

ΔΡΑΣΗ ΕΘΝΙΚΗΣ ΕΜΒΕΛΕΙΑΣ:
«ΔΙΜΕΡΕΙΣ ΚΑΙ ΠΟΛΥΜΕΡΕΙΣ Ε&Τ ΣΥΝΕΡΓΑΣΙΕΣ»
Διμερής και Πολυμερής Ε & Τ Συνεργασία Ελλάδας- Γερμανίας



**Νέοι στόχοι για την διάγνωση και επιδημιολογική επιτήρηση της
ανθρώπινης βρουκέλλωσης: μοριακή μελέτη του ξενιστή σε μια ενδημική περιοχή στο
σταυροδρόμι Ασίας και Ευρώπης**

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΗ & ΕΝΗΜΕΡΩΤΙΚΗ ΕΚΔΗΛΩΣΗ στα πλαίσια του προγράμματος BRIDGING με θέμα:

ΒΡΟΥΚΕΛΛΩΣΗ: ΜΙΑ ΣΥΝΕΧΩΣ ΕΠΙΚΑΙΡΗ ΖΩΟΝΟΣΟΣ

Τετάρτη 5 Ιουνίου 2019

Αίθουσες Εκπαίδευσης
Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Αλεξανδρούπολης
Δραγάνα, Αλεξανδρούπολη

**Νέοι στόχοι για την διάγνωση και επιδημιολογική επιτήρηση της
ανθρώπινης βρουκέλλωσης: μοριακή μελέτη του ξενιστή σε μια ενδημική περιοχή στο
σταυροδρόμι Ασίας και Ευρώπης**

**ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΗ & ΕΝΗΜΕΡΩΤΙΚΗ ΕΚΔΗΛΩΣΗ
στα πλαίσια του προγράμματος BRIDGING με θέμα:**

ΒΡΟΥΚΕΛΛΩΣΗ: ΜΙΑ ΣΥΝΕΧΩΣ ΕΠΙΚΑΙΡΗ ΖΩΟΝΟΣΟΣ

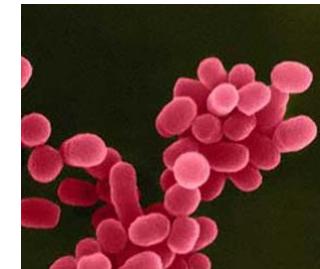
Η βρουκέλλωση στο μικροβιολογικό εργαστήριο

Μαρία Πανοπούλου

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ιατρικής Μικροβιολογίας, ΔΠΘ, ΠΓΝΑ

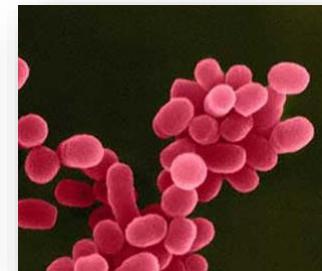
Diagnosis of human brucellosis

The diagnosis of human brucellosis
is greatly dependent on

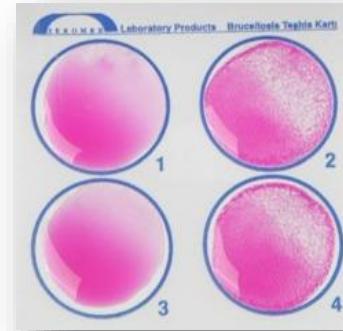
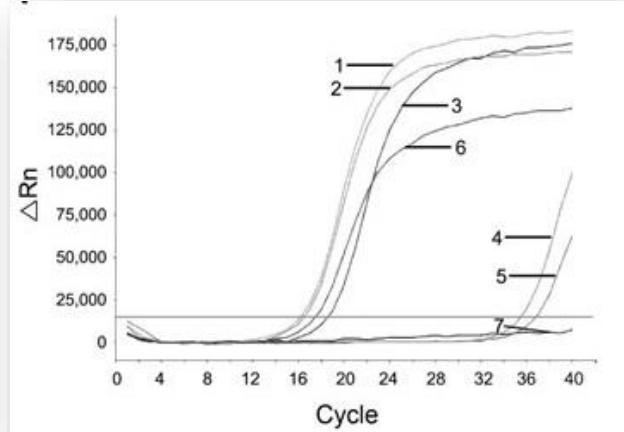
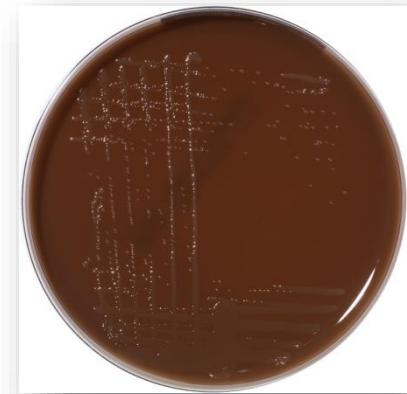


- patient's medical and epidemiological history
- clinical signs
- radiological examination
- hematological and biochemical testing
- **Brucella-specific laboratory tests**

Εργαστηριακή διάγνωση βρουκέλλωσης



- ✓ Καλλιέργειες
- ✓ Ορολογικές δοκιμασίες
- ✓ Μοριακές μέθοδοι



Blood culture → “gold standard”

Bottle Type	Media Formulation	Specimen Type	Specimen Volume
Standard Aerobic	 40 ml supplemented tryptic soy broth (TSB)	Blood or normally sterile body fluid (SBF)	Up to 10 ml
Aerobic	 30 ml peptone-enriched TSB, supplemented with Brain Heart Infusion (BHI) solids and activated charcoal	Blood or SBF	Up to 10 ml

✓ Υψηλή ευαισθησία

- ❖ Υψηλής ποιότητας θρεπτικοί ζωμοί
- ❖ Καλλιέργειες μυελού: υψηλότερη απόδοση κατά 15-30%
- ❖ Λήψη κ/ων κατά τη φάση του πυρετού

✓ Επώαση 5-10 ημέρες

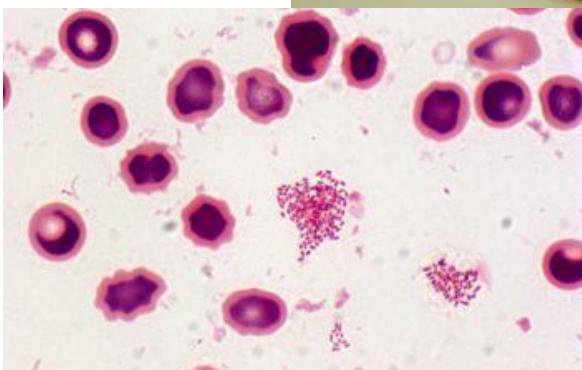
✓ Ευκολία μεθόδου

✓ 24/7/365

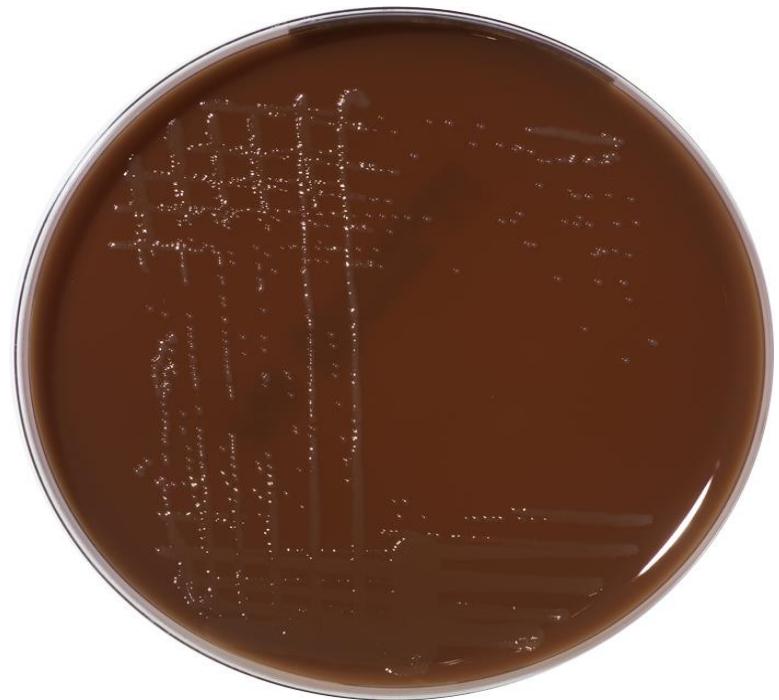


Brucella spp. isolation

- After a positive culture
- ✓ Gram stain
- ✓ subcultures in various media
(Brucella agar and SOC agar)



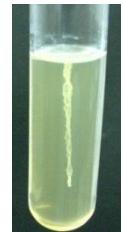
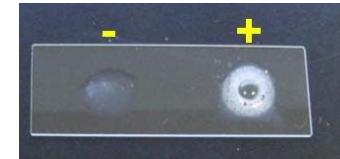
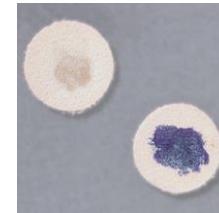
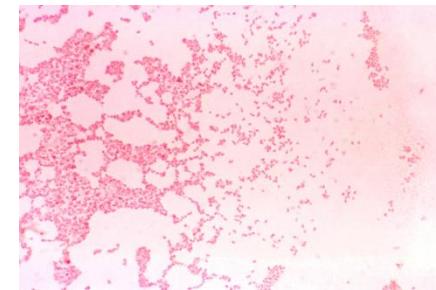
BA growth after 24 hours incubation



**'Honey droplet' like colonies on BA
after 72 hours incubation**

Brucella spp. identification

- Gram-negative coccobacilli
- oxidase and catalase positive
- urease positive
- motility negative
- H₂S production



- serological identification with specific antiserum
- biochemical and metabolic characteristics
(Gram negative ID card, VITEK 2, Biomerieux, France)



Brucella spp.

Antimicrobial Susceptibility Testing

MIC determination by E-test

- Azithromycin
- Ciprofloxacin
- Doxycycline
- Gentamicin
- Levofloxacin
- Moxifloxacin
- Rifampicin
- Streptomycin
- Tetracycline
- Tigecycline
- SXT

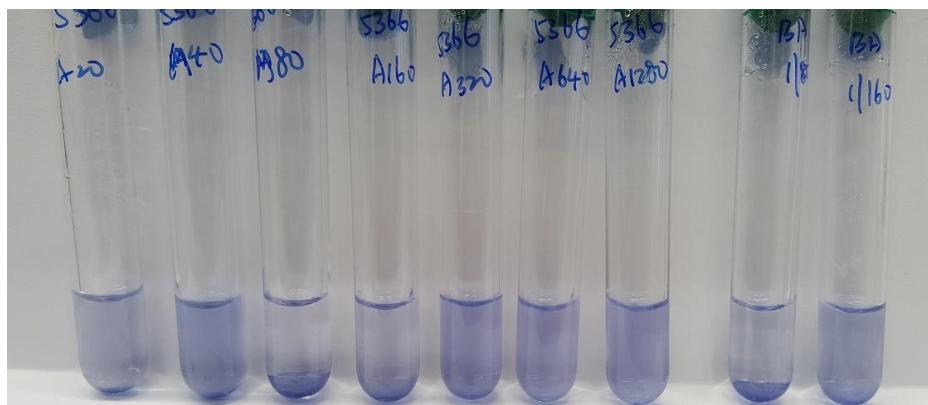


Ορολογική διάγνωση βρουκέλλωσης

- SAT (Wright / Rose-Bengal)
- Έμμεση Coombs
- Elisa (IgG-IgM-IgA)
- IFA (IgG-IgM-IgA)
- Complement Fixation
- Counter Immuno Electrophoresis

SAT - "Wright"

- ανιχνεύει αντισώματα (IgG+IgM+IgA) κατά του s-LPS
- Θετικός τίτλος $\geq 1/80$ (σε ενδημικές περιοχές $\geq 1/160$)
- ψευδώς αρνητική στα αρχικά στάδια της νόσου
- «φαινόμενο «προζώνης»: ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα
- διασταυρούμενη αντίδραση: *Yersinia enterocolitica* O:9, *Escherichia hermanni*, *Escherichia coli* O:157, *Salmonella* O:30, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Vibrio cholerae* O:1, *Francisella tularensis*, *Xanthomonas maltophilia*, *Afipia clevelandensis*



SAT- "Wright"

- Εξέταση 2 δειγμάτων
- ✓ 1^ο : ≤ 7 ημέρες από την έναρξη των συμπτωμάτων
- ✓ 2^ο : 2-4 εβδομάδες αργότερα
- Ευαισθησία
- ✓ Οξεία νόσος 90%
- ✓ Χρόνια νόσος 60%



Ορολογική διάγνωση - ELISA

- ανίχνευση ολικών ή /και μεμονωμένων IgM, IgG, IgA έναντι κυτταροπλασματικών πρωτεΐνών
- χαμηλή ευαίσθησία IgM στη διάγνωση οξείας λοίμωξης
- πιο ευαίσθητη μέθοδος σε χρόνιες περιπτώσεις βρουκέλλωσης
- δεν γίνεται διάκριση ενεργού από παρελθούσα λοίμωξη
- μειωμένη αξία στην παρακολούθηση της ανταπόκρισης στη θεραπεία λόγω της παραμονής υψηλών τίτλων για μακρό χρονικό διάστημα
- πιο ακριβή μέθοδος συγκριτικά με τις συγκολλητινοαντιδράσεις

Evaluation of Seven Tests for Diagnosis of Human Brucellosis in an Area Where the Disease Is Endemic^V

Test	Sensitivity	Specificity	PPV*	NPV**
RB ^d	1.00	0.97	0.89	1.00
MAT	0.92 ^e	1.00	1.00	0.98
Brucellacapt	1.00	1.00	1.00	1.00
IgG ELISA	0.84	1.00	1.00	0.96
IgM ELISA	0.60	1.00	1.00	0.90
IgA ELISA	0.96	0.98	0.92	0.99

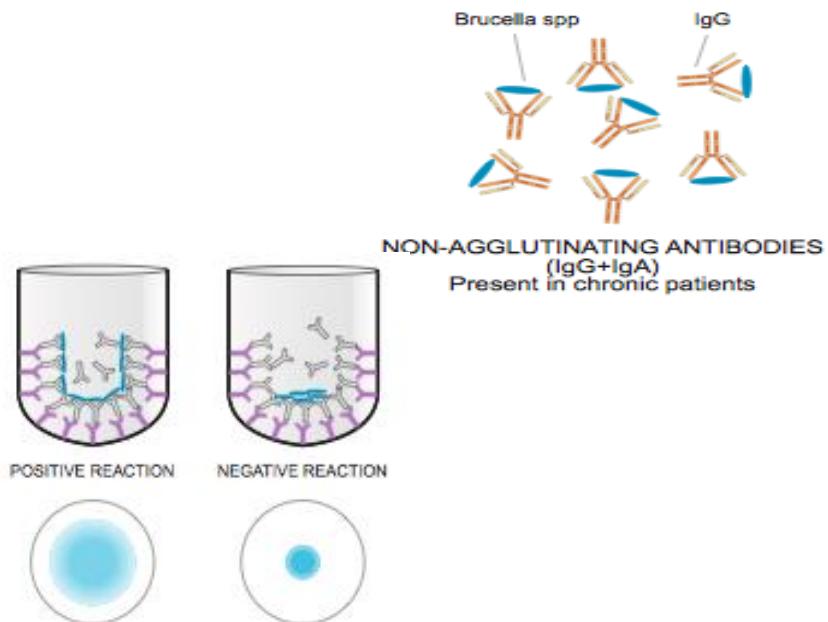
Ορολογική διάγνωση

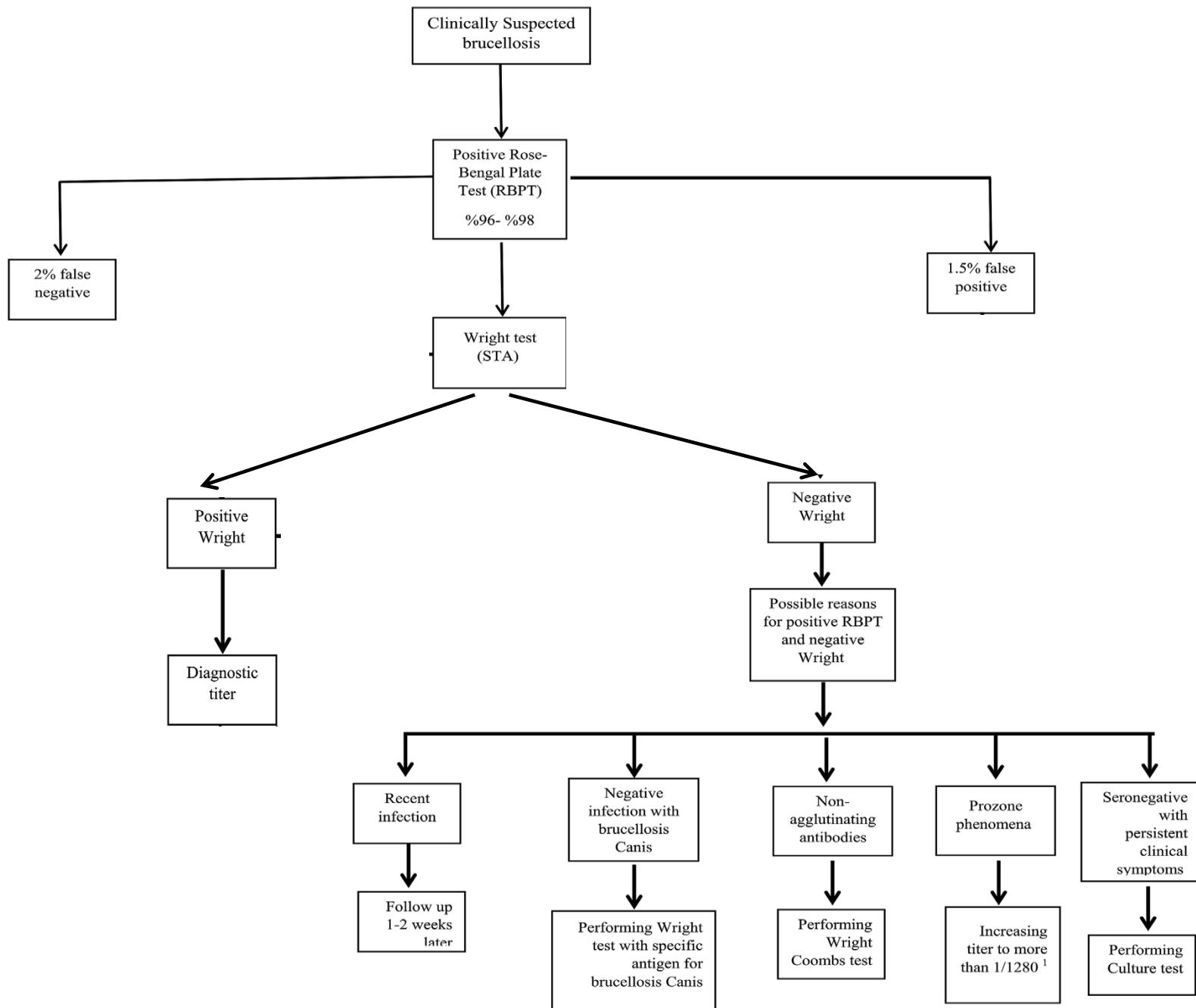
Αντίδραση Wright –Coombs

- ✓ ανίχνευση αντισωμάτων τα οποία δεν προκαλούν συγκόλληση (incomplete or non-agglutinating Abs)
- ✓ πιο ευαίσθητη μέθοδος σε χρόνιες περιπτώσεις βρουκέλλωσης

Ανοσοδεσμευτική τεχνική

- ✓ Παρόμοια αποτελέσματα
- ✓ Πιο εύχρηστη





Ορολογική διάγνωση

- Οξεία βρουκέλλωση

IgM, IgG, IgA → SAT, ELISA

- Χρόνια βρουκέλλωση

IgG, IgA → Coombs, ELISA/ IFA

ΒΡΟΥΚΕΛΛΩΣΗ

ΟΡΟΛΟΓΙΚΗ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ	ΟΞΕΙΑ	ΧΡΟΝΙΑ	ΥΠΟΤΡΟΠΗ
Wright	++	-	+/-
Rose-Bengal	+++	-	+/-
Έμμεση Coombs	+/-	+++	+++
Complement Fixation	+	+++	++
Elisa IgM	+++	-	-
Elisa IgG	++	+++	+++
Elisa IgA	+	+++	+++

Μοριακές μέθοδοι

- **Detection of *Brucella* spp in clinical samples**
 - ✓ polymerase chain reaction (in house PCR)
 - ✓ real-time PCR (Brucella Real TM – SaCycler 96)
- **Identification at species level**
 - ✓ multiplex PCR
- **Distinguishing *Brucella* species and biovars**
 - for epidemiological and taxonomic studies
 - ✓ PCR-RFLP



Brucella spp PCR

DEFINITION *B.abortus* BCSP31 gene encoding a 31-KDa cell surface protein,

ORIGIN 515 bp upstream of HindIII site.
1 gcccctatac gcgcgacctg attcagtctt ttgcatacggt gtcggatgtt cgtctgggg
61 gggccgacgg gctggggcg attgccaaag cgcatattcg cggtaaagt ttgcgtgg
121 cgctgtcat ggcgcagatg gccccatgtt ttatggaaa gatggcaatg cgcaccgata
181 tcgtgtgttc tgcctgtac cattatcgat ttctgtcaat tgatggcc cgtctggcc
241 catggccgggt ggattggctg gacccgggg aagecattgc acgacgcatg aaatcgctt
301 tgcgtgcgc aagtgacatg atggatattt atcttcaga tgacctagca ttcttcacat
361 ccacaaatcgatgatggcc attcggccgc tgatcgagg ttggggctg cgtttttat
421 cgttccatgc tggggcgatg tgcg gcaaggcgatt gtattctttt gaaaaatcca
481 gaatccgttttggatgttttttgcggat cctcaaggtt ctatggttt tcggcataat
541 ctatcgggggaa agaggactgg tattatgaaa ttggaaagca aaatccgtcg cttggctgtt
601 gcggcggtgg cgggcggatg tgccgttggga gcgaggcttgc gggttgacca gggcccgaca
661 ttttccgttgc tggcacttg cggcacacggc ggaactattt atccgatgg tggctgtate
721 gggaaacggggat ttccggcgc aacggggaaa ggggtggggat gtctcgatc gggccgtt
781 tcgtcgaatg gctcggttc caatatcaat gcgatcaagt cggcgctctt ggagtccggc
841 tttacgcagt cagacgttgc ctattggcc tataacggca cggcccttta tgatggcaag
901 ggcaagggtgg aagatttgcg ctttctggcg acgctttacc cggaaacgat ccatatcgat
961 gcgcgttaagg atgcaaacat caaatcggtc gcaagactga aaggcaagcg cgatcgat
1021 gatgagccgg gttctggcac catcgatcgat ggcgtatcg ttcttgaagc ctacggccctc
1081 acggaaacgc atatcaaggc tggacaccctt aagccgggac cggcggggca gggctgaaaa
1141 gatgggtcgcc tggaccccta ttcttttttttgcggat cggccgttgc cggccggcc aatctcgaa
1201 ctggccatctt cgaacggat ttcgtcgat cggatctccg ggcgggaaatc ggacaagatt
1261 ctggagaaatt atcccttctt ctccgaaatgtt gttttttccg cggggccatg taaggacgtt
1321 gcggaaacac ccggccatgc ctttggccgca ctttgggttgc cggggccatg ggccggggcc
1381 gacccatctt ataacatcac caagtttctc ttggaaaggc atacacggca ggcactcgat
1441 gcggccatgc cggccatgc gttcatcaag cttcgatgtg cggccggccatg ctttgggttgc
1501 ccgtcgatc cccggcgatc acgctttacc aaggaaacggc cggccggccatg ataatccctc
1561 aatgtatcggtt ctttgcatac ttatccgaa ttgggggtt acattgcggc agctcgat
1621 gccggctgtt gggctccgtt ttccgagac gttccgggtt agaaccggat cttttggaaacc
1681 gcttcatctt ttttgttttgc ctttggccgca gggccaaac ctttgcggc tttttggaaacc
1741 aatgtatcgat ctttggggat tttttggggat gggccggccatg ctttggggccatg ataatccctc
1801 aacaaaatgc aaagctt //

781 tcgtcgaatg gctcggttc caatatcaat gcgatcaagt cggcgctctt ggagtccggc

B4

B815

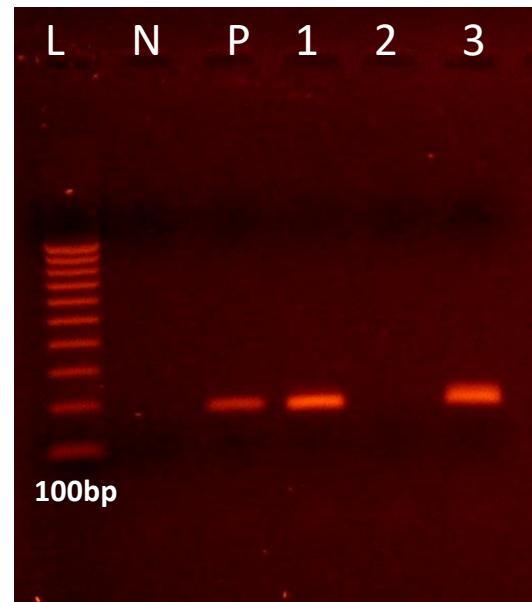
841 tttacgcagt cagacgttgc ctattggcc tataacggca cggcccttta tgatggcaag

901 ggcaagggtgg aagatttgcg ctttctggcg acgctttacc cggaaacgat ccatatcgat

961 gcgcgttaagg atgcaaacat caaatcggtc gcaagactga aaggcaagcg cgatcgat

B5

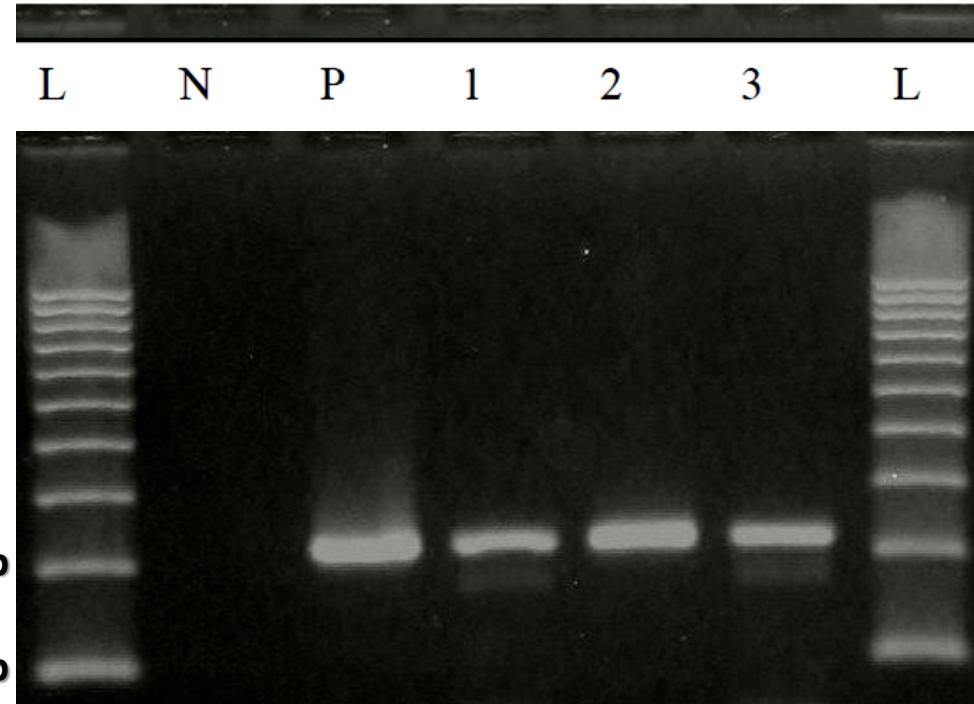
**223-bp fragment
of BCSP31 gene**



Brucella spp PCR

A' PCR			
Reaction mixture	SAMPLE	BLANK	CONTROL
10x buffer	5.0µl	5.0µl	5.0µl
MgCl ₂	1.5 µl	1.5 µl	1.5 µl
dNTP	0,4 µl	0,4 µl	0,4 µl
B4	0,4 µl	0,4 µl	0,4 µl
B5	0,4 µl	0,4 µl	0,4 µl
Taq	0,4 µl	0,4 µl	0,4 µl
DNA	3,0 µl	0,0 µl	1.0 µl
H ₂ O	38,9 µl	41,9 µl	40,9 µl
Total volume	50 µl	50 µl	50 µl

SEMI-NESTED PCR			
Reaction mixture	SAMPLE	BLANK	CONTROL
10x buffer	5.0µl	5.0µl	5.0µl
MgCl ₂	1.5 µl	1.5 µl	1.5 µl
dNTP	0,4 µl	0,4 µl	0,4 µl
B815	0,4 µl	0,4 µl	0,4 µl
B5	0,4 µl	0,4 µl	0,4 µl
Taq	0,4 µl	0,4 µl	0,4 µl
DNA	7µl	1,0 µl	1.0 µl
H ₂ O	34,9µl	40,9 µl	40,9 µl
Total volume	50 µl	50 µl	50 µl

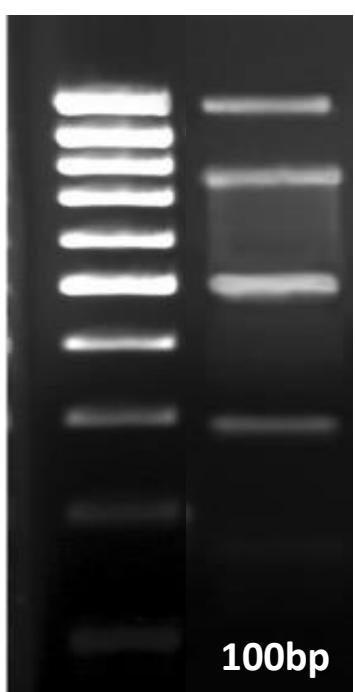


- ✓ initial denaturation at 93°C - 5 min
- ✓ 40 cycles
 - template denaturation at 90°C - 60 sec
 - primer annealing at 58°C - 30 sec
 - primer extension at 72°C - 60 sec
- ✓ final extension at 72°C - 7 min

Multiplex PCR

Identification at species level

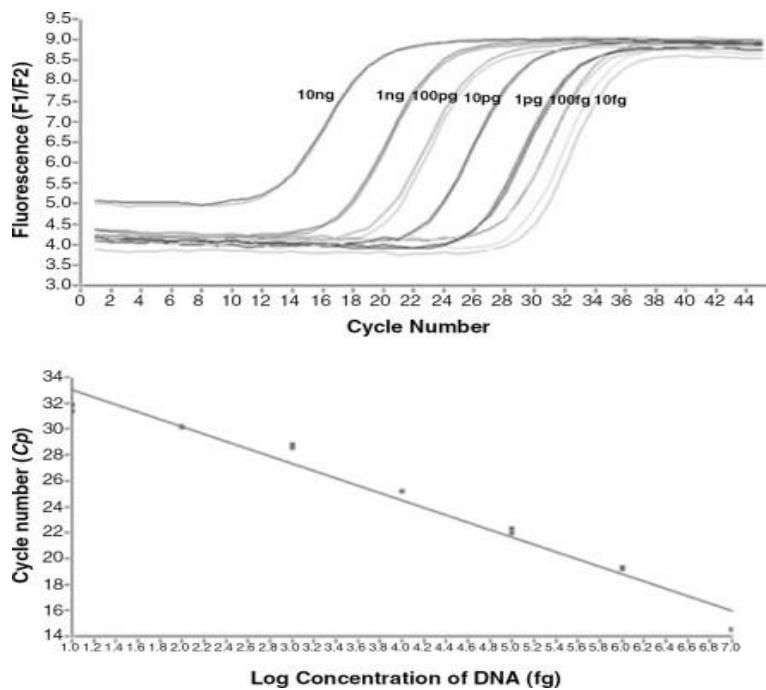
Target genes	Oligonucleotide sequences (5'-3')	Expected band sizes (bp)
IS711	F-TGCCGATCACTTAAGGGCCT TCAT R-GACGAACGGATTTCATCCAT TCCC	731 for <i>B. melitensis</i> , 498 for <i>B. abortus</i> ,
<i>B. ovis</i>	R-CGGGTTCTGGCACCATCGTCG R-AATCGCGTCCTGCTGGTCTGA	285 for <i>B. suis</i> ,
<i>B. melitensis</i>	R-GCGCGGTTTCTGAAGGTTC AGG	976 for <i>B. ovis</i>
<i>B. abortus</i>		
<i>B. suis</i>		



100bp

Real-time PCR

- ✓ Brucella Real TM - SaCycler 96, Sacace
- ✓ Light mix kit Brucella genus – Light Cycler 2.0,
Roche Diagnostics



**223-bp fragment
of BSCP31 gene**

BRUCELLOSIS REFERENCE GUIDE: EXPOSURES, TESTING, AND PREVENTION



Centers for Disease
Control and Prevention
National Center for Emerging and
Zoonotic Infectious Diseases

DIAGNOSTIC TESTING

CDC/CSTE Laboratory Criteria for Diagnosis¹

Definitive

- Culture and identification of *Brucella* spp. from clinical specimens
- Evidence of a four-fold or greater rise in *Brucella* antibody titer between acute and convalescent phase serum specimens obtained greater than or equal to 2 weeks apart

Presumptive

- *Brucella* total antibody titer of greater than or equal to 1:160 by standard tube agglutination test (SAT) or *Brucella* microagglutination test (BMAT) in one or more serum specimens obtained after onset of symptoms
- Detection of *Brucella* DNA in a clinical specimen by PCR assay

Εργαστήριο Μικροβιολογίας

ΔΠΘ, ΠΓΝΑ

Test	Samples accepted
Culture	✓ whole blood ✓ serum, plasma ✓ tissue ✓ bone marrow ✓ cerebrospinal fluid ✓ wounds ✓ purulent discharge ✓ joint fluid
PCR	✓ whole blood ✓ serum ✓ tissue
SAT (serology)	✓ serum
ELISA IgG/IgM/IgA	✓ serum, plasma



Novel targets for diagnostic stratification and epidemiologic surveillance of human brucellosis: host-guided molecular study in an endemic area at the crossroad between Asia and Europe

“BRIDGING”

(BRucellosis IDentification in Greece aNd Germany)

Laboratory Diagnosis of Human Brucellosis

Laboratory of Clinical Microbiology
Medical School, D.U.T.H

Laboratory of Clinical Microbiology, DUTH

- provides diagnoses for almost 35,000 specimens each year
- is equipped with state-of-the-art instruments and assays
- has unique experience in developing specialized testing methods
- faculty expertise includes bacteriology analysis, antimicrobial susceptibility testing, mycology, virology, tick-borne pathogens, mycobacteriology, epidemiology, parasitology and immunology
- offers a growing number of PCR diagnostics for detection and identification of bacterial and viral pathogens including *Brucella* spp., *Mycobacterium* spp., HBV, HCV, EBV, HSV_{1/2}, CMV, Influenza virus, HPV genotyping, *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma* spp, and *Ureaplasma urealyticum*
- Internal Quality Control (IQC) and External Quality Assessment (EQA) programmes, provided by the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-

