</i>
3	FY 07-08 0004D “0”	ადამიანი	(+)	20	<i>B. melitensis</i>
4	FY 07-08 0005 D “0”	ადამიანი	(+)	19	<i>B. melitensis</i>
5	FY 07-08 0006 D “0”	ადამიანი	(+)	20	<i>B. melitensis</i>
6	FY 07-08 0007 D “0”	ადამიანი	(+)	16	<i>B. melitensis</i>
7	FY 07-08 0007 D “8-10”	ადამიანი	(+)	16	<i>B. melitensis</i>
8	FY 07-08 0008 D “0”	ადამიანი	(+)	17	<i>B. melitensis</i>
9	FY 07-08 0013 D “0”	ადამიანი	(+)	18	<i>B. melitensis</i>
10	FY 07-08 0016 D “0”	ადამიანი	(+)	20	<i>B. melitensis</i>
11	FY 07-08 0017 D “0”	ადამიანი	(+)	16	<i>B. melitensis</i>
12	FY 07-08 0018 D “0”	ადამიანი	(+)	17	<i>B. melitensis</i>
13	FY 07-08 0019 D “0”	ადამიანი	(+)	16	<i>B. melitensis</i>
14	#051	ადამიანი	(+)	19	<i>B. abortus</i>
15	#285	ადამიანი	(+)	20	<i>B. abortus</i>

16	FY 07-08 0021 D "0"	ადამიანი	(+)	20	<i>B. melitensis</i>
17	FY 07-08 0023 D "0"	ადამიანი	(+)	16	<i>B. melitensis</i>
18	FY07-08 0026 D"0"	ადამიანი	(+)	16	<i>B. melitensis</i>
19	FY07-08 0027 D"0"	ადამიანი	(+)	18	<i>B. melitensis</i>
20	375G	ადამიანი	(+)	14	უარყოფითი
21	FY07-08 0030 D"0"	ადამიანი	(+)	15	<i>B. melitensis</i>
22	FY00-08 0036	ადამიანი	(+)	14	<i>B. melitensis</i>
23	FY08-25-X014-H014	ადამიანი	(+)	15	<i>B. melitensis</i>
24	FY 07-08-0037 D "0"	ადამიანი	(+)	14	<i>B. melitensis</i>
25	FY 07-08-0040 D "0"	ადამიანი	(+)	15	<i>B. melitensis</i>
26	FY 07-08-0041 D "0"	ადამიანი	(+)	15	<i>B. melitensis</i>
27	FY 07-08-0043 D "0"	ადამიანი	(+)	16	<i>B. melitensis</i>
28	FY 07-08-0045 D "0"	ადამიანი	(+)	16	<i>B. melitensis</i>
29	FY 07-08-0049 D "0"	ადამიანი	(+)	13	<i>B. melitensis</i>
30	FY 07-08-0053 D "0"	ადამიანი	(+)	18	<i>B. melitensis</i>
31	FY 07-08-0057 D "0"	ადამიანი	(+)	12	<i>B. melitensis</i>
32	FY 07-08-0058 D "0"	ადამიანი	(+)	13	<i>B. melitensis</i>
33	FY 08-25x013H013C002	ადამიანი	(+)	17	<i>B. melitensis</i>
34	FY 08-25x014-H014 C009	ადამიანი	(+)	16	<i>B. melitensis</i>
35	GG17-KKS 0187	ცხოველი	(+)	13	<i>B. melitensis</i>
36	GG17-KKS 0211	ცხოველი	(+)	14	<i>B. melitensis</i>
37	GG17 IM,B,0014	ცხოველი	(+)	16	უარყოფითი
38	GG17 IM,B,0018	ცხოველი	(+)	15	უარყოფითი
39	H10/2089/15-791	ადამიანი	(+)	16	უარყოფითი
40	FY 07-08-0063 D "0"	ადამიანი	(+)	14	<i>B. melitensis</i>
41	FY 07-08-0068 D "0"	ადამიანი	(+)	13	<i>B. melitensis</i>
42	GG17Tb #1	ცხოველი	(+)	17	უარყოფითი
43	GG17KKbm-0519	ცხოველი	(+)	18	უარყოფითი
44	GG17KKsb0204m	ცხოველი	(+)	13	უარყოფითი
45	GG17KKsb1109m	ცხოველი	(+)	12	უარყოფითი
46	GG17KKsb0211m	ცხოველი	(+)	13	<i>B. melitensis</i>
47	GG17KKsb0211b	ცხოველი	(+)	14	უარყოფითი
48	GG17KKsb0185m	ცხოველი	(+)	13	უარყოფითი
49	GG17KKsb0199b	ცხოველი	(+)	17	უარყოფითი
50	GG17 M,T,B, 02m	ცხოველი	(+)	15	უარყოფითი
51	GG17KKb-1102b	ცხოველი	(+)	16	უარყოფითი
52	FY-07080070	ადამიანი	(+)	14	<i>B. melitensis</i>
53	H10C-001003/03-115	ადამიანი	(+)	14	უარყოფითი
54	FY-08-25x028H028	ადამიანი	(+)	14	<i>B. melitensis</i>
55	GG17KKb0790-m	ცხოველი	(+)	13	<i>B. melitensis</i>

56	GG17KKsh0694-m	ცხოველი	(+)	13	<i>B. melitensis</i>
57	GG17KKB0521-m	ცხოველი	(+)	14	<i>B. melitensis</i>
58	R.GG17KKsh0211-b	ცხოველი	(+)	15	<i>B. melitensis</i>
59	E10 00092/03-902 (MR #1)	ცხოველი	(+)	16	უარყოფითი
60	E10 00532/03-983 (MR #2, 01,02,2010)	ცხოველი	(+)	15	უარყოფითი
61	E10 00094/03-904 (MR #3)	ცხოველი	(+)	15	უარყოფითი
62	2-003 (JBAIDS)	ადამიანი	(+)	14	<i>B. melitensis</i>
63	E10 00102/03-912 (MR #11)	ცხოველი	(+)	16	უარყოფითი
64	E10 00108/03-918 (MR #17)	ცხოველი	(+)	18	უარყოფითი
65	2-002 (JBAIDS)	ადამიანი	(+)	16	<i>B. melitensis</i>
66	FY 07080074	ადამიანი	(+)	14	<i>B. melitensis</i>
67	FY 07080075	ადამიანი	(+)	17	<i>B. melitensis</i>
68	FY 07080077	ადამიანი	(+)	13	<i>B. melitensis</i>
69	FY 07080078	ადამიანი	(+)	15	<i>B. melitensis</i>
70	GG17 KB 1556-m	ცხოველი	(+)	14	უარყოფითი
71	GG17 KB 1601-m	ცხოველი	(+)	16	უარყოფითი
72	GG17 KB 1733-m	ცხოველი	(+)	15	უარყოფითი
73	GG17 KB 1745-m	ცხოველი	(+)	16	უარყოფითი
74	GG17 KK,sh, 0841-m	ცხოველი	(+)	12	<i>B. melitensis</i>
75	11E—1804/02-1050/MR	ცხოველი	(+)	13	<i>B. melitensis</i>
76	FY 07080079	ადამიანი	(+)	18	უარყოფითი
77	GG17 IMB 0018-m	ცხოველი	(+)	12	უარყოფითი
78	GG17 IMB 0030-m	ცხოველი	(+)	13	უარყოფითი
79	GG17 TB-03-m	ცხოველი	(+)	13	უარყოფითი
80	GG17 KS 0206-m	ცხოველი	(+)	18	უარყოფითი
81	GG17 K,G, 1573-m	ცხოველი	(+)	12	უარყოფითი
82	GG17 K,B, 1271-b	ცხოველი	(+)	13	<i>B. melitensis</i>
83	2-004 (JBAIDS)	ადამიანი	(+)	18	<i>B. melitensis</i>
84	2-006 (JBAIDS)	ადამიანი	(+)	15	<i>B. melitensis</i>
85	2-007 (JBAIDS)	ადამიანი	(+)	16	<i>B. melitensis</i>
86	GG-17K,K,B,0808-m	ცხოველი	(+)	12	უარყოფითი

ერთ-ნუკლეოტიდური პოლიმორფიზმით დატიპირდა ბრუცელას ოთხმოცდაექვსივე შტამი: *B. melitensis* – 54 და *B. abortus* – 32 (ცხრილი # 19).

ცხრილი #19. ერთ-ნუკლეოტიდური პოლიმორფიზმით ბრუცელას შტამების ტიპირება

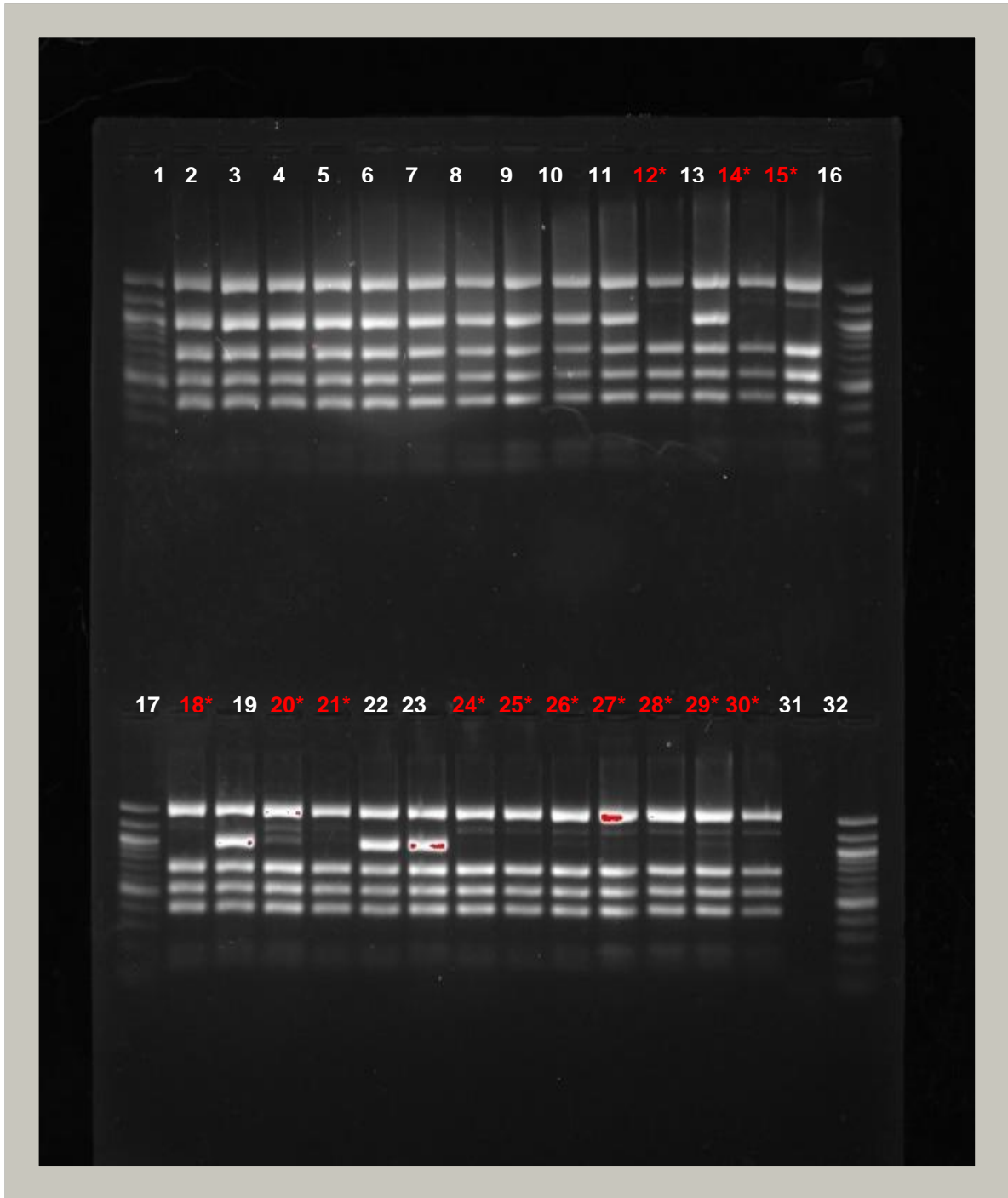
	შტამი	glk196R- 22 (glk- 1344)	glk427R - 33 (glk- 1557)	glk255R - 44 (glk- 1403)	omp151F - 28 (omp25- 3627)	omp239F - 40 (omp25- 3715)	trp290R - 50 (trpE-2858)
	<i>B. abortus</i> (გენოტიპი A)	T	C	G	T	C	C
	<i>B. abortus</i> (გენოტიპი B)	C	C	G	T	C	C
	<i>B. melitensis</i>	T	C	C	C	C	C
	<i>B. suis</i>	T	C	G	C	C	C
	<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
	<i>Marine mammal Brucella</i>	T	C	G	C	C	T
1	FY 07-08 0002 D "0",	T	C	C	C	C	C
2	FY 07-08 0002 D "2-3"	T	C	C	C	C	C
3	FY 07-08 0004D "0"	T	C	C	C	C	C
4	FY 07-08 0005 D "0"	T	C	C	C	C	C
5	FY 07-08 0006 D "0"	T	C	C	C	C	C
6	FY 07-08 0007 D "0"	T	C	C	C	C	C
7	FY 07-08 0007 D "8-10"	T	C	C	C	C	C
8	FY 07-08 0008 D "0"	T	C	C	C	C	C
9	FY 07-08 0013 D "0"	T	C	C	C	C	C
10	FY 07-08 0016 D "0"	T	C	C	C	C	C
11	FY 07-08 0017 D "0"	T	C	C	C	C	C
12	FY 07-08 0018 D "0"	T	C	C	C	C	C
13	FY 07-08 0019 D "0"	T	C	C	C	C	C
14	#051	T	C	G	T	C	C
15	#285	T	C	G	T	C	C
16	FY 07-08 0021 D "0"	T	C	C	C	C	C
17	FY 07-08 0023 D "0"	T	C	C	C	C	C
18	FY07-08 0026 D"0"	T	C	C	C	C	C
19	FY07-08 0027 D"0"	T	C	C	C	C	C
20	375G	T	C	G	T	C	C
21	FY07-08 0030 D"0"	T	C	C	C	C	C
22	FY00-08 0036	T	C	C	C	C	C
23	FY08-25-X014-H014	T	C	C	C	C	C

24	FY 07-08-0037 D "0"	T	C	C	C	C	C
25	FY 07-08-0040 D "0"	T	C	C	C	C	C
26	FY 07-08-0041 D "0"	T	C	C	C	C	C
27	FY 07-08-0043 D "0"	T	C	C	C	C	C
28	FY 07-08-0045 D "0"	T	C	C	C	C	C
29	FY 07-08-0049 D "0"	T	C	C	C	C	C
30	FY 07-08-0053 D "0"	T	C	C	C	C	C
31	FY 07-08-0057 D "0"	T	C	C	C	C	C
32	FY 07-08-0058 D "0"	T	C	C	C	C	C
33	FY 08-25x013H013C002	T	C	C	C	C	C
34	FY 08-25x014-H014 C009	T	C	C	C	C	C
35	GG17-KKS 0187	T	C	C	C	C	C
36	GG17-KKS 0211	T	C	C	C	C	C
37	GG17 IM,B,0014	T	C	G	T	C	C
38	GG17 IM,B,0018	T	C	G	T	C	C
39	H10/2089/15-791	T	C	G	T	C	C
40	FY 07-08-0063 D "0"	T	C	C	C	C	C
41	FY 07-08-0068 D "0"	T	C	C	C	C	C
42	GG17Tb #1	T	C	G	T	C	C
43	GG17KKbm-0519	T	C	G	T	C	C
44	GG17KKsb0204m	T	C	G	T	C	C
45	GG17KKsb1109m	T	C	G	T	C	C
46	GG17KKsb0211m	T	C	C	C	C	C
47	GG17KKsb0211b	T	C	G	T	C	C
48	GG17KKsb0185m	T	C	G	T	C	C
49	GG17KKsb0199b	T	C	G	T	C	C
50	GG17 M,T,B, 02m	T	C	G	T	C	C
51	GG17KKB-1102b	T	C	G	T	C	C
52	FY-07080070	T	C	G	T	C	C
53	H10C-001003/03-115	T	C	G	T	C	C
54	FY-08-25x028H028	T	C	C	C	C	C
55	GG17KKB0790-m	T	C	C	C	C	C
56	GG17KKsh0694-m	T	C	C	C	C	C
57	GG17KKB0521-m	T	C	C	C	C	C
58	R.GG17KKsh0211-b	T	C	C	C	C	C
59	E10 00092/03-902 (MR #1)	T	C	G	T	C	C
60	E10 00532/03-983 (MR #2, 01,02,2010)	T	C	G	T	C	C
61	E10 00094/03-904 (MR #3)	T	C	G	T	C	C
62	2-003 (JBAIDS)	T	C	C	C	C	C
63	E10 00102/03-912 (MR #11)	T	C	G	T	C	C
64	E10 00108/03-918 (MR #17)	T	C	G	T	C	C

65	2-002 (JBAIDS)	T	C	C	C	C	C
66	FY 07080074	T	C	C	C	C	C
67	FY 07080075	T	C	C	C	C	C
68	FY 07080077	T	C	C	C	C	C
69	FY 07080078	T	C	C	C	C	C
70	GG17 KB 1556-m	T	C	G	T	C	C
71	GG17 KB 1601-m	T	C	G	T	C	C
72	GG17 KB 1733-m	T	C	G	T	C	C
73	GG17 KB 1745-m	T	C	G	T	C	C
74	GG17 KK,sh, 0841-m	T	C	C	C	C	C
75	11E—1804/02-1050/MR	T	C	C	C	C	C
76	FY 07080079	T	C	G	T	C	C
77	GG17 IMB 0018-m	T	C	G	T	C	C
78	GG17 IMB 0030-m	T	C	G	T	C	C
79	GG17 TB-03-m	T	C	G	T	C	C
80	GG17 KS 0206-m	T	C	G	T	C	C
81	GG17 K,G, 1573-m	T	C	G	T	C	C
82	GG17 K,B, 1271-b	T	C	C	C	C	C
83	2-004 (JBAIDS)	T	C	C	C	C	C
84	2-006 (JBAIDS)	T	C	C	C	C	C
85	2-007 (JBAIDS)	T	C	C	C	C	C
86	GG-17K,K,B,0808-m	T	C	G	T	C	C

BruceLadder პჯრ-ით დატიპირდა ბრუცელას ყველა (86) შტამი: *B. melitensis* – 54 და *B. abortus* – 32

სურათი 9. ბრუცელას შტამების ტიპირება *BruceLadder* პჯრ-ით



#1. 100 კილობაზიანი მოლეკულური წონის მარკერი. თეთრ ფერში დანომრილია იზოლატები რომლებიც AMOS პჯრ-მა დაატიპირა. ხოლო წითლად არის მონიშნული იზოლატები რომლის დატიპირება მოხერხდა *BruceLadder* პჯრ-ით . #32 -უარყოფითი კონტროლი.

Brucella-ს შტამების გენეტიკური მრავალფეროვნების შესასწავლად გამოყენებულ იქნა მრავლობითი ლოკუსების ტანდემურად განმეორებადი თანმიმდევრობების ცვლადი რაოდენობის ანალიზი - MLVA15 (ცხრილი #20).

ცხრილი #20. მრავლობითი ლოკუსების ტანდემურად განმეორებადი თანმიმდევრობების ცვლადი რაოდენობის ანალიზი – MLVA15

#	შტამის ID	VNTR M1	VNTR M2	VNTR M3	VNTR M7	VNTR M14	VNTR M16	VNTR M20	VNTR M21	VNTR M25	VNTR M27	VNTR M28	VNTR M29	VNTR M30	VNTR M31	VNTR M33
1	FY 07-08 0002 D "0",	235	599	330	316	124	225	452	105	503	381	216	554	517	512	692
2	FY 07-08 0002 D "2-3"	219	575	330	316	124	225	452	105	503	413	208	554	517	512	724
3	FY 07-08 0004D "0"	219	615	330	316	124	225	441	105	503	413	216	554	517	512	692
4	FY 07-08 0005 D "0"	227	567	330	316	124	225	441	105	503	413	192	554	517	512	692
5	FY 07-08 0006 D "0"	235	615	330	316	124	225	441	105	503	389	200	554	517	508	708
6	FY 07-08 0007 D "0"	267	591	330	316	124	225	441	105	503	397	216	554	517	512	748
7	FY 07-08 0007 D "8-10"	243	623	330	316	124	225	441	105	508	413	216	554	517	512	700
8	FY 07-08 0008 D "0"	227	623	354	316	124	225	441	105	508	381	200	554	517	512	700
9	FY 07-08 0013 D "0"	219	623	338	316	124	225	441	105	508	405	200	554	517	512	708
10	FY 07-08 0016 D "0"	243	559	330	316	124	225	441	105	488	397	200	554	517	512	700
11	FY 07-08 0017 D "0"	243	607	330	316	124	225	441	105	503	397	216	554	517	516	708
12	FY 07-08 0018 D "0"	227	615	330	316	124	225	441	105	503	397	192	554	517	508	700
13	FY 07-08 0019 D "0"	227	599	330	316	124	225	441	105	503	397	192	554	517	512	700
14	#051	219	599	338	316	124	225	441	105	493	405	200	554	517	512	708
15	#285	211	631	330	316	124	225	452	105	503	389	216	554	517	512	716
16	FY 07-08 0021 D "0"	227	591	330	316	124	225	441	105	488	389	192	554	517	512	700
17	FY 07-08 0023 D "0"	227	567	330	316	124	225	441	105	508	389	208	554	517	516	660

#	შტაბის ID	VNTR M1	VNTR M2	VNTR M3	VNTR M7	VNTR M14	VNTR M16	VNTR M20	VNTR M21	VNTR M25	VNTR M27	VNTR M28	VNTR M29	VNTR M30	VNTR M31	VNTR M33
18	FY07-08 0026 D"0"	211	647	330	316	124	225	441	105	488	397	192	554	517	512	724
19	FY07-08 0027 D"0"	267	607	378	316	124	225	441	105	493	397	200	554	517	512	660
20	375G	211	623	330	316	124	225	441	105	503	397	200	554	517	512	676
21	FY07-08 0030 D"0"	243	615	346	316	124	225	441	105	508	422	200	554	517	512	700
22	FY00-08 0036	202	575	330	316	124	225	452	105	503	422	216	554	517	512	708
23	FY08-25-X014-H014	202	615	330	316	124	225	441	105	508	422	192	554	517	512	700
24	FY 07-08-0037 D "0"	235	623	330	316	124	225	452	105	508	413	216	554	517	512	739
25	FY 07-08-0040 D "0"	235	607	330	316	124	225	452	105	508	397	216	554	517	512	676
26	FY 07-08-0041 D "0"	211	591	330	316	124	225	452	105	503	405	216	554	517	512	676
27	FY 07-08-0043 D "0"	235	591	330	316	124	225	441	105	503	381	200	554	517	508	700
28	FY 07-08-0045 D "0"	251	583	338	316	124	225	441	105	508	389	200	554	517	512	692
29	FY 07-08-0049 D "0"	227	567	330	316	124	225	441	105	493	389	208	554	517	512	700
30	FY 07-08-0053 D "0"	211	559	330	316	124	225	441	105	493	397	200	554	517	512	716
31	FY 07-08-0057 D "0"	227	639	330	316	124	225	453	105	508	389	216	554	517	512	700
32	FY 07-08-0058 D "0"	243	583	354	316	124	225	441	105	508	389	208	554	517	504	668
33	FY 08-25x013H013C002	243	583	354	316	124	225	441	105	508	389	208	554	517	504	668
34	FY 08-25x014-H014 C009	235	551	434	316	124	241	441	105	478	373	208	554	554	512	676
35	GG17-KKS 0187	243	623	362	316	124	241	441	98	473	438	208	554	517	512	756
36	GG17-KKS 0211	283	607	434	316	124	241	441	105	478	373	200	554	545	512	676

#	შტაბის ID	VNTR M1	VNTR M2	VNTR M3	VNTR M7	VNTR M14	VNTR M16	VNTR M20	VNTR M21	VNTR M25	VNTR M27	VNTR M28	VNTR M29	VNTR M30	VNTR M31	VNTR M33
37	GG17 IM,B,0014	227	583	330	316	124	225	441	105	503	422	192	554	517	512	708
38	GG17 IM,B,0018	227	607	330	316	124	233	441	105	493	397	200	554	517	508	684
39	H10/2089/15-791	227	607	330	316	124	233	441	105	493	397	200	554	517	508	684
40	FY 07-08-0063 D "0"	251	591	338	316	124	225	441	105	508	397	200	554	517	512	676
41	FY 07-08-0068 D "0"	219	567	330	316	124	225	452	105	508	422	208	554	517	512	724
42	GG17Tb #1	251	583	330	316	124	225	441	105	508	422	200	554	517	512	676
43	GG17KKbm-0519	243	599	330	316	124	225	441	105	508	413	200	554	517	512	724
44	GG17KKsb0204m	219	631	330	316	124	225	452	105	508	389	224	554	517	512	684
45	GG17KKsb1109m	227	583	330	316	124	225	452	105	493	381	200	554	517	508	668
46	GG17KKsb0211m	211	583	330	316	124	225	441	105	493	413	200	554	517	512	708
47	GG17KKsb0211b	227	607	362	316	115	241	441	105	478	373	184	554	577	512	692
48	GG17KKsb0185m	267	559	362	316	115	241	441	105	478	373	184	605	498	508	676
49	GG17KKsb0199b	267	559	362	316	115	241	441	105	478	373	184	597	498	508	676
50	GG17 M,T,B.	267	559	362	316	115	241	441	105	478	373	184	597	498	508	676
51	GG17KKb-1102b	235	607	330	316	124	225	441	105	503	413	192	554	517	512	660
52	FY-07080070	251	615	330	316	124	225	441	105	508	397	208	554	517	512	668
53	H10C-001003/03-115	202	575	458	316	124	241	441	105	478	373	200	554	577	516	708
54	FY-08-25x028H028	211	599	450	316	124	241	441	105	478	373	200	554	577	512	716
55	GG17KKb0790-m	235	607	338	316	124	241	441	105	478	373	192	554	577	512	756
56	GG17KKsh0694-m	227	607	338	316	124	241	441	105	478	373	192	554	577	512	716

#	შტაბის ID	VNTR M1	VNTR M2	VNTR M3	VNTR M7	VNTR M14	VNTR M16	VNTR M20	VNTR M21	VNTR M25	VNTR M27	VNTR M28	VNTR M29	VNTR M30	VNTR M31	VNTR M33
57	GG17KKB0521-m	227	607	338	316	124	241	441	105	473	373	192	554	577	512	739
58	R.GG17KKsh0211-b	227	607	338	316	124	241	441	105	473	373	192	554	577	512	739
59	E10 00092/03-902 (MR #1)	227	567	338	316	124	241	441	105	473	373	192	554	577	512	739
60	E10 00532/03-983 (MR #2, 01,02,2010)	227	615	338	316	124	241	441	105	473	373	192	554	577	512	724
61	E10 00094/03-904 (MR #3)	227	607	338	316	124	241	441	105	473	373	192	554	577	512	748
62	2-003 (JBAIDS)	243	543	362	316	124	241	441	105	473	373	192	554	545	516	652
63	E10 00102/03-912 (MR #11)	243	647	362	316	115	241	441	105	473	373	192	554	545	516	652
64	E10 00108/03-918 (MR #17)	202	591	354	316	124	225	452	105	488	405	208	554	517	512	660
65	2-002 (JBAIDS)	251	591	338	316	124	225	441	105	508	397	200	554	517	512	676
66	FY 07080074	243	591	338	316	124	225	441	105	508	389	200	554	517	508	676
67	FY 07080075	202	615	330	316	124	241	441	105	478	373	200	554	569	516	676
68	FY 07080077	202	615	356	316	124	241	441	105	473	373	200	554	569	516	676
69	FY 07080078	202	615	330	316	124	241	441	105	473	373	192	554	554	512	668
70	GG17 KB 1556-m	305	591	338	316	124	241	441	105	473	381	192	554	554	512	708
71	GG17 KB 1601-m	259	599	330	316	124	225	441	105	508	397	208	554	517	512	708
72	GG17 KB 1733-m	219	599	370	316	124	241	441	105	478	373	200	554	569	512	724
73	GG17 KB 1745-m	219	615	370	316	124	241	441	105	478	373	200	554	569	512	724
74	GG17 KK,sh, 0841-m	259	607	346	316	124	241	441	105	478	373	192	554	585	512	684
75	11E—1804/02-1050/MR	202	623	354	316	124	241	441	105	473	381	200	554	569	512	684
76	FY 07080079	235	559	330	316	124	225	441	105	493	438	192	554	517	512	684
77	GG17 IMB 0018-m	251	591	346	316	124	241	441	105	473	373	208	554	561	512	739

#	შტამის ID	VNTR M1	VNTR M2	VNTR M3	VNTR M7	VNTR M14	VNTR M16	VNTR M20	VNTR M21	VNTR M25	VNTR M27	VNTR M28	VNTR M29	VNTR M30	VNTR M31	VNTR M33
78	GG17 IMB 0030-m	235	607	330	316	124	225	441	105	503	413	192	554	517	512	660
79	GG17 TB-03-m	251	615	330	316	124	225	441	105	508	397	208	554	517	512	668
80	GG17 KS 0206-m	227	575	354	316	124	241	441	105	478	373	208	570	617	512	700
81	GG17 K,G, 1573-m	227	607	338	316	124	241	441	105	478	373	192	554	577	512	716
82	GG17 K,B, 1271-b	227	575	354	316	124	241	441	105	478	405	216	570	617	512	708
83	2-004 (JBAIDS)	227	575	346	316	124	225	650??	105	488	373	192	570	593	512	708
84	2-006 (JBAIDS)	259	591	330	316	124	225	441	105	508	397	208	554	517	512	708
85	2-007 (JBAIDS)	227	575	354	316	124	241	441	105	478	373	208	570	593	508	708
86	GG-17K,K,B,0808-m	227	575	354	316	124	241	441	105	478	373	208	570	617	512	676
Ref 1	<i>B,Ovis</i>	227	559	354	320	124	217	441	98	473	389	200	554	545	496	676
Ref 2	<i>B,Abortus S19</i>	267	559	362	316	115	241	441	105	473	373	184	597	498	508	676

ბრუცელას შტამების M1 ლოკუსში ალელების (VNTR) ზომები მერყეობდა 211-283 (bp) ნუკლეოტიდურ წყვილს შორის, სადაც ერთი ტანდემური განმეორება (TR) 8 (bp) ნუკლეოტიდურ წყვილს შეადგენდა. M1 მარკერის მიხედვით შტამებს შორის რამოდენიმე სხვადასხვა ზომის ალელი გამოიკვეთა, ზოგი შტამის ალელის ზომა დაემთხვა საკონტროლო შტამების ალელის ზომას (*Br.abortus* S19 - 227 bp და *B.ovis* -267 bp).

M2 ლოკუსში ალელების ზომები მერყეობდა 567 - 631(bp) ნუკლეოტიდურ წყვილს შორის, აღნიშნულ მარკერზეც ერთი ტანდემური განმეორება (TR) 8 (bp) ნუკლეოტიდურ წყვილს შეადგენდა და ასევე ზოგიერთი შტამი იმეორებდა საკონტროლო შტამების ალელის ზომას (*Br.abortus* S19 - 599 bp და *B.ovis* -599 bp).

M3 ლოკუსში ალელების ზომები მერყეობდა 330-354 (bp) ნუკლეოტიდურ წყვილს შორის, სადაც ერთი ტანდემური განმეორება (TR) 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 *Br.abortus* S19 საკონტროლო შტამის ალელის ზომა საერთოდ არ დაფიქსირდა ჩვენს მონაცემებში (362 bp).

M7 მარკერზე ყველა შტამმა იდენტური ზომის პროდუქტი აჩვენა 316 (bp) ნუკლეოტიდური წყვილი, აღნიშნულ მარკერზე ქართული შტამები არ აღმოჩნდნენ ვარიანტებები და დაემთხვა *Br.abortus* S19 საკონტროლო შტამის ალელის ზომას (316 bp) აქაც ერთი ტანდემური განმეორება (TR) შედგებოდა 8 (bp) ნუკლეოტიდური თანმიმდევრობისგან.

M14 მარკერზე ყველა შესწავლილმა შტამმა გაიმეორა *Br.ovis* საკონტროლო შტამის ალელის იდენტური ზომა 124 ნუკლეოტიდური წყვილი (bp), სადაც ერთი ტანდემური განმეორება (TR) 8 ნუკლეოტიდური წყვილი იყო, ხოლო *Br.abortus* S19 საკონტროლო შტამის ალელის ზომა არ დაფიქსირდა არცერთ ქართულ შტამში (115 bp).

M16 ლოკუსში ალელების ზომები მერყეობდა 225-241 ნუკლეოტიდურ წყვილს (bp) შორის, სადაც ერთი ტანდემური განმეორება (TR) 8 ნუკლეოტიდურ წყვილს შეადგენდა.

გამოიკვეთა რამოდენიმე ალელი რომელიც არ იმეორებდა რეფერალური შტამების ზომებს (217 bp და 241 bp), ხოლო *Br.ovis* სავაქცინე შტამის ზომა ჩვენს მიერ ჩატარებულ კვლევაში არ დაფიქსირებულა (217 bp).

M20 მარკერის მიხედვით ლოკუსში ალელების ზომები მერყეობდა 441-452 ნუკლეოტიდურ წყვილს (bp) და არ იმეორებდა არცერთი რეფერალური შტამის ზომას (441 bp), ხოლო ერთი ტანდემური განმეორების (TR) ზომა 11 ნუკლეოტიდური წყვილი იყო.

M21 ლოკუსში - ლოკუსში ალელების ზომა 105 ნუკლეოტიდურ წყვილს (bp) შეადგენდა, სადაც ერთი ტანდემური განმეორების (TR) ზომა 5 ნუკლეოტიდური წყვილი იყო, ხოლო *Br.ovis* საკონტროლო შტამის ზომა (98 bp) დაფიქსირდა მხოლოდ ერთ შტამში.

M25 ლოკუსში - VNTR-ის ზომა მერყეობდა 473-508 ნუკლეოტიდურ წყვილს (bp) შორის, სადაც ერთი ტანდემური განმეორების (TR) ზომა 5 ნუკლეოტიდურ წყვილს შეადგენდა.

M25 მარკერის მიხედვით შტამებს შორის რამდენიმე ალელი გამოიკვეთა (473bp, 478 bp, 488 bp, 493 bp 503 bp და 508 bp), ზოგიერთმა შტამმა გაიმეორა საკონტროლო შტამების ზომა (473 bp).

M27 ლოკუსში - VNTR-ის ზომა მერყეობდა 373-438 ნუკლეოტიდურ წყვილს (bp) შორის, სადაც ერთი ტანდემური განმეორების (TR) ზომა 8 ნუკლეოტიდური წყვილი იყო. M27 მარკერის მიხედვითაც შტამებს შორის რამდენიმე სხვადასხვა ზომის ალელი მივიღეთ (373bp ,381 bp,389bp,397bp ,405 bp და 438 bp), რამოდენიმე შტამის ზომადაემთხვა საკონტროლო შტამის ზომას (389 *B. ovis* bp და 200 bp *B. abotrus S19*).

M28 ლოკუსში - VNTR-ის ზომა მერყეობდა 192-216 ნუკლეოტიდურ წყვილს (bp) შორის, სადაც ერთი ტანდემური განმეორების (TR) ზომა 8 ნუკლეოტიდური წყვილი იყო. M28 მარკერის მიხედვითაც შტამებს შორის რამდენიმე სხვადასხვა ზომის ალელი მივიღეთ (184bp,192 bp, 200bp,208 bp და 216 bp), რამოდენიმე შტამის ზომადაემთხვა საკონტროლო შტამის ზომას (184 bp და 200 bp).

M29 ლოკუსში - ლოკუსში ალელების ზომა მეტწილად 554 ნუკლეოტიდურ წყვილს შეადგენდა, სადაც ერთი ტანდემური განმეორების (TR) ზომა 8 ნუკლეოტიდური წყვილი

იყო. აღსანიშნავია რომ მხოლოდ რამოდენიმე შტამის ალელის ზომა იყო 597 და 670 bp. ხოლო საკონტროლო შტამების ზომა (*B.ovis* -554 და *B.abortus* S19 - 597 bp დაფიქსირდა).

M30 ლოკუსში - VNTR-ის ზომა უმეტესად იყო 517 bp, თუმცა გამოიკვეთა 545,554,498 და 577bp, სადაც ერთი ტანდემური განმეორების (TR) ზომა 8 ნუკლეოტიდურ წყვილს შეადგენდა. ზოგიერთმა შტამმა გაიმეორა საკონტროლო შტამების ზომა (*B.ovis* -545 და *B.abortus* S19- 498bp).

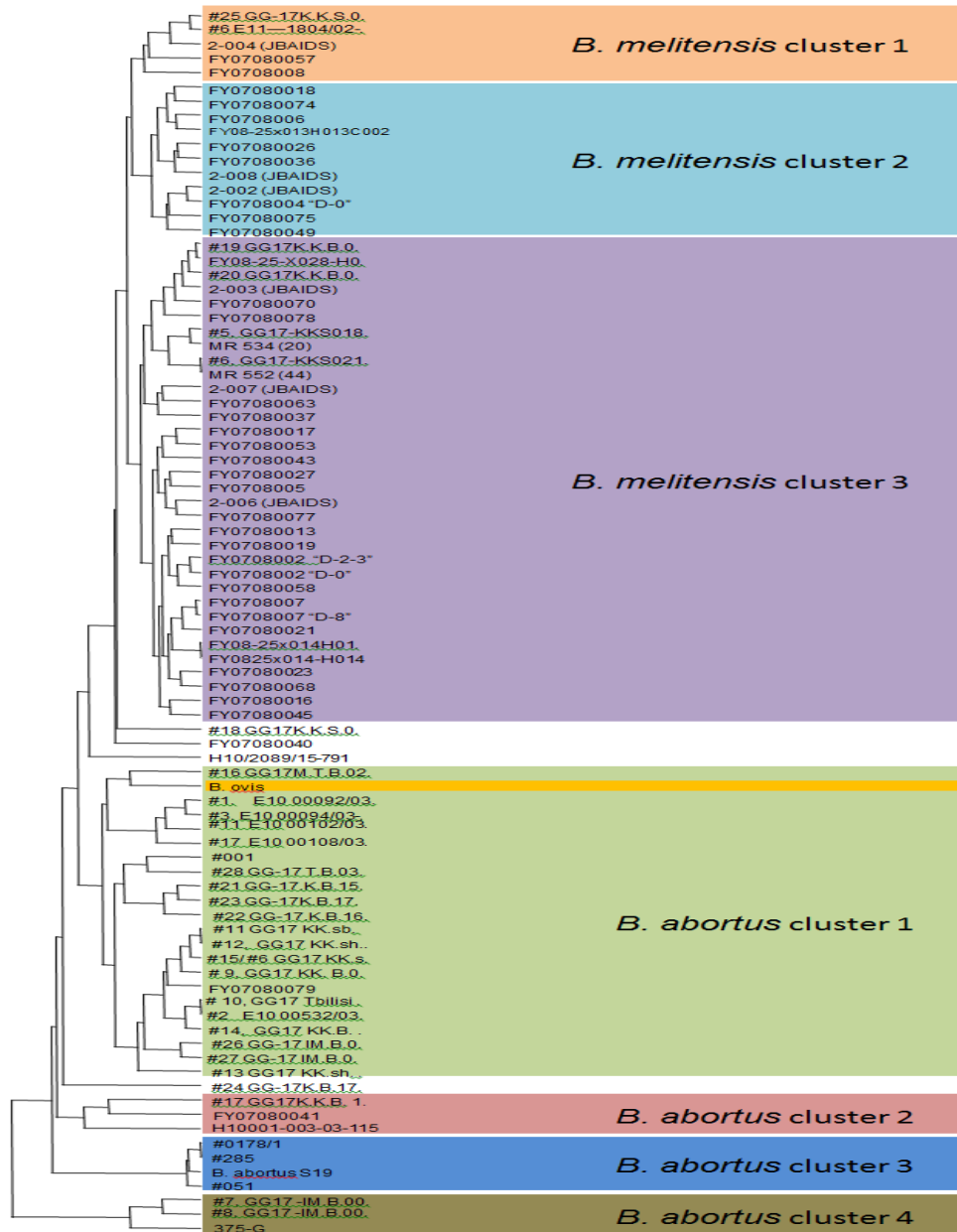
M31 ლოკუსში - VNTR-ის ზომა იყო 508, 512 და 516bp. სადაც ერთი ტანდემური განმეორების (TR) ზომა 4 ნუკლეოტიდურ წყვილს შეადგენდა. საკონტროლო შტამების ზომა იყო *B.ovis* -496 და *B.abortus* S19- 508bp.

M33 ლოკუსში - VNTR-ის ზომა მერყეობდა 660-748 ნუკლეოტიდურ წყვილს (bp) შორის, სადაც ერთი ტანდემური განმეორების (TR) ზომა 8 ნუკლეოტიდური წყვილი იყო. რამოდენიმე შტამის ზომადაემთხვა საკონტროლო შტამის ზომას (676 *B.ovis* bp და 676 bp *B.Abortus* S19)

სხვა მარკერებისგან განსხვავებით უფრო მრავალფეროვანი გენოტიპები მოგვცა M1,M2,M3,M20,M25,M27,M28,M31 და M33 მარკერებმა.

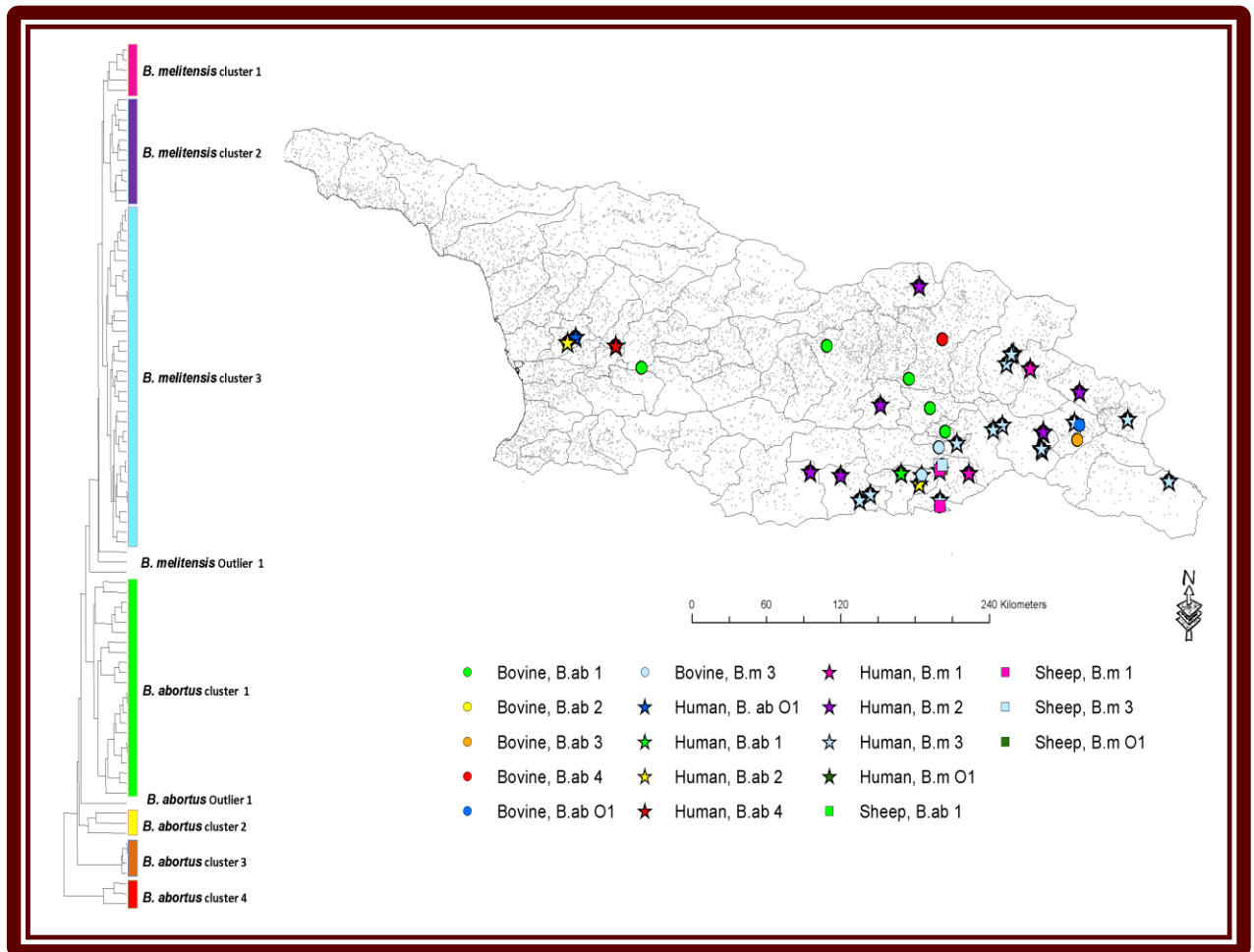
MLVA ტიპირების შედეგებზე დაყრდნობით BioNumerics ვერსია 6.1 (Applied Maths)-ის საშუალებით აიგო ფილოგენეტიკური ხე, რომელმაც გამოავლინა ორი განშტოება *B. abortus*-ის და *B. Melitensis* -ის, ხოლო თითოეული განშტოების შიგნით ოთხი და *B. Melitensis* სამი კლასტერი ასევე გამოიკვეთა ორი განცალკევებული ჯგუფი(სურათი 10).

სურათი 10. ბრუცელას შტამების ფილოგენეტიკური ხე



MLVA15-ის მონაცემებისა და გეოგრაფიული ინფორმაციული სისტემის (GIS) საშუალებით დადგინდა საქართველოში ბრუცელას სხვადასხვა სახეობისა და გენოტიპების გეოგრაფიული გავრცელების რუქა (სურათი # 11).

სურათი # 11. ბრუცელას სხვადასხვა სახეობებისა და გენოტიპების გეოგრაფიული გავრცელება საქართველოში



სურათიდან ნათლად ჩანს საქართველოში მოცირკულირე ბრუცელას შტამების მრავალფეროვნება. *B. melitensis* კლასტერი #3 საქართველოში გეოგრაფიულად ყველაზე ფართოდ არის გავრცელებული, ხოლო იშვიათად გვხვდება *B. melitensis* კლასტერი #1 და *B. abortus* კლასტერი #3.

სურათი #12. *B. melitensis* და *B. abortus* გავრცელება საქართველოში (2009-2015 წლები)



სურათი #13. *B. abortus* გავრცელება საქართველოში (2009-2015 წლები)



სურათი #14. *B. melitensis* გავრცელება საქართველოში (2009-2015 წლები)



სრული გენომის სექვენირება

ჩატარდა ათი ყველაზე გავრცელებული MLVA პროფილის მქონე შტამის (*B. melitensis* – 3 და *B. abortus* - 7) სრული გენომის სექვენირება Roche GS FLX სექვენსის პლატფორმაზე (Roche 454Life Sciences, Branford, CT) სექვენსის შედეგად მიღებული მონაცემების ანალიზი ჩატარდა Roche GS Assembler პროგრამის (Newbler) გამოყენებით.

სექვენირების შედეგად მიღებული მონაცემები აიტვირთა გენომური ბანკის მონაცემთა ბაზაში GenBank BioProject PRJNA338234 და PRJNA339926 ნომრით. (ცხრილი # 21).¹³⁹

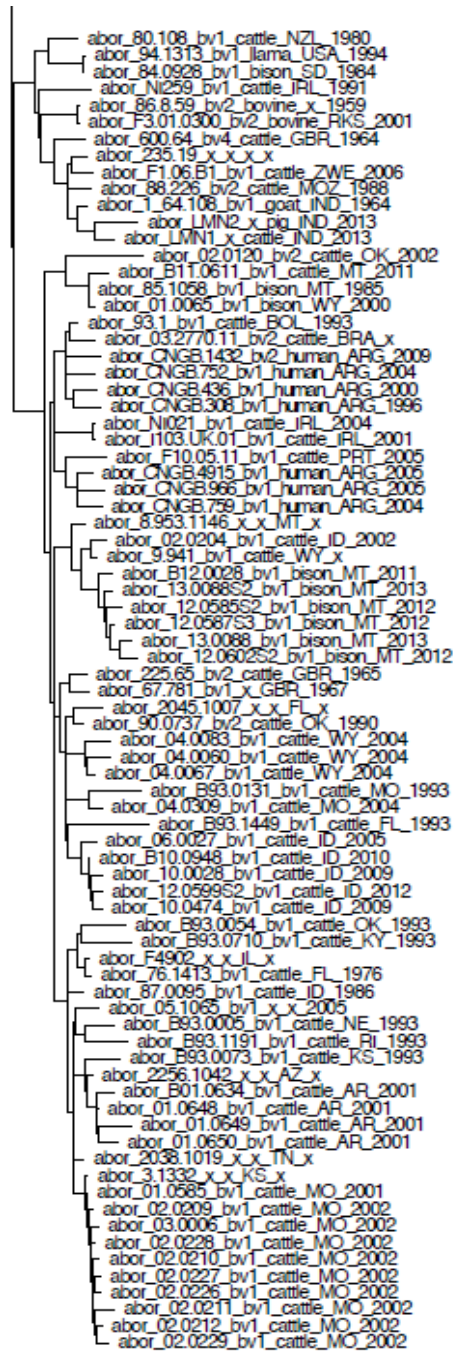
ცხრილი #21. ბრუცელას გენომის ანოტაცია

ნიმუშის ნომერი	შეგროვების თარიღი	ნიმუშის მიღების წყარო	GenBank -ის მიერ მინიჭებული ნომერი	კონტიგების რაოდენობა	გადაფარვის მაჩვენებელი	კონტიგები N50 bp	კოდირებუ ლი ცილების რაოდენობა
Bra-1247/10-Geo	2010	ძროხის სისხლი	MIJH00000000	28	364	364,279	3035
Bra-1549/11-Geo	2011	ძროხის რძე	MIJI00000000	30	268	254,267	3032
Bra-1844/12/12-Geo	2012	ადამიანის სისხლი	MIJJ00000000	26	380	390,977	3032
Bra-1910/13-2013- Geo	2013	ადამიანის სისხლი	MIJK00000000	30	340	364,276	3030
Bra-1238-10-Geo	2010	ცხერის სისხლი	MIJL00000000	29	473	251,385	3039
Bra-1236-10-Geo	2010	ძროხის რძე	MIJM00000000	26	529	364,304	3031
Bra-375-10-Geo	2010	ადამიანის სისხლი	MIJN00000000	30	763	391,124	3038
Brm-1771/12-Geo	2012	ადამიანის სისხლი	MIJO00000000	32	537	222,046	3012
Brm-1252/10-Geo	2010	ძროხის რძე	MIJP00000000	29	544	250,822	3010
Brm-1268/11-Geo	2011	ძროხის რძე	MIJQ00000000	32	699	298,955	3018

სრულ გენომურ სექვენსის შედეგებზე დაყრდნობით აიგო ფილოგენეტიკური ხე, რომელმაც საქართველოში გამოყოფილი ბრუცელას შტამები განათავსა მსოფლიოში გავრცელებული ბრუცელას შტამების ფილოგენეტიკურ ხეზე. საქართველოში გამოყოფილი *B abortus*-ის შტამები ყველაზე ახლოს არიან ცენტრალურ აზიაში გამოყოფილ შტამებთან (სურათი # 15), ხოლო *B melitensis* შტამები ნაკლებად განსხვავდებიან ერთმანეთისგან და უპირატესად მიეკუთვნებიან აღმოსავლეთ ხმელთაშუა ზღვისპირეთის განშტოებას (სურათი # 16).

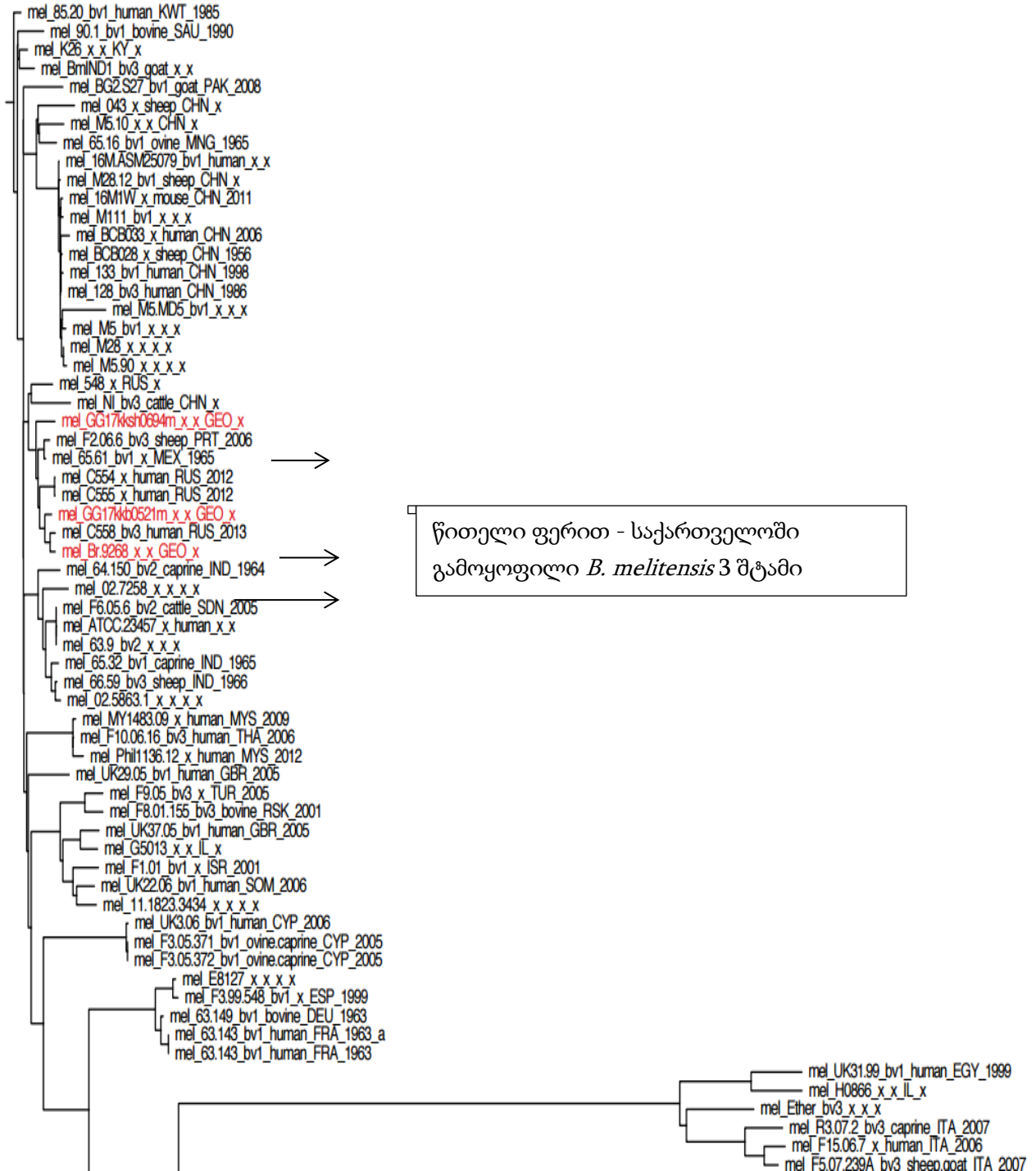
სურათი #15. *B. abortus*-ის შტამების ფილოგენეტიკური ხე

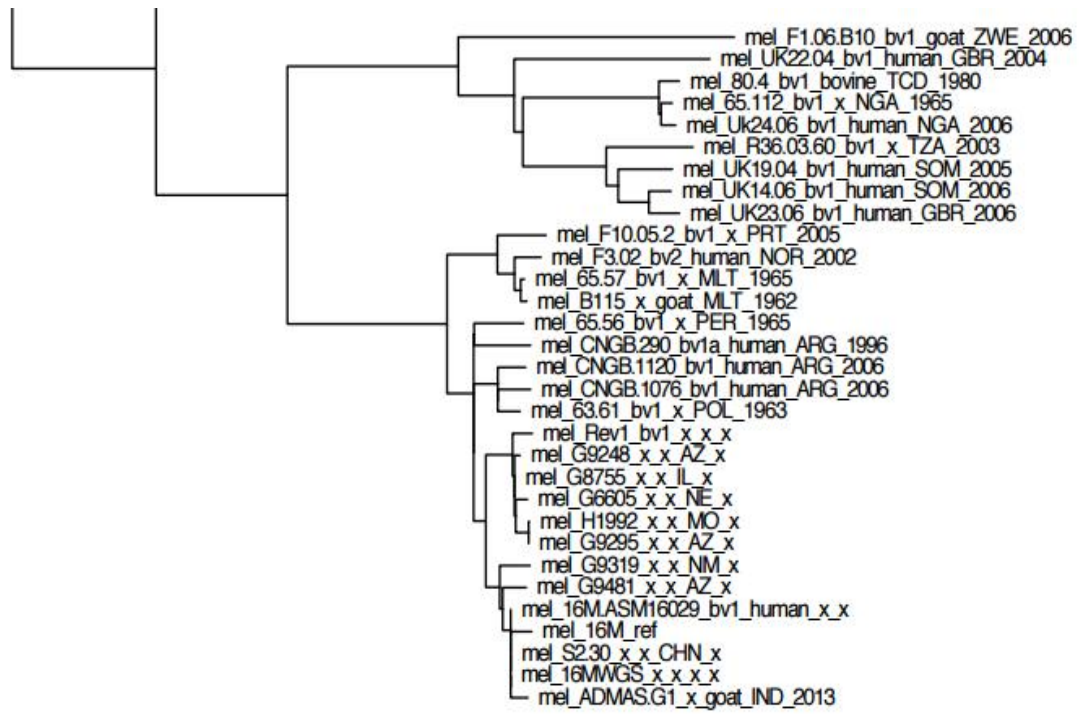




0.02

სურათი # 16. *B. melitensis* შტამების ფილოგენეტიკური ხე





0.03

5. შედეგების განხილვა

უკანასკნელი წლების (2009-2015 წწ) მონაცემებით საქართველოში ბრუცელოზის კლების ტენდენცია არ ფიქსირდება.

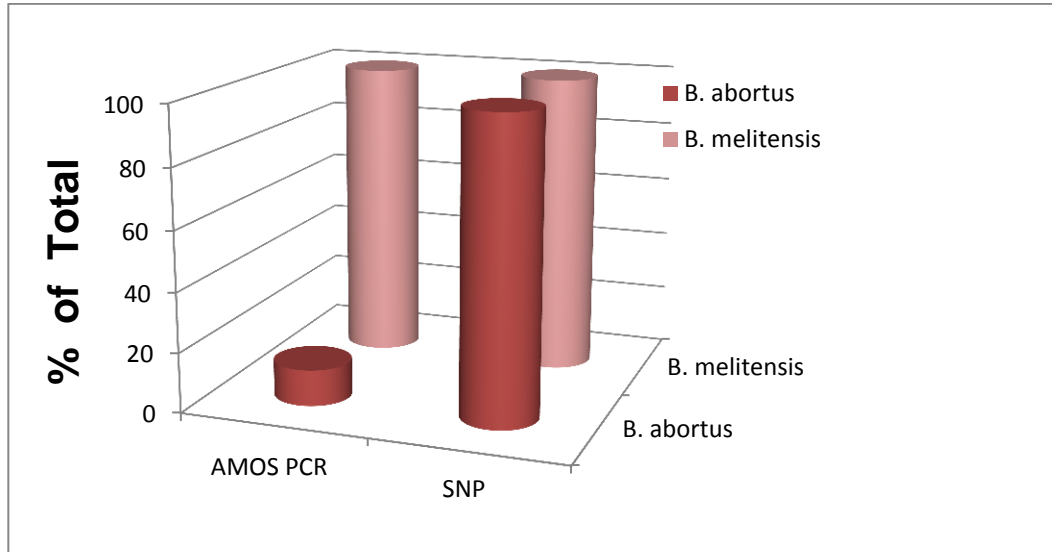
საქართველოში ბრუცელოზის კერები უპირატესად აღმოსავლეთ საქართველოშია გავრცელებული (ძირითადად კახეთში).¹⁴⁰

ბრუცელოზის უპირატესად 30-59 წლის მამაკაცთა შორისაა გავრცელებული. თვალსაჩინოა დაავადების რისკის პროფესიული ხასიათიც.¹³⁷

ზემოთ მოყვანილი მონაცემები ადასტურებს ქვეყნის მოსახლეობის ინფექციურ ავადობაში ბრუცელოზის მნიშვნელოვან ხვედრით წილს და, შესაბამისად, ბრუცელოზის პრობლემის აქტუალობას საქართველოს ჯანმთელობის დაცვის სამსახურისთვის. ცხადია, პრობლემის წარმატებით გადაწყვეტისთვის არსებითი მნიშვნელობა ენიჭება ეპიდემიოლოგიური კვლევის მეთოდური არსენალის გამდიდრებას ბრუცელას გვარის შტამების მოლეკულური ტიპირების მეთოდებით.

AMOS პჯრ-ით და SNP-ით ბრუცელას შტამების სახეობრივმა ტიპირებამ აჩვენა, რომ SNP-ის მეთოდით ტიპირებას არ გააჩნია შეზღუდვები, რადგან აღნიშნული მეთოდით დატიპირდა ბრუცელას ყველა შტამი (86), როცა AMOS პჯრ-ით დატიპირდა მხოლოდ 57 (მ. შ. 53 *B. melitensis* და 4 *B. abortus*) (დიაგრამა #6). AMOS პჯრ-ით დატიპირდა მხოლოდ *B. abortus*-ის I, II და IV ბიოვარები, ხოლო ვერ დატიპირდა III, V და VI ბიოვარები.

დიაგრამა # 6. AMOS პჯრ-ით და SNP-ით ტიპირების შედეგების შედარება



Brucellader პჯრ-ით, SNP ტიპირების მსგავსად დატიპირდა ბრუცელას ყველა შტამი, რაც ადასტურებს აღნიშნული მეთოდის შესაძლებლობას დაატიპიროს როგორც *B. melitensis*, ასევე *B. abortus*-ის ყველა ბიოვარი. AMOS პჯრ-ით, SNP-ით და Brucellader პჯრ-ით ბრუცელას შტამების სახეობრივი დატიპირების შედეგების შედარება მოცემულია ცხრილში #22. ამასთან, აღსანიშნავია, რომ Brucellader პჯრ-ი, SNP-თან შედარებით ბევრად ნაკლებ დროსა და ხარჯს მოითხოვს.

ცხრილი #22. სხვადასხვა მოლეკულური მეთოდით ბრუცელას შტამების სახეობრივი ტიპირება

N	ბრუცელას შტამის საიდენტიფიკაციო ნომერი	AMOS PCR	SNP	Brucellader PCR
1	FY 07-08 0002 D “0”.	<i>B. melitensis</i>	<i>B. melitensis</i>	<i>B. melitensis</i>
2	FY 07-08 0002 D “2-3”	<i>B. melitensis</i>	<i>B. melitensis</i>	<i>B. melitensis</i>
3	FY 07-08 0004D “0”	<i>B. melitensis</i>	<i>B. melitensis</i>	<i>B. melitensis</i>

N	ბრუცელას შტამის საიდენტიფიკაციო ნომერი	AMOS PCR	SNP	Brucellader PCR
4	FY 07-08 0005 D "0"	<i>B. melitensis</i>	<i>B. melitensis</i>	<i>B. melitensis</i>
5	FY 07-08 0006 D "0"	<i>B. melitensis</i>	<i>B. melitensis</i>	<i>B. melitensis</i>
6	FY 07-08 0007 D "0"	<i>B. melitensis</i>	<i>B. melitensis</i>	<i>B. melitensis</i>
7	FY 07-08 0007 D "8-10"	<i>B. melitensis</i>	<i>B. melitensis</i>	<i>B. melitensis</i>
8	FY 07-08 0008 D "0"	<i>B. melitensis</i>	<i>B. melitensis</i>	<i>B. melitensis</i>
9	FY 07-08 0013 D "0"	<i>B. melitensis</i>	<i>B. melitensis</i>	<i>B. melitensis</i>
10	FY 07-08 0016 D "0"	<i>B. melitensis</i>	<i>B. melitensis</i>	<i>B. melitensis</i>
11	FY 07-08 0017 D "0"	<i>B. melitensis</i>	<i>B. melitensis</i>	<i>B. melitensis</i>
12	FY 07-08 0018 D "0"	<i>B. melitensis</i>	<i>B. melitensis</i>	<i>B. melitensis</i>
13	FY 07-08 0019 D "0"	<i>B. melitensis</i>	<i>B. melitensis</i>	<i>B. melitensis</i>
14	#051	<i>B. abortus</i>	<i>B. abortus</i>	<i>B. abortus</i>
15	#285	<i>B. abortus</i>	<i>B. abortus</i>	<i>B. abortus</i>
16	FY 07-08 0021 D "0"	<i>B. melitensis</i>	<i>B. melitensis</i>	<i>B. melitensis</i>
17	FY 07-08 0023 D "0"	<i>B. melitensis</i>	<i>B. melitensis</i>	<i>B. melitensis</i>
18	FY07-08 0026 D"0"	<i>B. melitensis</i>	<i>B. melitensis</i>	<i>B. melitensis</i>
19	FY07-08 0027 D"0"	<i>B. melitensis</i>	<i>B. melitensis</i>	<i>B. melitensis</i>
20	375G	უარყოფითი	<i>B. abortus</i>	<i>B. abortus</i>
21	FY07-08 0030 D"0"	<i>B. melitensis</i>	<i>B. melitensis</i>	<i>B. melitensis</i>
22	FY00-08 0036	<i>B. melitensis</i>	<i>B. melitensis</i>	<i>B. melitensis</i>
23	FY08-25-X014-H014	<i>B. melitensis</i>	<i>B. melitensis</i>	<i>B. melitensis</i>
24	FY 07-08-0037 D "0"	<i>B. melitensis</i>	<i>B. melitensis</i>	<i>B. melitensis</i>
25	FY 07-08-0040 D "0"	<i>B. melitensis</i>	<i>B. melitensis</i>	<i>B. melitensis</i>
26	FY 07-08-0041 D "0"	<i>B. melitensis</i>	<i>B. melitensis</i>	<i>B. melitensis</i>
27	FY 07-08-0043 D "0"	<i>B. melitensis</i>	<i>B. melitensis</i>	<i>B. melitensis</i>
28	FY 07-08-0045 D "0"	<i>B. melitensis</i>	<i>B. melitensis</i>	<i>B. melitensis</i>
29	FY 07-08-0049 D "0"	<i>B. melitensis</i>	<i>B. melitensis</i>	<i>B. melitensis</i>
30	FY 07-08-0053 D "0"	<i>B. melitensis</i>	<i>B. melitensis</i>	<i>B. melitensis</i>
31	FY 07-08-0057 D "0"	<i>B. melitensis</i>	<i>B. melitensis</i>	<i>B. melitensis</i>
32	FY 07-08-0058 D "0"	<i>B. melitensis</i>	<i>B. melitensis</i>	<i>B. melitensis</i>

N	ბრუცელას შტამის საიდენტიფიკაციო ნომერი	AMOS PCR	SNP	Brucellader PCR
33	FY 08-25x013H013C002	<i>B. melitensis</i>	<i>B. melitensis</i>	<i>B. melitensis</i>
34	FY 08-25x014-H014 C009	<i>B. melitensis</i>	<i>B. melitensis</i>	<i>B. melitensis</i>
35	GG17-KKS 0187	<i>B. melitensis</i>	<i>B. melitensis</i>	<i>B. melitensis</i>
36	GG17-KKS 0211	<i>B. melitensis</i>	<i>B. melitensis</i>	<i>B. melitensis</i>
37	GG17 IM.B.0014	უარყოფითი	<i>B. abortus</i>	<i>B. abortus</i>
38	GG17 IM.B.0018	უარყოფითი	<i>B. abortus</i>	<i>B. abortus</i>
39	H10/2089/15-791	უარყოფითი	<i>B. abortus</i>	<i>B. abortus</i>
40	FY 07-08-0063 D "0"	<i>B. melitensis</i>	<i>B. melitensis</i>	<i>B. melitensis</i>
41	FY 07-08-0068 D "0"	<i>B. melitensis</i>	<i>B. melitensis</i>	<i>B. melitensis</i>
42	GG17Tb #1	უარყოფითი	<i>B. abortus</i>	<i>B. abortus</i>
43	GG17KKbm-0519	უარყოფითი	<i>B. abortus</i>	<i>B. abortus</i>
44	GG17KKsb0204m	უარყოფითი	<i>B. abortus</i>	<i>B. abortus</i>
45	GG17KKsb1109m	უარყოფითი	<i>B. abortus</i>	<i>B. abortus</i>
46	GG17KKsb0211m	<i>B. melitensis</i>	<i>B. melitensis</i>	<i>B. melitensis</i>
47	GG17KKsb0211b	უარყოფითი	<i>B. abortus</i>	<i>B. abortus</i>
48	GG17KKsb0185m	უარყოფითი	<i>B. abortus</i>	<i>B. abortus</i>
49	GG17KKsb0199b	უარყოფითი	<i>B. abortus</i>	<i>B. abortus</i>
50	GG17 M.T.B. 02m	უარყოფითი	<i>B. abortus</i>	<i>B. abortus</i>
51	LMA #17.GG17KKB-1102b	უარყოფითი	<i>B. abortus</i>	<i>B. abortus</i>
52	FY-07080070	<i>B.melitensis</i>	<i>B.melitensis</i>	<i>B.melitensis</i>
53	H10C-001003/03-115	უარყოფითი	<i>B. abortus</i>	<i>B. abortus</i>
54	FY-08-25x028H028	<i>B.melitensis</i>	<i>B.melitensis</i>	<i>B.melitensis</i>
55	GG17KKB0790-m	<i>B.melitensis</i>	<i>B.melitensis</i>	<i>B.melitensis</i>
56	GG17KKsh0694-m	<i>B.melitensis</i>	<i>B.melitensis</i>	<i>B.melitensis</i>
57	GG17KKB0521-m	<i>B.melitensis</i>	<i>B.melitensis</i>	<i>B.melitensis</i>
58	R. GG17KKsh0211-b	<i>B.melitensis</i>	<i>B.melitensis</i>	<i>B.melitensis</i>
59	E10 00092/03-902 (MR #1)	უარყოფითი	<i>B. abortus</i>	<i>B. abortus</i>

N	ბრუცელას შტამის საიდენტიფიკაციო ნომერი	AMOS PCR	SNP	Brucellader PCR
60	E10 00532/03-983 (MR #2. 01.02.2010)	უარყოფითი	<i>B. abortus</i>	<i>B. abortus</i>
61	E10 00094/03-904 (MR #3)	უარყოფითი	<i>B. abortus</i>	<i>B. abortus</i>
62	2-003 (JBAIDS)	<i>B. melitensis</i>	<i>B. melitensis</i>	<i>B. melitensis</i>
63	E10 00102/03-912 (MR #11)	უარყოფითი	<i>Babortus</i>	<i>Babortus</i>
64	E10 00108/03-918 (MR #17)	უარყოფითი	<i>Babortus</i>	<i>Babortus</i>
65	2-002 (JBAIDS)	<i>B. melitensis</i>	<i>B. melitensis</i>	<i>B. melitensis</i>
66	FY 07080074	<i>B. melitensis</i>	<i>B. melitensis</i>	<i>B. melitensis</i>
67	FY 07080075	<i>B. melitensis</i>	<i>B. melitensis</i>	<i>B. melitensis</i>
68	FY 07080077	<i>B. melitensis</i>	<i>B. melitensis</i>	<i>B. melitensis</i>
69	FY 07080078	<i>B. melitensis</i>	<i>B. melitensis</i>	<i>B. melitensis</i>
70	GG17 KB 1556-m	უარყოფითი	<i>B. abortus</i>	<i>B. abortus</i>
71	GG17 KB 1601-m	უარყოფითი	<i>B. abortus</i>	<i>B. abortus</i>
72	GG17 KB 1733-m	უარყოფითი	<i>B. abortus</i>	<i>B. abortus</i>
73	GG17 KB 1745-m	უარყოფითი	<i>B. abortus</i>	<i>B. abortus</i>
74	GG17 KK.sh. 0841-m	<i>B. melitensis</i>	<i>B. melitensis</i>	<i>B. melitensis</i>
75	11E—1804/02-1050/MR	<i>B. melitensis</i>	<i>B. melitensis</i>	<i>B. melitensis</i>
76	FY 07080079	უარყოფითი	<i>B. abortus</i>	<i>B. abortus</i>
77	GG17 IMB 0018-m	უარყოფითი	<i>B. abortus</i>	<i>B. abortus</i>
78	GG17 IMB 0030-m	უარყოფითი	<i>B. abortus</i>	<i>B. abortus</i>
79	GG17 TB-03-m	უარყოფითი	<i>B. abortus</i>	<i>B. abortus</i>
80	GG17 KS 0206-m	უარყოფითი	<i>B. abortus</i>	<i>B. abortus</i>
81	GG17 K.G. 1573-m	უარყოფითი	<i>B. abortus</i>	<i>B. abortus</i>
82	LMA #31. GG17 K.B. 1271-b	<i>B. melitensis</i>	<i>B. melitensis</i>	<i>B. melitensis</i>
83	2-004 (JBAIDS)	<i>B. melitensis</i>	<i>B. melitensis</i>	<i>B. melitensis</i>
84	2-006 (JBAIDS)	<i>B. melitensis</i>	<i>B. melitensis</i>	<i>B. melitensis</i>
85	2-007 (JBAIDS)	<i>B. melitensis</i>	<i>B. melitensis</i>	<i>B. melitensis</i>
86	GG-17K.K.B.0808-m	უარყოფითი	<i>B. abortus</i>	<i>B. abortus</i>

საქართველოში გამოყოფილი ბრუცელას შტამების MLVA ტიპირების შედეგად მიღებულ იქნა *B. abortus*-ის ოთხი და *B. melitensis*-ის სამი კლასტერი. აგრეთვე *B. abortus*-ის ერთი და *B. melitensis* ერთი განცალკევებული ჯგუფი. რაც საშუალებას გვაძლევს დავასკვნათ. რომ საქართველოში მოცირკულირე ბრუცელას შტამები მრავალფეროვნებით გამოირჩევიან. აღნიშნულმა კვლევამ აჩვენა. რომ MLVA არის გენეტიკური ქვეტიპირების მაღალი რეზოლუციის (გარჩევადობის) მეთოდი, რომელსაც შეუძლია მოგვაწოდოს ეპიდემიოლოგიური კვლევებისათვის მნიშვნელოვანი ინფორმაცია. ამასთან. MLVA არ საჭიროებს მთლიანი გენომის სეკვენირების ხანგრძლივ და ძვირადღირებულ პროცესს. ნაკლებ შრომატევადია და მოკლე დროში შეუძლია გენეტიკური ჯგუფების გამოვლენა.

საქართველოსა და თურქეთში გამოყოფილი ბრუცელას შტამების MLVA ტიპირებამ აჩვენა. რომ ორივე ქვეყანაში გამოყოფილი *B. abortus*-ის და *B. melitensis*-ის შტამების უმრავლესობა ორიგინალურია თითოეული ქვეყნისთვის. ამასთან. საინტერესოა აღინიშნოს, რომ თურქეთში გამოყოფილი *B. melitensis* ორი შტამი. რომლებიც გენეტიკური პროფილით განსხვავდებიან თურქული შტამებისაგან და ახლოს არიან ქართულ შტამებთან. რაც გვაძლევს საშუალებას ვივარაუდოთ, რომ საქართველოსა და თურქეთს შორის შესაძლებელია ბრუცელას შტამების მიგრაცია.¹³⁸

საქართველოში გამოყოფილი ბრუცელას შტამების სეკვენირებამ და ფილოგენეტიკურმა ანალიზმა აჩვენა, რომ *B. abortus*-ის შტამები ხასითდებიან გენეტიკური მრავალფეროვნებით და გენეტიკურად ყველაზე ახლოს არიან ცენტრალურ აზიაში გამოყოფილ ბრუცელას შტამებთან. *B. melitensis* შტამები, *B. abortus*-ის შტამებისაგან განსხვავებით ნაკლები მრავალფეროვნებით ხასიათდებიან და უპირატესად მიეკუთვნებიან აღმოსავლეთ ხმელთაშუა ზღვისპირეთის განშტოებას.

6. დასკვნები

1. AMOS, Brucellader პჯრ-ით და SNP-ით ბრუცელას შტამების სახეობრივმა ტიპირებამ დაადასტურა, რომ საქართველოში ცირკულირებს *Brucella*-ს ორი სახეობა: *B. melitensis* და *B. abortus*. MLVA ტიპირებამ გამოავლინა საქართველოში მოცირკულირე *B. abortus*-ის და *B. melitensis*-ის შტამების გენეტიკური მრავალფეროვნება;
2. AMOS-ისაგან განსხვავებით, Brucellader პჯრ-ს და SNP-ს შეუძლიათ დაატიპირონ *B. abortus*-ის ყველა ბიოვარი;
3. ბრუცელას შტამების სრული გენომის სექვენირებამ და მათმა ფილოგენეტიკურმა ანალიზმა აჩვენა, რომ *B. abortus*-ის შტამები ყველაზე ახლოს არიან ცენტრალურ აზიაში გამოყოფილ შტამებთან, ხოლო *B. melitensis* შტამები კი უპირატესად მიეკუთვნებიან აღმოსავლეთ ხმელაშუ ზღვისპირეთს განშტობას;
4. საქართველოსა და თურქეთში გამოყოფილი ბრუცელას შტამების MLVA ტიპირებამ აჩვენა, რომ შესაძლებელია ქვეყნებს შორის ბრუცელას შტამების მიგრაცია;
5. ბრუცელას 10 შტამის სრული გენომური სექვენირება და მიღებული მონაცემების ატიპირთვა გენომური ბანკის მონაცემთა ბაზაში აფართოებს აღნიშნული პათოგენის გაღრმავებული შესწავლის შესაძლებლობებს.

7. პრაქტიკული რეკომენდაციები

- რეკომენდებულია ბრუცელოზის ეპიდემიოლოგიური კვლევებისას თანამედროვე მოლეკულური მეთოდების გამოყენება;
- ბრუცელას შტამების სახეობრივი ტიპირებისათვის რეკომენდებულია Brucellader პჯრ-ის გამოყენება, რადგან სხვა მოლეკულური ტიპირების მეთოდებთან შედარებით უფრო სწრაფი და ხარჯთეფექტურია;

- ბრუცელას გენეტიკური ჯგუფებისა და შტამებს შორის განსხვავებების გამოსავლენად რეკომენდებულია MLVA-ს გამოყენება, რადგან არ საჭიროებს მთლიანი გენომის სეკვენირების ხანგრძლივ და ძვირადღირებულ პროცესს;
- სრული გენომური სეკვენირება რეკომენდებულია ბრუცელოზის ადგილობრივი ეპიდემიოლოგიის ბიოტერორისტული აქტებისაგან დიფერენცირებისათვის, ბრუცელას შტამების გენეტიკური დახასიათებისა და კლონალური კავშირების დასადგენად.

8. ლიტერატურა

1. Basset-Smith E. "Mittelmeer oder Maltafieber" Hdb. D. Tropenhyg. Krank. Von Carl Mense. 1914; B; 3; S 384.
2. Maruashvili M. Brucellosis (in Georgian) 1983.
3. Bruce D. Note on the discovery of a microorganism in Malta fever. Practitioner 1887; 39: 161-70.
4. Tulloch W.J. Sir David Bruce; An appreciation; J. Roy; Army med. Corps. 1955; 101. 81-90.
5. Traum J. Report of the Chief of the Bureau of Animal Industry. U.S. Department of Agriculture. U.S. Department of agriculture. Washington DC. 1920; 30.
6. Meyer KF. Shaw EB. A comparison of the morphologic. cultural. and biochemical characteristics of *B. abortus* and *B. melitensis*. J. Infect Dis 1920; 27: 173-84
7. Hughes K. L, Claxton P.D. Brucella ovis infection. Australian Veterinary Journal. 1968; Vol; 44; 2: pp.41-44.
8. Stoenner HG, Lackman DB, Bell EJ. A new species of Brucella isolated from the desert wood rat. Neotoma lepida Thomas. Am J Vet Res 1957; 18(69): 942-51.
9. Carmichael LE, Bruner DW. Characteristics of a newly recognized species of Brucella responsible for infectious canine abortions. Cornell Vet 1968; 58: 579-92.

10. Wright A.E, Smith F. On the application of the serum test to the differential diagnosis of typhoid and Malta fever. 1897; Lancet; 1: 656–9.
11. Banai M, Corbel M. Taxonomy of *Brucella*. The Open Veterinary Science Journal. 2010. 4. 85-101.
12. Whatmore AM, Dawson C, Muchowski J, et al. Characterisation of North American *Brucella* isolates from marine mammals. PLoS One. 2017; 12(9).
13. Brucellosis; CBRNE. Medicine Journal. October 15. 2001. 2. 10.
14. Baramidze I. Cellular bases of interaction of micro-macroorganisms in experimental Brucellosis (In Russian) Ph.D, Tbilisi. 1988.
15. Kislenska V, Kolichev N, Gosmanov R. Veterinary microbiology and immunology. 2012.
16. Corbel M. J. Brucellosis: an overview. 1st International Conference on Emerging Zoonoses: Emerging Infectious Diseases. April-June 1997. Jerusalem. Israel. 1997; 3:2: 213-221.
17. Pokrovski VI. et al. Brucellosis. Infection diseases and epidemiology. 2012.
18. Young E, Corbel M. Brucellosis: Clinical and Laboratory Aspects. 1989. Science; 192.
19. Corbel M. J. World Health Organization; 2006; 89.
20. Cook DR, Noble JW. Isolation of *Brucella suis* from cattle. Aus Vet J. 1984; 61(8): 263–264.
21. Ewalt DR, Payeur JP, Rhyhan JC, Geer PL. *Brucella suis* biovar 1 in naturally infected cattle: a bacteriological, serological and histological study. J Vet Diagn Invest. 1997; 9(4): 417–420.
22. Luna-Martinez JE, Mejia-Teran C. Brucellosis in Mexico: current status and trends. Vet Microbiol. 2002; 90(1–4): 19–30.
23. Garcia Carillo C. Animal and human brucellosis in the Americas. OIE. Paris. 1990.
24. Samartino LE. Brucellosis in Argentina. Vet Microbiol. 2002; 90(1–4):71–80.
25. Lucero NE, Ayala SM, Escobar GI, Jacob NR. *Brucella* isolated in humans and animals in Latin America from 1968 to 2006. Epidemiol Infect. 2008; 136(4): 496–503.
26. Szulowski K, Iwaniak W, Weiner M, Złotnicka J. *Brucella suis* biovar 2 isolations from cattle in Poland. Annals of Agricultural and Environmental Medicine 2013. Vol 20. No 4; 672–675

27. Andersen FM, Pedersen KB. Brucellosis: a case of natural infection of a cow with *Brucella suis* biotype 2. Dan Vet. 1995; 78(8): 408.
28. Council Directive 64/432/EEC of 26 June 1964 on animal health problems affecting intra Community trade in bovine animals and swine. 1964.
29. Foster G, Jahans K. L, Reid R. J, Isolation of *Brucella* species from cetacean's seals and an otter. Vet Rec 1996; 138: 583-586.
30. Spickler AR, Roth JA. Emerging and Exotic Diseases of Animals; 2010; 111.
31. Brew SD, Perrett LL, Stack JA, MacMillan A. P; Staunton N. J. Human exposure to Brucella recovered from a sea mammal. Vet. Rec. 1999 Apr 24; 144(17): 483
32. Kassal B. «Brucellosis of farm animals». (In Russian) 1989; 88-98.
33. Kosilov IA. Brucellosis of farm animals. Novosibirsk. (In Russian) 1992; 59.
34. Young EJ, Tarry A, Genta RM, Ayden N, Gotuzzo E. Thrombocytopenic purpura associated with brucellosis: report of 2 cases and literature review. Clin Infect Dis 2000; 31:904-909.
35. Tessaro SV, Forbes LB. *Brucella suis* biotype 4; a case of granulomatous nephritis in a barren ground caribou (*Rangifer tarandus groenlandicus* L) with a review of the distribution of rangiferine brucellosis in Canada. J Wildlife Dis 1986; 22:479-88.
36. Montes J, Rodriguez MA, Martin T, Martin F. Laboratory-acquired meningitis caused by *Brucella abortus* strain 19. J Infect Dis. 1986; 154:915-6.
37. Karaköse A, Yuksel MB, Aydoğdu O, Hamidi AA. Epididymoorchitis as the first finding in patients with brucellosis. Adv Urol. 2013;765023.
38. Colmenero JD, Reguera JM, Martos F. et al. Complications associated with *Brucella melitensis* infection: a study of 530 cases. Medicine; 1996; 75(4):195-211
39. Afsar H, Baydar I, Sirmatel F. Epididymoorchitis due to brucellosis. British Journal of Urology; 1993; 72(1):104-105.
40. Herrick JA, Lederman RJ, Sullivan B, Powers J.H, Palmore T.N. *Brucella* arteritis: clinical manifestations. Treatment and prognosis. Lancet Infect Dis. 2014; S1473-3099(13)70270-6.

41. Almuneef MA, Memish ZA, Balkhy HH, Alotaibi B, Algoda S, Abbas M, et al. Importance of screening household members of acute brucellosis cases in endemic areas. *Epidemiol Infect.* 2004; 132; 533–540.
42. Alsubaie S, Almuneef M, Alshaalan M, Balkhy H, Albanyan E, Alola S, et al. Acute brucellosis in Saudi families: relationship between brucella serology and clinical symptoms. *Int J Infect Dis.* 2005; 9(4):218–24.
43. Tabak F, Hakko E, Mete B, Ozaras R, Mert A, Ozturk R. Is family screening necessary in brucellosis? *Infection*; 2008 Dec; 36(6):575-7.
44. Sofian M, Safaeipour L, Aghakhani A, Sharif MR, Banifazl M. Screening of family members of patients with acute brucellosis in an endemic area of Iran. *Iran J Microbiol.* 2013 Sep; 5(3):215-9.
45. Sharifi-Mood B, Metanat M, Alavi-Naini R. Screening of the family members of patients with acute brucellosis in Southeast Iran. *Indian J Med Microbiol.* 2007; 25(2):176–7.
46. Ruben B, Band JD, Wong P, Colville J. Person-to-person transmission of *Brucella melitensis*. *Lancet* 1991; 337:14-15
47. Al-Kharfy TM. Neonatal brucellosis and blood transfusion: case report and review of the literature. *Ann Trop Paediatr* 2001; 21: 349-352.
48. Yousif B, Nelson J. Neurobrucellosis--a rare complication of renal transplantation. *Am J Nephrol* 2001; 21: 66-68.
49. Ceylan A, Köstü M, Tuncer O, Peker E, Kırımı E. Neonatal brucellosis and breast milk. *Indian J Pediatr* 2012; 79: 389-391.
50. Aydın B, Beken S, Akansel R, Dilli D, Okumuş N. Prematurity due to maternal brucella infection and review of the literature. *The Turkish Journal of Pediatrics* 2013; 55: 433-437.
51. Pavan ME, Nicola A, Grimoldi F, Cairó F. Molecular characterization of *Brucella abortus* strain 19 and its application for controlling biologics. *Rev Argent Microbiol* 2005; 37: 122-125.
52. Hackmon R, Bar-David J, Bashiri A, Mazor M. Brucellosis in pregnancy. *Harefuah* 1998; 135: 3-7.

53. Gulsun S, Aslan S, Satici O, Gul T. Brucellosis in pregnancy. *Trop Doct* 2011; 41: 82-84.
54. CDC. 2008. Laboratory-acquired brucellosis--Indiana and Minnesota. 2006. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 57:39-42.
55. Harding AL, Byers KB. 2006. Laboratory-associated infections: summary and analysis of 3921 cases. p. 53-77. In D. O. Fleming and D. L. Hunt (ed.). *Biological Safety: Principles and Practices*. 4th ed. ASM Press. Washington DC.
56. Baron EJ, Miller JM. Bacterial and fungal infections among diagnostic laboratory workers: evaluating the risks. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2008. 60: 241-246.
57. Pike RM. Laboratory-associated infections: incidence. fatalities. causes. and prevention. *Annu. Rev. Microbiol.* 1979. 33:41-66.
58. Singh K. Laboratory-acquired infections. *Clin. Infect. Dis.* 2009;49: 142-147.
59. Pappas G, Panagopoulou P, Christou L, Akritidis N. *Brucella* as a biological weapon. *Cell. Mol. Life Sci.* 2006. 63:2229-2236.
60. Batchelor BI, Brindle RJ, Gilks GF, Selkon JB. Biochemical mis-identification of *Brucella melitensis* and subsequent laboratory-acquired infections. *J. Hosp. Infect.* 1992. 22:159-162.
61. Grammont-Cupillard M, Berthet-Badetti L, Dellamonica P. Brucellosis from sniffing bacteriological cultures. *Lancet* 1996. 348:1733-1734.
62. Maley MW, Kociuba K, Chan RC. Prevention of laboratory-acquired brucellosis: significant side effects of prophylaxis. *Clin. Infect. Dis.* 2006. 42: 433-434.
63. Awad R. Human brucellosis in the Gaza Strip. Palestine. *East Mediterr Health J* 1998; 4: 225-233.
64. Gargouri N, Walke H, Belbeisi A, Hadadin A, Salah S. et al. Estimated burden of human *Salmonella*, *Shigella*, and *Brucella* infections in Jordan. 2003-2004. *Foodborne Pathog Dis* 2009; 6: 481-486.
65. Al Tawfiq JA, AbuKhamis A. A 24-year study of the epidemiology of human brucellosis in a health-care system in Eastern Saudi Arabia. *J Infect Public Health* 2009; 2: 81-85.

66. Elbeltagy KE. An epidemiological profile of brucellosis in Tabuk Province. Saudi Arabia. *East Mediterr Health J* 2001; 7: 791–798.
67. Abu Shaqra QM. Epidemiological aspects of brucellosis in Jordan. *Eur J Epidemiol* 2000; 16: 581–584.
68. Al Sekait MA. Seroepidemiology survey of brucellosis antibodies in Saudi Arabia. *Ann Saudi Med* 1999; 19: 219–222.
69. Alballa SR. Epidemiology of human brucellosis in southern Saudi Arabia. *J Trop Med Hyg* 1995; 98: 185–189.
70. Bonfoh B, Kasymbekov J. et al. Representative Seroprevalences of Brucellosis in Humans and Livestock in Kyrgyzstan; *EcoHealth* 2012; 9; 132–138
71. Haghdoost AA, Kawaguchi L, Mirzazadeh A, Rashidi H, Sarafinejad A. et al. Using GIS in explaining spatial distribution of brucellosis in an endemic district in Iran. *Iran J Public Health* 2007; 36: 27–34.
72. Karabay O, Serin E, Tamer A, Gokdogan F, Alpteker H. et al. Hepatitis B carriage and Brucella seroprevalence in urban and rural areas of Bolu province of Turkey: a prospective epidemiologic study. *Turk J Gastroenterol* 2004; 15: 11–13.
73. Cetinkaya Z, Aktepe OC, Ciftci IH, Demirel R. Seroprevalence of human brucellosis in a rural area of Western Anatolia. Turkey. *J Health Popul Nutr* 2005; 23: 137–141.
74. Yacoub A, Bakr S, Hameed AM, Al Thamery AA, Fartoci MJ. Seroepidemiology of selected zoonotic infections in Basra region of Iraq. *East Mediterr Health* 2006; 12: 112–118.
75. Vancelik S, Guraksin A, Ayyildiz A. Seroprevalence of human brucellosis in rural endemic areas in eastern Turkey. *Trop Doct* 2008; 38: 42–43.
76. Khorasgani MR, Esmaeili H., Pourkarim MR, Mankhian AR, Salehi TZ. Anti-brucella antibodies in blood donors in Boushehr. Iran. *Comparative Clinical Pathology* 2008; 17: 267–269.
77. Jennings GJ, Hajjeh RA, Girgis FY, Fadeel MA, Maksoud MA., et al. Brucellosis as a cause of acute febrile illness in Egypt. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2007; 101: 707–713.

78. El Sherbini A, Kabbash I, Schelling E, Shennawy S, Shalapy N, et al. Seroprevalences and local variation of human and livestock brucellosis in two villages in Gharbia Governorate. Egypt. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2007; 101: 923–928.
79. Boukary A, Saegerman C, Abatih E, Fretin D. Seroprevalence and Potential Risk Factors for *Brucella* Spp. Infection in Traditional Cattle. Sheep and Goats Reared in Urban. Periurban and Rural Areas of Niger. *PLOS ONE*; December 2013; Volume 8; Issue 12; 1-12.
80. Mangen MJ, Otte, Pfeiffer D, Chilonda P. Bovine brucellosis in Sub-Saharan Africa: Estimation of sero-prevalence and impact on meat and milk offtake potential. Rome: FAO. 2002; 58.
81. McDermott JJ, Arimi SM. Brucellosis in sub-Saharan Africa: epidemiology, control and impact. *Vet Microbiol* 2002; 90: 111–134.
82. Muma JB, Godfroid J, Samui KL, Skjerve E. The role of *Brucella* infection in abortions among traditional cattle reared in proximity to wildlife on the Kafue flats of Zambia. *Rev. sci tech Off Int Epiz* 2007; 26: 721–730.
83. Mekonnen H, Kalayou S, Kyule M. Serological survey of bovine brucellosis in Barka and Arado breeds (*Bos indicus*) of Western Tigray. Ethiopia. *Prev Vet Med* 2010; 94: 28–35.
84. Schelling E, Diguimbaye C, Daoud S, Nicolet J, Boerlin P. et al. Brucellosis and Q-fever seroprevalences of nomadic pastoralists and their livestock in Chad. *Prev Vet Med* 2003; 61: 279–293.
85. Marder G, Franco Sycz AE, Czernik GE. Seroprevalencia de brucelosis en hemodonantes del Banco de Sangre de Corrientes. Argentina. *Revista Veterinaria* 2005; 16: 61–64.
86. Hernandez B, Garcia R, Cruz E, Rojo J. Seroprevalencia de brucelosis en disponentes de sangre del Hospital General de Mexico. *Rev Med Hosp Gen Mex* 1999 62: 107–112.
87. Avdikou I, Maipa V, Alamanos Y. Epidemiology of human brucellosis in a defined area of Northwestern Greece. *Epidemiol Infect* 2005; 133: 905–910.
88. Minas M, Minas A, Gourgulianis K, Stournara A. Epidemiological and clinical aspects of human brucellosis in Central Greece. *Jpn J Infect Dis* 2007; 60: 362–366.

89. Jelastopulu E, Merkoulias G, Alexopoulos EC. Underreporting of communicable diseases in the prefecture of Achaia, western Greece. 1999–2004-missed opportunities for early intervention. *Eurosurveillance* 2010; 15: 16–21.
90. De Massis F, Di Girolamo A, Petrini A, Pizzigallo E, Giovannini A. Correlation between animal and human brucellosis in Italy during the period 1997–2002. *Clin Microbiol Infect* 2005; 11: 632–636.
91. Crump JA, Youssef FG, Luby SP, Wasfy MO, Rangel JM, et al. (2003) Estimating the incidence of typhoid fever and other febrile illnesses in developing countries. *Emerg Infect Dis* 9: 539–544.
92. Dean A, Crump L, Greter H, Schelling E, Zinsstag J. Global Burden of Human Brucellosis: A Systematic Review of Disease Frequency. *PLOS. Neglected Tropical Diseases*. 2012; Volume 6; Issue 10; e1865:1-9.
93. Brucellosis; The Center for Food Security & public Health; July. 2009; 1-2.
94. Hovhannisyanyan SG. Health care in Armenia – economic and sociopolitical problems mean the healthcare system is in transition. *BMJ* 2004; 329. 522-523
95. Porphyre T, Jackson R, Sauter-Louis C, Ward D, Baghyan G, Stepanyan E. Mapping brucellosis risk in communities in the Republic of Armenia. *Geospatial Health* 5(1). 2010. pp. 103-118
96. Alibejov N, Krusche S, Wesseler J. Agro-ecological zones and their impact on farm production and farm organization after privatization in Azerbaijan. *Bornimer Agrartechnische Berichte* 2001; 37–42.
97. Abdullayev R, Kracalik I, Ismayilova R, Ustun N, Talibzade A, Blackburn J. Analyzing the spatial and temporal distribution of human brucellosis in Azerbaijan (1995 - 2009) using spatial and spatio-temporal statistics. *BMC Infectious Diseases* 2012. 12:185.
98. Turkish Statistical Institute; 2008; Address-based population register system; December. 2008 census.
99. Brucellosis cases registered in Turkey. Ministry of Health. Turkey; 2007.

100. Jeludkov M. Brucellosis in Russia: Modern epidemiology and laboratory diagnostics. doctoral dissertation. (In Russian) 2007; 263.
101. Maruashvili M. G. Gabunia T. Diagnostic and treatment of Brucellosis. Book: Virsaladze Medical Parasitology and tropical Disease. (In Georgian) 1966. 78.
102. Popkhadze M, Karichashvili LN. Abashidze T.G. Study and typing of Brucella strains. isolated in Georgia and SSR. (In Russian) 1975. 382. Tbilisi.
103. Bakradze I. Bakanidze T. Zebiashvili I. Epidemiology of Brucellosis in Georgia. Parasitology and tropical medicine institute. Tbilisi. (In Georgian) 1963. 4. 133-139
104. Antadze V.S. ანთაძე B. C. Distribution of Brucellosis in Georgia. (In Georgian) 1952. 3. 186.
105. Navdarashvili A. Afridonidze K. Zenaishvili O. Analysis of Brucella cases. 1981_2004 Georgian MOambe. (In Georgian) 2005 w. #3 gv. 22-25.
106. Navdarashvili A. Afridonidze K. Zenaishvili O. Analysis of Brucella cases. 1981_2004 Georgian MOambe. (In Georgian) 2005 w. #4 gv. 90-93.
107. Avila-Calderón E. D, Lopez-Merino A, Sriranganathan N. A History of the Development of *Brucella* Vaccines. BioMed Research International Volume 2013. Article ID 743509. pp. 1-8.
108. Nicoletti P. "Vaccination." in *Animal Brucellosis*. K. Nielsen. J. R. Duncan. Eds, pp. 284–299. CRC Press. Boca Raton. Fla. USA. 1990.
109. Lalsiamthara J, Lee JH. Development and trial of vaccines against Brucella. J Vet Sci. 2017 Aug; 18(Suppl 1): 281–290.
110. Carvalho TF. Haddad JP. Paixão TA. Santos RL. Meta-Analysis and Advancement of Brucellosis Vaccinology. PLoS One. 2016; 11(11).
111. Roux J. "*Brucella* vaccines in humans." in *Brucellosis*. M. M. Madkour. Ed, pp. 244–249. Butterworths. London. UK. 1989.
112. Halling SM. Peterson-Burch BD. Bricker BJ. et al. Completion of the genome sequence of *Brucella abortus* and comparison to the highly similar genomes of *Brucella melitensis* and *Brucella suis*. J Bacteriol 2005; 187: 2715-26.

113. Tscherneva E, Rijpens N, Jersek B, Herman LMF: Differentiation of *Brucella* species by random amplified polymorphic DNA analysis. *J Appl Microbiol* 2000. 88:69-80.
114. Tscherneva E. Rijpens N. Naydensky C. Herman LMF: Repetitive element sequence based polymerase chain reaction for typing of *Brucella* strains. *Vet Microbiol* 1996. 51:169-178.
115. Whatmore AM. Murphy TJ. Shankster S. Young E. Cutler S. Macmillan AP: Use of amplified fragment length polymorphism to identify and type *Brucella* isolates of medical and veterinary interest. *J Clin Microbiol* 2005. 43:761-769
116. Marianelli C. Ciuchini F. Tarantino M. Pasquali P. Adone R: Molecular characterization of the *rpoB* gene in *Brucella* species: new potential molecular markers for genotyping. *Microbes Infect* 2006. 8:860-865.
117. Scott JC. Koylass MS. Stubberfield MR. Whatmore AM: Multiplex Assay based on single-nucleotide polymorphisms for rapid identification of *Brucella* isolates at the species level. *Appl Environ Microbiol* 2007. 73:7331-7337.
118. Al Dahouk S. Tomaso H. Prenger-Berninghoff E. Splettstoesser WD. Scholz HC. Neubauer H: Identification of *Brucella* species and biotypes using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). *Crit Rev Microbiol* 2005. 31:191-196.
119. Michaux S. Paillisson J. Carles-Nurit MJ. et al. Presence of two independent chromosomes in the *Brucella melitensis* 16M genome. *J Bacteriol* 1993; 175: 701-5.
120. Wattam AR. Williams KP. Snyder EE. et al. Analysis of ten *Brucella* genomes reveals evidence for horizontal gene transfer despite a preferred intracellular lifestyle. *J Bacteriol* 2009; 191: 3569-79.
121. Jumas-Bilak E. Charachon MS. Bourg G. et al. Differences in chromosome number and genome rearrangements in the genus *Brucella*. *Mol Microbiol* 1998; 27: 99-106.
122. Alton GG. Jones LM. Angus RD. Verger JM: Techniques for the brucellosis laboratory. Institut National de la Recherche Agronomique. Paris. France; 1988.

123. Banai M, Mayer I, Cohen A: Isolation, identification, and characterization in Israel of *Brucella melitensis* biovar 1 atypical strains susceptible to dyes and penicillin, indicating the evolution of a new variant. *J Clin Microbiol* 1990. 28:1057-1059.
124. Santis R, Ciannamaroni A, Faggioni G, D'Amelio R, Marianelli C, Lista F. Lab on a chip genotyping for *Brucella* spp. based on 15-loci multi locus VNTR analysis. *BMC Microbiology* 2009. 9:66.
125. Nočckler K, Maves R, Cepeda D, Draeger A, Mayer-Scholl A. Molecular Epidemiology of *Brucella* Genotypes in Patients at a Major Hospital in Central Peru; *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*. Oct. 2009. p. 3147–3155.
126. Kattar M. M, Jaafar R. F, Araj G. F. Evaluation of a Multilocus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis Scheme for Typing Human *Brucella* Isolates in a Region of Brucellosis Endemicity; *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*. Dec. 2008. p. 3935–3940.
127. Le Flèche P, Jacques I, Grayon M, Al Dahouk S, Bouchon P, Denoeud F. Evaluation and selection of tandem repeat loci for a *Brucella* MLVA typing assay; *BMC Microbiology* 2006. 6:9.
128. Valdezate S, Navarro A, Villalón P, Carrasco G, Saéz-Nieto J. A. Epidemiological and Phylogenetic Analysis of Spanish Human *Brucella melitensis* Strains by Multiple-Locus Variable-Number Tandem-Repeat Typing. Hypervariable Octameric Oligonucleotide Fingerprinting, and *rpoB* Typing. *J. Clin. Microbiol.* August 2010 vol. 48 no. 8; 2734-2740.
129. Liu Z, Di D, Wang M, et al. MLVA Genotyping Characteristics of Human *Brucella melitensis* Isolated from ulanqab of Inner Mongolia, China. *Front Microbiol.* 2017; 8: 6.
130. Foster J.T, Price L.B, Beckstrom-Sternberg S.M, Pearson T, et al. Genotyping of *Brucella* species using clade specific SNPs. *BMC Microbiology* 2012. 12:110.
131. Foster J. T, Okinaka R.T, Svensson R, Shaw K. J. *Clinical Microbiology*; January 2008 vol. 46 no. 1 296-301.

132. Foster J, Beckstrom-Sternberg S, Pearson T, Beckstrom-Sternberg J, Chain P, Roberto F, Hnath J, Brettin T, Keim P. Whole-Genome-Based Phylogeny and Divergence of the Genus *Brucella*; J. Bacteriol. 2009. 191(8):2864-70.
133. Whatmore AM. Current understanding of the genetic diversity of *Brucella*. an expanding genus of zoonotic pathogens. Infect Genet Evol 2009; 9: 1168-84.
134. Chain PSG. Comerci DJ. Tolmasky ME. *et al*. Whole-genome analyses of speciation events in pathogenic *Brucellae*. Infect Immun 2005; 73: 8353-61.
135. Crasta OR. Folkerts O. Fei Z. *et al*. Genome sequence of *Brucella abortus* vaccine strain S19 compared to virulent strains yield candidate virulence genes. PLoS ONE 2008; 3(5): e2193.
136. Sanodze L. Bautista CT. Garuchava N. Chubinidze S. Tsertsvadze E. Broladze M. Chitadze N. Sidamonidze K. Tsanova S. Akhvlediani T. Rivard RG. Mody R. Hepburn MJ. Elzer PH. Nikolich MP. Trapaidze N. Expansion of brucellosis detection in the country of Georgia by screening household members of cases and neighboring community members. BMC Public Health. 2015 May 2; 15:459. doi: 10.1186/s12889-015-1761-y.
137. Akhvlediani T. Bautista CT. Garuchava N. Sanodze L. Kokaia N. Malania L. Chitadze N. Sidamonidze K. Rivard RG. Hepburn MJ. Nikolich MP. Imnadze P. Trapaidze N. Epidemiological and Clinical Features of Brucellosis in the Country of Georgia. PLoS One. 2017; 12(1): e0170376. Published online 2017 Jan 20. doi: 10.1371/journal.pone.0170376.
138. Sidamonidze K. Su W. Zhgenti E . Buyuk F. Sahin M. Trapaidze N. Imnadze P . Nikolich MP. Obiso R. Kotorashvili A. Molecular Typing of Brucella Species Strains from Georgia and Turkey. J Bacteriol Mycol. 2017; 4(3): 1054
139. Sidamonidze K. Hang J. Yang Y. Dzavashvili G. Zhgenti E. Trapaidze N. Imnadze P. Nikolich MP. Genome Sequences of Human and Livestock Isolates of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* from the Country of Georgia. Genome Announc. 2017 Feb 9; 5(6). pii: e01518-16. doi: 10.1128/genomeA.01518-16.

140. Sidamonidze K. Ramishvili M. Kalandadze I. Tsereteli D. Nikolich MP. Epidemiology and molecular typing of *Brucella* strains circulating in Georgia; Georgian Med News. 2015 Oct; (247):58-63

9. დანართი 1. სადისერტაციო ნაშრომის ინგლისურენოვანი რეზიუმე

Molecular Typing and Phylogenetic Analysis of *Brucella* Strains Isolated in Georgia

Introduction

Brucellosis is a globally distributed zoonotic disease, responsible for a significant economic loss. Due to high virulence, the pathogen belongs to the category “B” biohazard agents.

Brucellosis-endemic areas are mostly seen in the eastern part of Georgia; Investigation of the spread of brucellosis in Georgia began in 1930s. In recent years, cases of brucellosis have been reported in nearly all regions of Georgia and no decline in number has been revealed. The above-mentioned issues show the urgent need of enhanced, multidirectional survey of the problem.

Characterization of *Brucella* strains by species and biovars using microbiological methods requires too much time; Limited variations between some species and biovars may lead to contradictory results and complicate their interpretation. Hence, for the epidemiological studies, where causative agent of Brucellosis must be accurately identified, *Brucella* strains are recommended to be genetically characterized by up-to-date molecular methods.

Objectives

- Studying *Brucella* strains isolated in Georgia, by molecular methods;
- Comparative evaluation of the techniques for genotyping of various *Brucella* species;
- Studying genetic diversity of *Brucella* strains, circulating in Georgia.
- Whole-genome sequencing and phylogenetic analysis of *Brucella* strains.
-

Scientific innovation

For the first time in Georgia, active circulation of two *Brucella* species (*B. abortus* and *B. melitensis*) has been genetically confirmed.

MLVA typing detected genetic diversity of *B. abortus* strains, circulating in Georgia;

Whole genome sequencing and phylogenetic analysis determined that genetic profiles of *Brucella* strains, isolated in Georgia, are in close proximity to the strains, spread in different regions of the world;

MLVA typing of *Brucella* strains revealed their migration between Georgia and Turkey;

Modern molecular methods have been elected for supervision over Brucellosis in Georgia.

Materials and methods

The samples were collected in accordance with the approved Standard Operating Procedures (SOP) of National Center for Disease Control and Public Health (NCDC) and the Defense Threat Reduction Agency (DTRA). All phases of the research were conducted in compliance with biosafety standards.

The initial stage began with clinical and animal (cow, sheep, and goat) samples plated on various bacteriological media (modified tier-martin and *brucella* selective Farrell agar).

Each patient's serum was investigated serologically, on the existence of antibodies against *Brucella* spp.

Polymerase Chain Reaction (PCR) was used for the diagnostic of isolated *Brucella* strains.

Different molecular typing methods were used for genotyping (AMOS PCR, Brucellader PCR, MLVA and SNP) of *Brucella* strains.

Results

The culture Isolates from human blood and ruminant milk or blood were identified by a bacteriological algorithm and confirmed by real-time PCR (Brucella T1, Idaho Technology).

Isolates were then typed using AMOS PCR, which differentiates four human pathogenic species;

however, cannot recognize certain *Brucella* biovars. This gap was addressed by using more universal species-specific Single Nucleotide Polymorphism (SNP) assays. Based on this bacteriological method, 86 strains (48 human, 38 animal isolates) obtained 2009-2011 were confirmed as *Brucella* by real-time PCR. The AMOS PCR supported biochemical test results for 54 *Brucella melitensis* and two *B. abortus* strains, but not for 30 suspected *B. abortus* human and animal isolates. SNP typing of all 86 isolates supported the AMOS PCR test results, as well as, confirmed the species of the 30 strains not amplified by AMOS PCR. The combined AMOS PCR and SNP typing, in this study, provided the first genetic confirmation that both *B. abortus* and *B. melitensis* are actively circulating in humans and animals in Georgia. These SNP assays successfully determined species of Georgian *Brucella* isolates.

Using the precise genetic characterization of *Brucella* isolates by molecular typing methods can provide useful tools for the description of strain diversity, detection of clonal groups, trace-back to sources of infection and discrimination of naturally occurring outbreaks from a bioterrorist event. Recent studies have demonstrated that Multiple-Locus Variable-number tandem-repeat Analysis (MLVA) is a high resolution genetic subtyping tool that can provide valuable information for epidemiological investigations.

The focus of this study was to describe the genetic variability of 86 *Brucella* isolates obtained in Georgia from humans (N=48) and domestic ruminants (N=38) preliminarily identified as *Brucella melitensis* or *Brucella abortus*.

Initial MLVA revealed four clusters of *B. abortus* and three clusters of *B. melitensis*, in comparison to the latter test results which revealed two outlying clusters.

MLVA data was utilized for construction of the phylogenetic tree and evaluation of geographical distribution of various *Brucella* genotypes countrywide.

Whole Genome Sequencing (WGS) allows for a deeper understanding of phylogenetic relationships among bacterial strains.

The lack of genetic resolution with standard methods has made it challenging to understand how this pathogen has spread across the globe. In order to study *Brucella* genetic variation within Georgia, 10 *Brucella* strains (3 *B. melitensis* and 7 *B. abortus*) were chosen for 454 whole genome pyrosequencing and subsequent SNP discovery. These strains were chosen as representatives of major genetic clusters determined by MLVA-15. Maximum parsimony phylogeny has shown that Georgian strains of *B. abortus* largely form a unique clade basal, to the most common radiation of strains from biovars 1, 2, and 4, which are most similar to strains from Central Asia. Georgian *B. melitensis* isolates are less distinct and appear to mostly fall into the East Mediterranean lineage. Those groups with isolates are found worldwide.

Discussion

As a result of MLVA typing of *Brucella* strains that were isolated in Georgia, four clusters of *B. abortus*, three clusters of *B. melitensis*, as well as one group of *B. abortus* and an isolated group of *B. Melitensis* were obtained. This research showed that MLVA is a high-resolution method of genetic subtyping, providing significant information for epidemiological studies. Moreover, MLVA does not require the long-term and expensive process of whole genome sequencing, is less labour-consuming and can detect genetic groups in a short period of time.

MLVA typing of the *Brucella* strains, isolated in Georgia and Turkey, revealed that the most of *B. abortus* and *B. melitensis* strains were original for each of these countries. Herein, it is worth noting, that two strains of *B. melitensis* that were isolated in Turkey, differ from Turkish strains by their genetic profile and are close to Georgian ones.

Sequencing and phylogenetic analysis of *Brucella* strains isolated in Georgia, proved that *B. abortus* strains are distinguished by genetic diversity and are closely related genetically to *Brucella* strains isolated in Central Asia. *B. melitensis* strains, unlike *B. abortus*, are characterized by less variation and mostly belong to the branch of Eastern Mediterranean region.

Conclusions

1. AMOS, Brucellader PCR and SNP species-specific typing of *Brucella* strains confirmed that there are two *Brucella* species circulating in Georgia: *B. melitensis* and *B. abortus*. MLVA typing revealed genetic diversity of *B. melitensis* and *B. Abortus*, circulating in Georgia;
2. Unlike AMOS, Brucellader PCR and SNP are able to type all of the *B. abortus* biovars;
3. Whole genome sequencing and phylogenetic analysis of *Brucella* strains showed that *B. abortus* strains are closely related to the strains, isolated in Central Asia, and *B. melitensis* strains mainly belong to the branch of Eastern Mediterranean region;
4. MLVA typing of the Brucella strains that were isolated in Georgia and Turkey confirmed that Brucella strains might migrate between the countries;
5. Whole genome sequencing of 10 Brucella strains and uploading the results in the genome bank database, ensures broadening of the pathogen research possibilities.

Recommendations

- It is recommended to use the modern molecular methods for epidemiological studies of Brucellosis;
- Brucellader PCR is recommended to be used for species-specific typing of *Brucella* strains, as it is less time-consuming and more cost-effective;
- It is recommended to use MLVA in order to reveal the difference between genetic groups and strains of *Brucella*, as it does not need the long-term and expensive process of whole genome sequencing;
- Whole genome sequencing is recommended to be used to differentiate between local outbreaks and possible bioterrorism acts by genetic characterization of *Brucella* strains and defining their clonal relationships.

10. დანართი 2. საერთაშორისო ჟურნალებში გამოქვეყნებული შრომები

1. Sanodze L, Bautista CT, Garuchava N, Chubinidze S, Tsertsvadze E, Broladze M, Chitadze N, **Sidamonidze K**, Tsanava S, Akhvlediani T, Rivard RG, Mody R, Hepburn MJ, Elzer PH, Nikolich MP, Trapaidze N. Expansion of brucellosis detection in the country of Georgia by screening household members of cases and neighboring community members. BMC Public Health. 2015 May 2; 15:459. doi: 10.1186/s12889-015-1761-y.
2. **Sidamonidze K**, Ramishvili M, Kalandadze I, Tsereteli D, Nikolich MP. Epidemiology and molecular typing of Brucella strains circulating in Georgia; Georgian Med News. 2015 Oct; (247):58-63.
3. Akhvlediani T, Bautista CT, Garuchava N, Sanodze L, Kokaia N, Malania L, Chitadze N, **Sidamonidze K**, Rivard RG, Hepburn MJ, Nikolich MP, Imnadze P, Trapaidze N. Epidemiological and Clinical Features of Brucellosis in the Country of Georgia. PLoS One. 2017; 12(1): e0170376. Published online 2017 Jan 20. doi: 10.1371/journal.pone.0170376.
4. **Sidamonidze K**, Hang J, Yang Y, Dzavashvili G, Zhgenti E, Trapaidze N, Imnadze P, Nikolich MP. Genome Sequences of Human and Livestock Isolates of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* from the Country of Georgia. Genome Announc. 2017 Feb 9; 5(6). pii: e01518-16. doi: 10.1128/genomeA.01518-16.
5. **Sidamonidze K**, Su W, Zhgenti E, Buyuk F, Sahin M, Trapaidze N, Imnadze P, Nikolich MP, Obiso R, Kotorashvili A. Molecular Typing of Brucella Species Strains from Georgia and Turkey. J Bacteriol Mycol. 2017; 4(3): 1054.

11. დანართი 3. საერთაშორისო კონფერენციებზე წარდგენილი მოხსენებები

1. Molecular Typing of Human and Animal Brucella Isolates from Georgia. 11th ASM Biodefense and Emerging Diseases Research Meeting. February 25 - 27. 2013. Washington DC.
2. Identification of Single Nucleotide Polymorphisms Specific for Brucella strains isolated in the Country of Georgia. Brucellosis 2014 International Research Conference 9-12 September 2014. Berlin.
3. Implementation of real-time Single Nucleotide Polymorphism assays for differentiation of Brucella species in the country of Georgia. 13th ASM Biodefense and Emerging Diseases Research Meeting. February 9-11. 2015. Washington DC.
4. Genetic diversity of Georgian and Turkey Brucella Isolates. ASM BD. 2016. New Orleans.
5. Development and assessment of LNA-based SNP assay for differentiation of Brucella species. One Health Eco Health 2016, Australia, Melbourne.
6. Molecular Diversity of Brucella Strains from the Country of Georgia. Sequencing, Finishing, and Analysis in the Future Meeting. 2016. Santa Fe. USA.
7. Whole Genome sequencing and Comparative Genome Analysis of Human and Livestock Isolates of Brucella melitensis and Brucella abortus from the Country of Georgia. 2017 CRWAD Annual Meeting. Chicago. IL. USA.