

**T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**FARKLI GENOTİPTE BARTONELLA HENSELAE KÖKENLERİ
İLE HAZIRLANAN ELISA TEST SONUÇLARININ
KARŞILAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

DR. MUSTAFA KULA

**DANIŞMAN
PROF. DR. ÇAĞRI ERGİN**

DENİZLİ-2013

**T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**FARKLI GENOTİPTE BARTONELLA HENSELAE KÖKENLERİ
İLE HAZIRLANAN ELISA TEST SONUÇLARININ
KARŞILAŞTIRILMASI**

**UZMANLIK TEZİ
DR. MUSTAFA KULA**

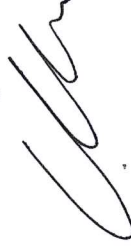
**DANIŞMAN
PROF. DR. ÇAĞRI ERGİN**

**Bu çalışma Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma
Projeleri Koordinasyon Birimi'nin 14.05.2012 tarih
2012TPF024 nolu kararı ile desteklenmiştir.**

DENİZLİ-2013

Pof. Dr. ÇAĞRI ERGİN danışmanlığında Dr. MUSTAFA KULA tarafından yapılan “Farklı genotipte *Bartonella henselae* kökenleri ile hazırlanan ELISA test sonuçlarının karşılaştırılması” başlıklı tez çalışması 24/12/2013 tarihinde yapılan tez savunma sınavı sonrası yapılan değerlendirme sonucu jürimiz tarafından Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı’nda TIPTA UZMANLIK TEZİ olarak kabul edilmiştir.

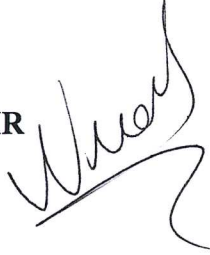
BAŞKAN: Prof. Dr. İlknur KALELİ



ÜYE: Prof. Dr. Çağrı ERGİN



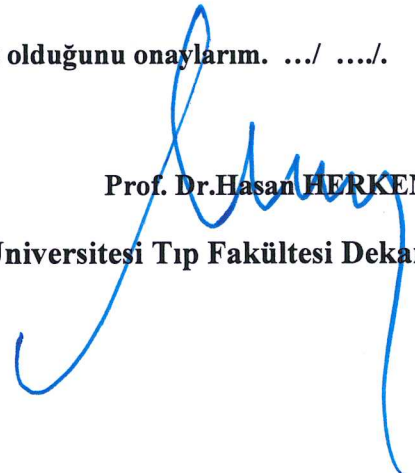
ÜYE: Doç. Dr. Nural CEVAHİR



Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylım. .../ .../.

Prof. Dr. Hasan HERKEN

Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekan



TEŞEKKÜR

Eğitimim süreci boyunca üzerimde çok emeği olan ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen tez danıőmanım Sayın Prof.Dr. Çağrı Ergin baőta olmak üzere uzmanlık eğitimim süresince sonsuz katkısı bulunan ve tüm sıkıntılarında yardımcı olan Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalında görevli öğretim üyeleri Prof.Dr. İlknur Kaleli, Doç.Dr. Melek Demir, Doç.Dr. Nural Cevahir, Yrd.Doç.Dr. Mustafa őengül, Yrd.Doç.Dr. Ergun Mete'ye; tezim süresince her zaman çekinmeden arayabildiğim ve bakteri kökenini bulmamıza yardımcı olan Veteriner Hekim Bekir Çelebi'ye; hayvan deneyi süresi boyunca yardımını esirgemeyen Veteriner Hekim Barbaros şahin'e; asistanlık hayatımın öncesinde olduğu gibi asistanlığım süresince her zaman yanımda olan ve her türlü desteklerini esirgemeyen sevgili aileme, bilimsel ve manevi desteğini esirgemeyen asistan arkadaşlarım Dr. Mahmut Uđur Çitil, Uzm.Dr. Fatma Aydeniz Ozansoy, Uzm.Dr. Özgür D.Yiđit, Uzm.Dr. Orçun Zorbozan, Dr. Osman Acar ve Dr. Muradiye Yayar'a; Tıbbi Mikrobiyoloji AD.'nın tüm değerli çalışanlarına sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ONAY SAYFASI	III
TEŞEKKÜR	IV
İÇİNDEKİLER	V
SİMGELER VE KISALTMALAR	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ	VIII
TABLolar DİZİNİ	IX
ÖZET	X
İNGİLİZCE ÖZET	XII
GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER	2
<i>BARTONELLA CİNSİ</i>	2
<i>Bartonella</i> Türlerinin Taksonomisi.....	2
<i>Bartonella</i> Türlerinin Epidemiyolojisi.....	4
Patogenez	5
<i>Bartonella</i> Türlerinde Klinik Tablolar.....	5
<i>Kedi Tırmığı Hastalığı</i>	6
<i>Oroya Ateşi ve Verruga Peruana (Carrion Hastalığı)</i>	7
<i>Peliosis</i>	8

<i>Endokardit</i>	8
<i>Basiller Anjiomatoz</i>	8
<i>Nedeni Bilinmeyen Ateş</i>	9
<i>Komplikasyonlar</i>	9
<i>Bartonella Türlerinin Tespiti, İzolasyonu ve Tanımlanması</i>	10
<i>Örnek alınması, taşınması ve saklanması</i>	10
<i>Morfoloji ve Boyanma Özellikleri</i>	10
<i>Kültür</i>	10
<i>Tanımlama Yöntemleri</i>	11
<i>Serolojik Yöntemler</i>	12
<i>İmmünofluoresans Yöntem</i>	13
<i>Enzim İmmün Ölçüm Yöntemi</i>	13
GEREÇ VE YÖNTEM	14
DENEY HAYVANLARINDA ANTİKOR OLUŞTURMA	14
IFA Yöntemi	15
ELISA TEST PLAKLARININ HAZIRLANMASI	16
ELISA Yöntemi	17
ÇAPRAZ REAKSİYONLARIN İNCELENMESİ	18
İSTATİSTİKSEL ANALİZ	19
BULGULAR	20
TARTIŞMA	24

SONUÇLAR	37
KAYNAKLAR.....	38

SİMGELER VE KISALTMALAR

AIDS: Acquired Immune Deficiency Syndrome

BA: Basiller Anjiomatoz

Bad A: *Bartonella* Adhezin

BHI: Brain Heart Infusion

BLPs: Bacteriophage Like Particle

CFU: Colony Forming Unit

CMV: Sitomegalovirüs

EC: Endothelial Cell

EBV: Epstein Barr virüs

EDTA: Etilendiamintetraasetikası

EIA: Enzyme Immunoassay

ELISA: Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay

HIV: Human Immunodeficiency Virüs

HUVEC: Humun Umbilical Vein Endothelial Cell

HSM: Hepatosplenomegali

IFA: Immunofluorescence Antibody

IFAT: Immunofluorescence Antibody Technique

IV: İntravasküler

KTH: Kedi Tırmığı Hastalığı

LAP: Lenfadenomegali

NC: Nitroselüloz

PCR: Polymerase Chain Reaction

POGS: Parinaud Okuloglandüler Sendrom

PVDF: Polyvinyline Difluoride

SDS-PAGE: Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis

SK: Subkutan

T4SS: T4 Secretion System

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa No
Şekil 1 Araştırma için seçilen mikrotitrasyon plak görüntüsü	20
Şekil 2 Farklı <i>B.henselae</i> kökenleri ile oluşturulan denek gruplarında antikor ölçümleri	22

TABLÖLAR DİZİNİ

	Sayfa No
Tablo 1 Grup 1 (n=11) serumlarının farklı antijen plaklarına göre absorbands verileri	21
Tablo 2 Grup 2 (n=11) serumlarının farklı antijen plaklarına göre absorbands verileri	21
Tablo 3 Grup 3 (n=11) serumlarının farklı antijen plaklarına göre absorbands verileri	22
Tablo 4 İnsan EBV, CMV ve <i>Toxoplasma gondii</i> antikorlarının “in-house” ELISA plaklarında verdikleri reaksiyonların karşılaştırılması	23

ÖZET

Farklı genotipte *Bartonella henselae* kökenleri ile hazırlanan ELISA test sonuçlarının karşılaştırılması

Dr. Mustafa KULA

Bartonella sp. Gram-negatif, kokobasil/basil görünümünde, özellikle immünsüprese bireylerde hayatı tehdit eden infeksiyonlara neden olabilen zoonotik fırsatçı patojenlerdir. Bu çalışmada, laboratuvar ortamında farklı *Bartonella* kökenleri ile hazırlanan ELISA plaklarındaki reaksiyonların karşılaştırılması ve klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında sık olarak varlığı araştırılan Epstein Barr virüs, Sitomegalo virüs ve *Toxoplasma gondii* ile çapraz antikor reaksiyonlarının değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarında BALB/c farelerine iki farklı *B.henselae* kökeni (ATCC 49882 ve Hıfzısıhha C-48) verildi. Deneklerde antikor oluşturulması süreci 90 gün devam ettirildi. İki farklı *B.henselae* kökeni antijenleri ile “in-house” ELISA plakları hazırlandı. Bu plaklarda farklı antijen uyarı verilen gruplardaki, farklı antijen ile kaplanan plaklardaki reaksiyonlar ve insan kaynaklı serumlarda çapraz reaksiyonlar değerlendirildi.

B.henselae ATCC 49882 (Houston-1) ile enfekte edilen grupta; *B.henselae* ATCC 49882 antijeni ile kaplı kuyucuklarda %90.91 pozitif, %9.09 negatif ve *B.henselae* Hıfzısıhha C-48 antijeni ile kaplı kuyucuklarda %81.82 pozitif, %18.18 negatif reaksiyon alındı ($p<0.05$). *B.henselae* Hıfzısıhha C-48 ile enfekte edilen grupta; *B.henselae* ATCC antijeni ile kuyucuklarda %81.82 pozitif, %9.18 negatif ve *B.henselae* Hıfzısıhha C-48 antijeni ile kaplı kuyucuklarda %72.73 pozitif, %27.27 negatif olarak reaksiyon alındı ($p>0.05$). *B.henselae* ATCC 49882 antijeni ile kaplı kuyucuklarda EBV-pozitif hasta serumlarının 2'sinde (%18.18) ve CMV-pozitif hasta serumlarının 2'sinde (%18.18) pozitif reaksiyon ölçüldü. *B.henselae* Hıfzısıhha C-48 antijeni ile kaplı kuyucuklarda EBV-pozitif hasta serumlarının 2'sinde (%18.18), CMV-pozitif hasta serumlarının 1'inde (%9.09) pozitif reaksiyon ölçüldü. Her iki farklı *B.henselae* kökeni ile antijenin hazırlandığı kuyucuklarda *T.gondii*-pozitif hasta serumlarında reaksiyon izlenmedi.

Sonuç olarak; *B.henselae* Hıfzısıhha C-48 kökenin *B.henselae* ATCC 49882 kökenine göre daha düşük düzeyde antikor cevabı oluşturduğu saptandı. EBV-pozitif ve CMV-pozitif hasta serumlarında çapraz reaksiyon varlığı görülürken, *T.gondii* seropozitif olgularda reaksiyon izlenmedi.

Anahtar Kelimeler: *B.henselae*, BALB/c fare, çapraz reaksiyon, ELISA, seroloji

SUMMARY

Dr. Mustafa KULA

Comparing ELISA test results that prepared with different genotype of *Bartonella hensalea*

Bartonella sp. Gram-negative, coccobacilli/bacilli view, especially in immunocompromised individuals which may cause life-threatening infections opportunistic zoonotic pathogens. This study in the laboratory, comparison of the reaction on ELISA plates prepared with different origins of *Bartonella* and cross-antibody reactions was to evaluate with Epstein Barr virüs, Sitomegalo virüs ve *Toxoplasma gondii* that investigated in clinical microbiology laboratories frequently.

At Pamukkale University Faculty of Medicine Experimental Animals Laboratories, two different *B.henselae* origin (ATCC 49882 ve Hıfzısıhha C-48) was given to BALB/c rats. The process of creating antibodies in subjects was continued 90 days. “In house” ELISA plates were prepared with two different origins of *B. henselae* antigens. In this plate cross-antibody reactions was to evaluate in different antigenic stimulation given groups, reactions in plates coated with different antigens and in human serum.

In the group being infected with *B.henselae* ATCC 49882 (Houston-1), in wells coated with; *B.henselae* ATCC 49882 antigen %90.91 positive, %9.09 negative, In wells coated with *B.henselae* Hıfzısıhha C-48 antigen %81.82 positive, %18.18 negative reaction taken ($p<0.05$). In the group infected with *B.henselae* Hıfzısıhha C-48, in wells with antigen *B.henselae* ATCC, %81.82 positive, %9.18 negative, In wells coated with *B.henselae* Hıfzısıhha C-48 antigen; %72.73 positive, %27.27 negative reaction taken ($p>0.05$). In wells coated with *B.henselae* ATCC 49882 antigen two of EBV-positive patient serum (%18.18) and two of CMV positive patient serum (%18.18) positive reaction taken. In wells coated with *B.henselae* Hıfzısıhha C-48 antigen two of EBV-positive patient serum (%18.18) and one of CMV positive patient serum (%9.09) positive reaction taken. In *T.gondii* positive patient serums, reaction wasn't seen that prepared with both *B.henselea* origin antigen.

As a result *B.henselae* Hifzısıhha C-48 origin made up lower level of antibody responses than *B.henselae* ATCC 49882 origin. In the serum of patients with EBV positive and CMV positive cross reaction was seen. In *T.gondii* seropositive patient reaction wasn't observed.

Keywords: *B.henselae*, BALB/c mouse, cross- reaction, ELISA, serology

GİRİŞ

Bartonella sp. gram-negatif, kokobasil/basil görünümünde, özellikle immünsüprese bireylerde hayatı tehdit eden infeksiyonlara neden olabilen zoonotik fırsatçı patojenlerdir (1). İnsanlarda kedi tırmığı hastalığı (KTH), basiller anjiyomatoz (BA), basiller peliyoz, tekrarlayan ateş, endokardit, özellikle insan immünyetmezlik virüsü (Human Immunodeficiency Virüs, HIV) pozitif olgularda nörolojik sendromlar, Carrion hastalığı ve siper ateşine neden olabilirler (2). Türkiye’de *Bartonella* bakterilerine bağlı KTH ve BA olgu sunuları bulunmaktadır (3, 4). Bölgemizde kan donörlerinde *B. henselae* IgG seropozitifliği %6.0, saha taramasında ise *Bartonella henselae* seropozitifliği %12.5, veterinerlerde ise %29.6 olarak bulunmuştur (5, 6).

Bu çalışmada,

a) Laboratuvar ortamında farklı *Bartonella* kökenleri ile hazırlanan ELISA plaklarındaki reaksiyonların karşılaştırılması,

b) Klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında sık olarak varlığı araştırılan Epstein Barr virüs (EBV), Sitomegalo virüs (CMV) ve *Toxoplasma gondii* ile çapraz antikor reaksiyonlarının varlığının araştırılması amaçlanmıştır.

Elde edilen sonuçlar doğrultusunda *Bartonella* infeksiyonlarının tanısında faydalanılmak üzere, ülkemizde izole edilerek laboratuvar ortamında hazırlanarak ELISA yönteminin performansının değerlendirilmesidir.

GENEL BİLGİLER

BARTONELLA CİNSİ

Bartonella türleri dünyada oldukça yaygın görülen, hayvanlarla temas ile ilişkilendirilen zoonotik bir patojendir (7). *Bartonella* genusu küçük, oksidaz ve katalaz negatif, pleomorfik, Gram negatif, basil/kokobasil, aerobik bakterilerdir. *Protobacteria* sınıfının α şubesinin üyesidir. Günümüzde *Bartonella* cinsi bakterilerinin 22'den fazla türü vardır (8, 9). İnsanlar için uzun süreden beri *B.henselae*, *B.bacilliformis* ve *B.quintana* patojen olarak kabul edilmektedir. Son yıllarda *B.clarridgeiae*, *B.elizabethae* ve *B.grahamii* ve *B.ancashi*'nin de insanlar için patojen olarak kabul edilerek, toplum içinde yaygınlığı araştırılmaktadır (8, 10, 11).

Bartonella türlerine karşı oluşan yanıt kişilerin bağışıklık durumuna göre değişmektedir. İmmünitesi sağlam kişilerde granülomatoz ve süperatif bir tablo oluştururken, immün yetmezlikli hastalarda sıklıkla vasküloproliferatif cevap oluşturmaktadır (12). *Bartonella* bakterileri asemptomatik infeksiyonların yanında, ciddi infeksiyonlara da yol açabilirler. İnsanlarda kedi tırmığı hastalığı (KTH), basiller anjiyomatoz (BA), basiller peliyoz, tekrarlayan ateş, endokardit, özellikle HIV pozitif olgularda nörolojik sendromlar, Carrion hastalığı ve siper ateşine neden olabilirler (2). *B.henselae*'nin kedilerdeki doğal taşıyıcısı kedi pireleridir (*Ctenocephalides felis*). *Bartonella* türlerinin geçişinde kene, tatarcık, pire ve bitler önemli rol oynamaktadır (9, 13, 14). *B.quintana* için vücut biti (*Pediculus humanis corporis*), *B.bacilliformis* için *Lutzomyia verrucorum* tatarcıkları tanımlanmış olan vektörlerdir.

***Bartonella* Türlerinin Taksonomisi**

“Bergey's Manual of Systematic Bacteriology”nin 2012'deki basımına göre *Rickettsiales* sınıfı üç aile içermektedir: *Rickettsiaceae*, *Bartonellaceae* ve *Anaplasmataceae* (15). *Rickettsiaceae* familyasında *Rickettsia*, *Coxiella* ve

Rochalimaea genusu bulunmaktadır (16). *Rickettsia* ve *Coxiella*'ların spesifik konak hücrelerinin dışında kültür edilememelerine rağmen, *Rochalimaea* genusu hücreden bağımsız besiyerlerinde üretilebilmiştir. *Bartonellaceae* ailesinde 1984 yılına kadar sadece bir *Bartonella* türü (*B.bacilliformis*), iki *Grahamella* türü (*G.talpae* ve *G.peromysci*) ve iki *Rochalimaea* türü (*R.quintana* ve *R.vinsonii*) tanımlanmıştır. *B.elizabethae* 1986 yılında yeni tür olarak eklenmiştir (17). *Bartonella*'lara son yıllar içinde yeni izole edilen türler eklenmektedir, 2013 yılında Peru'da *B.ancashi* hastadan izole edilen yeni bir türdür. Günümüzde *Bartonella sp.* 19 tür ve üç alt tür olarak bulunmaktadır (11, 18).

Klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında standart kullanılan Gram boyama ile saptanamayan bakteriler, deri ve visseral organ lezyonlarının biyopsi kesitlerinde Wartin-Starry gümüş boyama ile gösterilebilmiştir. Mikroorganizmaların kültürde üremeleri son derece zor olmuştur. Organizmalar uzun süre inkübasyona bırakılan hücre kültürlerinde izole edilebilmiş, moleküler ve genetik yöntemlerle tanımlanmıştır (7, 19). *Rochalimaea* genusunun tüm üyeleri *B.quintana*, *B.vinsonii*, *B.henselae* ve *B.elizabethae* olarak *Bartonella* genusuna dahil edilmiştir (20). O'connor ve ark. (21) DNA hibridizasyon teknikleri ve 16S rRNA sekanslama ile yapılan genetik analiz ile *Bartonella*'nın *Bartonella* familyasında tek genus olduğunu saptamışlardır. Bu aile *Proteobacteria* sınıfının $\alpha 2$ subgrubundaki "Rhizobiales" takımına aittir. *Afipia*, *Brucella* ve *Agrobacterium tumefaciens* ile yakın akrabadır. *B.bacilliformis* ve *B.quintana* insana özgül iken; *B.henselae*, *B.clarridgeiae* ve *B.koehlerae* kedilerden, *B.grahamii*, *B.taylori*, *B.doshiae*, *B.tribocorum* vahşi farelerden, *B.vinsonii subsp. Berkhofli* ise köpeklerden izole edilmiştir (22). Geleneksel kültür ve serolojik yöntemler ile birlikte "Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis" (SDS-PAGE) ve 16S rDNA sekanslama yöntemlerinde kullanılması sonucunda *B.henselae* Houston (16S Tip I) ve *B.henselae* Marseilles (16S Tip II) kökenleri ayrı kökenler olarak kabul edilmiştir (23). Bergmans ve ark. (24) Hollanda'da KTH olan kişilerde "Polimerase Chain Reaction" (PCR) yöntemiyle değerlendirmişler ve *B.henselae* Tip I ve Tip II varyantlarını da saptamışlardır.

***Bartonella* Türlerinin Epidemiyolojisi**

Bartonella türlerinin vektörlerle geçişi tam olarak bilinmemektedir. Akarlar, *Phlebotomus spp.*, *Cetanocephalides felis*, vücut bitleri ve keneler bulaştıran sorumlu tutulmaktadır (9, 25). *B.henselae*'nin insanlara bulaşmasında kediler rezervuar konumundadır. Kedilerden insanlara *Bartonella*'nın geçişi genellikle tırmalama ve ısırma ile olmaktadır. Muhtemelen kedi pireleri (*C.felis*) tarafından da indirek yolla *Bartonella* geçişi olabilmektedir (26, 27). Kedi pireleri, *B.henselae*'yi bağırsaklarında barındırmakta ve dışkıları ile salgılayarak *Bartonella*'yı kediler arasında taşımaktadırlar. Kontamine tırnaklar ile tırmalama veya kedilerin kendilerini yalamaları esnasında pire dışkılarının diş aralarına yerleşerek, ısırma sırasında enfeksiyonu insanlara taşıma sıklığı artmaktadır. Nadiren de olsa köpeklerden insanlara geçiş tanımlanmıştır (28).

KTH dünyada çoğunlukla sıcak iklim kuşağında ve sonbahar/kış aylarında görülmektedir. Bu dağılım, yaz ortasında doğan kedi yavrularıyla birlikte artan pire popülasyonu ile ilişkilendirilebilir (29, 30). Çeşitli ülkelerde risk gruplarında ve sağlıklı bireylerde *Bartonella spp.* seropozitifliği %0.2-40 arasında değişmektedir (2, 31-33). Risk grubu olan veteriner ve ilgili mesleklerde ABD'de *B.henselae* seroprevalansı %7.1-8.1 Avrupa'da ise %6.6-51.1 arasında bulunmuştur (25, 34, 35). Kedi ile teması olan sağlıklı kan donörlerinde *B.henselae* seroprevalansı ABD'de %2-6, İsveç'te %4, Avustralya'da %5 olarak rapor edilmiştir. İmmün yetmezliği olan hastalarda ise Japonya'da %9.6, Güney Afrika'da %10, Bahreyn'de %16 olarak saptanmıştır (36). Evde kedi veya kedi yavrusu besleyen ailelerin KTH olan olgular arasındaki insidansı %0.77-0.86 arasındadır (13, 37). Bazı *Bartonella* türleri sınırlı coğrafik bölgelerde yer almaktadır. Örnek olarak, *B.bacilliformis*'in vektörü olan *Lutzomyia verrucarum*, sadece Güney Amerika'daki And Dağlarında yaşadığı için, *B.bacilliformis*'e daha çok bu bölgede rastlanmaktadır (8). Ancak 2013'de Blazes ve ark. (11) *B.ancashi*'nin de bu bölgede etken olarak bulunduğunu bildirmişlerdir.

Patogenez

Bartonella türleri hemotropurlar. *B.quintana* ve *B.henselae* infeksiyonları kronik intraeritrositik bakteriyemiye neden olurken, *B.bacilliformis* infeksiyonlarında ise akut hematokrit düşüşüne bağlı klinik tablo görülmektedir (38, 39). *B.bacilliformis* ve olasılıkla *B.henselae*, deformin salgılamak üzere eritrositlerin hücre zarında invazyon yaparak çukurlar oluşturmaktadır. *B.bacilliformis* kamçı aracılığıyla gerçekleşen hareketi ile eritrositlerde parazit olarak davranır. “Invasion Associated Locus” (IaIB) geni ile arthropod gibi davranarak eritrosit işgalini artırır (39, 40). *B.henselae*'da buluna adhezin olan *BadA*; endotel hücrelerine β integrinler ve çeşitli hücre dışı matriks proteinleri gibi proteinlere bağlanarak makrofajlar üzerinden fagositozu inhibe eder (41). *B.quintana* ve *B.henselae*'da “T4 secretion system” (T4SS) bulunurken *B.bacilliformis*'de yoktur. “Endotel cell” (EC) iskeletindeki değişiklikler için efektör sistem olan VirB/virD4 ile T4SS üzerinden NF- κ B aktivasyonu ve apoptozis inhibisyonu gerçekleşir (42, 43). İn-vivo ortamda *B.bacilliformis* “Human umbilical vein endothelial cells” (HUVEC) içinde anjiogenik çözümler mitojenik bir protein sentezler. *B.henselae* infeksiyonlarında *BadA* geni ile proanjiogenik moleküller olan “Vascular Endothelial Growth Factor” (VEGF) ve IL-8 sentezini indükler. T hepler- 1 VEGF upregülasyonu ile ekspresyonu ve IL-8'inde hepatositlerde artışını indükler (44-46).

Bartonella Türlerinde Klinik Tablolar

Bartonella bakterileri çok sayıda infeksiyona neden olmaktadır. Sıklıkla KTH, Carrion hastalığı, siper ateşi'nin yanısıra; endokardit, nedeni bilinmeyen ateş ve tekrarlayan bakteriyemi gibi klinik tablolar yaygın tanımlanmıştır. Bunların yanında tekrarlayan ve sebebi bilinmeyen ateş, bakteriyemi, retinit, optik nörit, basiller anjiomatozis, hepatik peliosis, LAP, pulmoner, hepatik, meningoensefalit, ensefalit, myokardit, perikardit, osteomyelit, kutanöz vaskülit gibi pek çok klinik tablolara neden olmaktadır (9, 13, 47).

Kedi Tırmığı Hastalığı

KTH önceki yıllarda bölgesel LAP ve ateşle seyreden bir hastalık olarak bildirilmiştir. Tanı yöntemlerinin gelişimi ile birlikte etken *B.henselae* olarak tanımlanmıştır. KTH ilk olarak 1950 yılında Debre ve arkadaşları tarafından raporlanmıştır. Daha önceki yıllarda 1889 yılında Parinaud benzer semptomları tanımlamıştır (48). KTH tipik ve atipik olmak üzere iki formda görülmektedir. Tipik formda tırmalama ve ısırma yerinde 3-12 gün içinde 2-10 mm çapında eritamatöz papül veya püstül şeklinde primer lezyon ortaya çıkar ve iz bırakmadan genellikle 2-4 hafta içinde iyileşir. Takiben gelişen LAP en önemli klinik belirtidir (49). Etkenle teması izleyen 1-7 hafta içinde gelişen LAP'ler, ağrısız ve tek taraflıdır. Primer olarak aksiller bölgede ve daha nadir olarak servikal ve inguinal bölgede görülmektedir. LAP, olguların %30'unda birden fazla bölgede ve %20'inde aynı bölgede birden fazla LAP şeklinde görülmektedir. Olguların %30 kadarında lenf bezlerinde süpürasyon gelişir, jeneralize LAP nadir görülmektedir (26, 49). Hastalık esnasında ağır belirtilerin görülmesine rağmen kendiliğinden iyileşen klinik seyir ortaya çıkmaktadır. İmmünitesi sağlam bireylerde KTH spontan olarak 2-5 ay içerisinde nadiren de sekel bırakarak iyileşmektedir. Fakat AIDS, malignite, immün süpresif ilaç kullanımı gibi immünsüprese hastalarda yaygın LAP ve yaşamı tehdit eden klinik tablolar gelişebilir (13, 49).

Atipik form, nöroretinit, uzun süreli ateş, endokardit, ensefalit, Parinaud oküloglandüler sendrom, eklem ağrısı, artrit, sinovit, osteomyelit, pnömoni ve granüloamatöz hepatit olarak ortaya çıkabilir (29, 50). Kedi tırmığı hastalarında nörolojik semptomlar %1-7 arasında görülmektedir (51). Kedi tırmığı hastalığı olgularının %1-2'sinde LAP veya influenza benzeri tabloyu takiben nöroretinit gelişir, ağrısız ve tek taraflı ani görme kaybı ile karakterizedir. Göz dibi muayenesinde papil ödemi gözlenir (30). Nöroretinit immun sistemi sağlam olan bireylerde kendiliğinden iyileşir. Kedi tırmığı hastalarında panüveit optik sinir büyümesi, retinal arter tıkanması, subakut orbital apse ve peripapiller anjioma gibi patolojiler de bildirmiştir (30, 52). Kedi tırmığı hastalığının en önemli ve bazen tek bulgusu olan LAP, lenfoma, tüberküloz, tularemi, veba, sarkoidoz, toksoplazmoz,

histoplazmoz ve sifiliz gibi infeksiyonlarla karışabilmektedir bunun için ayırıcı tanıda dikkat edilmelidir (30, 49). Kedi tırmığı hastalığı kendiliğinden iyileşen bir hastalıktır. *B.henselae*'nin invitro olarak pek çok antibiyotiklere karşı duyarlı olmasına rağmen, antimikrobiklerin kullanımı tedavide yararlı olmamıştır (29, 50).

Oroya Ateşi ve Verruga Peruana (Carrion Hastalığı)

Daniel Carrion isimli tıp öğrencisi 1885 yılında bir hastadan aldığı kan örneğini kendisine inoküle ederek birkaç gün sonra şiddetli anemi ile seyreden hastalık sonucu hayatını kaybetmiş ve hastalık bundan sonra Carrion hastalığı olarak adlandırılmıştır. Etken *B.bacilliformis*'tir. 1995 yılında Alberto tarafından bulunmuştur. Tatarcık ve kemirgenler ile temas, çiftçilik gibi çevre şartlarında çalışan meslekler, evde hayvan beslemek, yaş, endemik bölgeye göç, immünsüpresyon ve hamilelik risk faktörü olarak bildirilmiştir (53, 54).

Carrion hastalığının akut formuna Oroya ateşi ve kronik formuna ise Verruga Peruana olarak isimlendirilmektedir (55). Oroya ateşinin inkübasyon süresi yaklaşık 60 gündür. İştahsızlık, halsizlik, kas ağrısı, baş ağrısı, omurga ve ekstremitelerde eklem ağrısı gibi nonspesifik prodromal belirtiler, titreme ile başlayan hastalık ateş sarılık ve dispne ile hızlı bir klinik kötüleşme olur. Klinikte hemolitik anemi, LAP ve hepatosplenomegali (HSM) eşlik eder. Ağır vakalarda, miyokardit, endokardit, perikardiyal efüzyon, deliryum, konvülsiyon koma, akut solunum sıkıntısı ve multiorgan yetmezliği gelişebilir (47, 53, 56).

Hastalığın Verruga Peruana olarak isimlendirilen kronik döneminde verrugalar ve nodüler anjioproliferatif kutanöz lezyonlar görülür. Lezyonlar visseral ve mukozal olabilir, aylarca kalabilir, fakat prognozu iyidir (57). Verruga Peruanası olan 3 yaşındaki çocukta 2013 yılında etken olarak *B.ancashi* gösterilmiştir (11).

Peliozis

Peliozis, organ parankimine dağılan kistik, içi kan dolu kitleler ile karakterizedir. Peliozis hepatitis, *B.henselae* infeksiyonu ile ilişkilendirilmektedir ve BA'un karaciğer tutulumu olduğu düşünülmektedir. Diğer iç organların parankimal peliozu (dalak, larinks, adrenal bez, kalp, serviks, over, akciğer, pineal bez, koroid pleksus gibi) de bildirilmiştir (58).

Endokardit

B.quintana, *B.henselae*, *B.elizabethae* ve *B.vinsonii*'ye ait iki alt tür (*B.vinsonii subsp. berkhoffii* ve *B.vinsonii subsp. arupensis*) insanlarda endokardit ile ilişkili olarak bulunmuştur (47). *Bartonella* türleri %28 oranında kan kültürü negatif endokarditlerden izole edilmektedir. Bu türler, çoğunlukla *B.quintana* ve *B.henselae*'dir. Ayrıca *B.elizabethae*, *B.vinsonii subsp. Berkhoffii* ve *B.vinsonii subsp. arupensis* olarak bildirilmiştir (18, 29). Altta yatan kardiyak lezyonu olanların *Bartonella* türlerinin oluşturduğu endokardite eğilimi olduğu düşünülmektedir (47, 59).

Basiller Anjiomatoz

Basiller anjiomatoz (BA) ilk olarak 1983 yılında tanımlanmıştır. *B.henselae* ve *B.quintana*'nın neden olduğu yaygın vasküler proliferasyon ile sonuçlanan bir infeksiyondur (58). Özellikle immünsüpresif bireylerde deri, bölgesel lenf nodülleri, kemik, dalak, karaciğer, beyin, akciğer ve bağırsaklar gibi organ ve dokularda anjiogenezi uyatarak BA tablosunun gelişimine neden olmaktadır (49). En sık görülen BA formu kutanöz formdur. Vasküler proliferasyona bağlı olarak gelişen BA, deri ve deri altı dokuda etrafı normal deri renginde veya açık-parlak kırmızı renkte, boyutları milimetreden santimetreye kadar değişen seröz veya kanlı sıvı içeren tek veya çok sayıda nodülle karakterizedir (13). Benzer lezyonlar muköz membranlar ve yumuşak dokularda da görülebilir (30). Yapılan çalışmalarda etkenin AIDS hastalarında CD4 hücre sayıları 100 hücre/mm³' den az olduğunda infeksiyonun

ortaya çıkışı ve yayılmasını uyardığı gözlemlenmiştir (8, 53, 60). BA da kemik tutulumu bulunan olgularda genellikle ağrısız, litik radius ve tibiada yerleşen üzerinde selülit bulunabilen lezyonlar saptanmıştır. Periton ve anüste de benzer lezyonlar tarif edilmiştir (8, 48, 53). Visseral tutulumda basiller hepatik peliyoz veya dissemine vasküler lezyon oluşabilir. Basiller anjiomatozun lezyonları konjunktiva, orbita, kalp, diyafram, biliyer sistem, kaslar, karaciğer, dalak, lenf nodları, genital yol, santral sinir sistemi, solunum yolları ve gastrointestinal sistemin mukozal yüzeyinde de gösterilmiştir (58).

Nedeni Bilinmeyen Ateş

Çoğunlukla iki hafta veya daha fazla süren, hiçbir semptom veya belirti vermeyen klinik bir hastalıktır. Çocuklarda nedeni bilinmeyen ateş etyolojisinde *B.henselae* sıklığı artmaktadır. *B.henselae*'nin neden olduğu KTH'li çocuklar kliniğe nedeni bilinmeyen ve uzun süren ateş sebebiyle başvurmaktadır (61).

Komplikasyonlar

En sık nörolojik ve göz komplikasyonları görülmektedir. Nörolojik komplikasyonlar hastaların %2'sinde meydana gelmektedir. En sık belirti ensefalopatidir. Komplikasyonlar sıklık sırasına göre; ensefalopati, status epileptikus, koma, nöroretinit, asempomatik menenjit, transvers miyelit, radikülitis, serebral arterit, akut hemipleji ve demans görülür (62). Tüm bu nörolojik komplikasyonlar KTH'lerinde %1-2 civarında görülmektedir (63).

1889 yılında ilk kez tanımlanan ateş, bölgesel LAP ve foliküler konjunktivitten oluşan Parinaud oküloglandüler sendrom (POGS) en sık görülen göz komplikasyonudur (64, 65). KTH olan olguların %6'sında POGS görülmüş ve *B.henselae* etken olarak belirlenmiştir (66). Klinik muayenede nekrotik granülom, epitelyumda ülserasyon, preaurikular ve servikal LAP görülür (64).

***Bartonella* Türlerinin Tespiti, İzolasyonu ve Tanımlanması**

Örnek alınması, taşınması ve saklanması

Bartonella türlerinin izolasyonu için genellikle kan ve doku örnekleri alınmaktadır. Bu mikroorganizmanın narin ve hassas olmasından dolayı, örnek alındıktan sonra en kısa zamanda işleme alınmalıdır. Kan örnekleri; sodyum sitrat içeren tüplere veya etilendiamin tetraasetikasit (EDTA) içeren tüplere alınmalıdır. Eğer örneğin saklanması gerekiyorsa, örnekler mutlaka dondurularak (en az -20°C) saklanmalıdır. Örnek mutlaka antibiyotik tedavisi başlanmadan önce alınmalıdır (18, 67).

Morfoloji ve Boyanma Özellikleri

B.henselae, 1-2x0.5-0.6 µm boyutlarında, Gram negatif, hafif kıvrık, pleomorfik, genellikle kokobasil morfolojisinde, flagellasız, mikroaerofilik, fakültatif hücre içi bir bakteridir. Otoaglutinasyon özelliğinden dolayı Gram boyamada bir araya toplanarak kümeler halinde görülmektedir (19, 68).

Kültür

İnsanlarda kültür için dalak, karaciğer, lenf nodu ve deri biyopsi örnekleri kullanılabilir (8). Diğer örneklerle birlikte endotelial hücre kültürünün hem izolasyon oranını arttırdığı hem de izolasyon süresini kısalttığı için oldukça yararlıdır fakat sık kullanılan yöntem değildir (28). *B.henselae*, eritrosit içi yerleşim gösterdiği için kan kültürü yapılabilir. Fakat insanlarda nadiren bakteriyemiye neden olduğu için kandan izolasyonu zordur (30). *Bartonella* türlerinin üretilmesinde agar temelli besiyeri olarak tavşan, at ya da koyun kanı eklenmiş beyin-kalp infüzyon agar, Columbia agar, çukulotamsı agar ve kanlı agar kullanılabilir. Ancak üreme süreleri oldukça uzundur, ilk kültürlerinde 10-12 günde görülürken bazen bu süre 45 güne kadar uzayabilmektedir. *Bartonella* türleri %5 CO₂ ve 37°C'de daha iyi üremektedirler. *B.bacilliformis* ise 30°C'de nemli ortamda daha iyi ürer (8, 69).

Bartonella türlerinin çoğu anaerobik şartlar altında 25°C veya 42°C’de veya hemin ve CO₂ yokluğunda üremez. Ancak *B.bacilliformis* üremek için CO₂’ye ihtiyaç duymaz ve düşük ısıyı (25-28°C) tercih eder (20).

Bartonella türleri kültürde beyaz, büyüklük ve şeklinde çeşitlilik gösteren küçük yapışkan koloniler şeklinde görünmektedir. *B.henselae* kolonileri beyaz, kuru, yapışkan, karnabahar benzeri, agar içine gömülmüş ve morfolojik olarak heterojendir. *B.henselae*, *B.quintana* ve *B.elizabethae*’nın bazı kökenleri büyüme sırasında agar yüzeyinde çukur oluşturabilir. Çok sayıda pasaj ile koloniler daha az kuru, daha az yapışkan, daha geniş ve daha hızlı üremeye eğilimli olmaktadır. *B.elizabethae* kolonileri %5’lik tavşan kanı eklenmiş kalp infüzyon agarda koloni etrafında hafif veya parsiyel hemolizler görülmesinin dışında *B.henselae*’ya benzemektedir (17).

Tanımlama Yöntemleri

Bartonella türlerinin oluşturduğu infeksiyonların tanısı son yıllara kadar klinik bulgular ile konulmuştur. Lenfadenopati ile başvuran hastaların anemnezinde kedi sahibi olmak veya kedilerle temas halinde olup tırmalama ve ısırma takiben gelişen semptomların varlığında *B.henselae*’nın neden olduğu hastalıklar düşünülmelidir (13). *B.henselae*’nın laboratuvar tanısı klinik örnekten bakterinin izolasyonu, genetik materyalin gösterilmesi ve histopatolojik inceleme yöntemiyle direkt olarak veya serumda *B.henselae*’ya karşı özgül antikorların gösterilmesi ile indirekt olarak konulmaktadır (30). *B.henselae*’ya karşı oluşan antikorların saptanması amacıyla sıklıkla ELISA ve “Immunofluorescence Antibody Technique” (IFAT) kullanılmaktadır (13). Genelde *Bartonella* türleri biyokimyasal olarak inerttir ve oksidaz, katalaz, indol, üreaz, dekarboksilaz ve nitrat redüksiyon testlerini içeren rutin biyokimyasal tanımlama testleri ile nonreaktiftir (70, 71).

Moleküler yöntemler, direkt klinik örneklerden hızlı tanı, kültürlerden etkenin tanımlanması ve izolatların tür tayininin yapılması amacıyla kullanılmaktadır. İnsan ve kedilerden izole edilen *Bartonella* şüpheli izolatlarda PCR ile tür tayini

yapılamamaktadır (68, 72). *Bartonella* türlerinin laboratuvar tanıları, kültürlerde üreme sürelerinin uzun olması ve PCR yönteminin ise özel laboratuvar ekipmanı ve şartları gerektirmesi, her laboratuvarda yapılamaması ve deneyimli kişilerin gerekliliği nedeniyle kullanılamamaktadır. Serolojik testler ise uygulaması kolay ve tanıda önerilen yöntemlerdir (73).

KTH lenfadenopatinin histopatolojik incelemesinde, epiteloid, eozinofil ve dev hücrelerin çevrelediği merkezi nekrozlu çok sayıda apselerin görülmesi karakteristiktir. Brown-Hopp doku boyama ve Warthin-Starry gümüş boyama yöntemiyle küçük, kıvrık, çomak şeklinde bakteriler görülebilir (28). Basiller anjiomatozda mikroskopik olarak yeni vasküler proliferasyonların görülmesi tanıda önemlidir. Peliyozda içi kanla dolu lezyonların karaciğer ve dalakta bulunması karakteristiktir (8, 13).

Serolojik yöntemler

Bartonella infeksiyonlarının klinik tanısında seroloji en çok tercih edilen tanı yöntemidir. Kültür ve moleküler yöntemler pahalı zaman alıcı ve belli merkezlerde uygulanabilir olması nedeniyle tercih edilmemektedir. *Bartonella*'ya karşı oluşan antikorların gösterilmesi için sıklıkla IFAT ve EIA yöntemleri kullanılmaktadır (13, 26).

İmmünofluoresans Yöntem

Regnery ve ark. (68) ilk kez 1992 yılında IFA tekniğinin geliştirilmesinde *B.henselae*'yı Vero hücrelerinde ko-kültüre almışlar ve KTH olan hastaların kanlarında %88 oranda tespit etmişlerdir. Bu çalışmada titrenin $\geq 1/64$ olması tanı için anlamlı kabul edilmiştir. *B.henselae* infeksiyonlarının tanısında direkt ve indirekt immünofluoresan yöntemlerinde tanının daha kolay, duyarlılık ve özgüllüğünün yüksek olduğunu belirtmişlerdir (73). Düşük antikor titreleri hastalığın başlangıç dönemlerinde, hastalığın sonunda ya da sadece etkenle karşılaşma durumunda saptanabilir (13, 74). Hastalarda ilk başvuru esnasında çok yüksek düzeyde IgG antikorlarının varlığı, IgG antikorlarının uzun süre yüksek düzeylerde kalabilmesi ve

bazı hastalarda antikor yanıtının gelişmemesi infeksiyonun serolojik tanısını güçleştirebilir (30).

IFA yöntemi (Center for Disease Control, CDC) tarafından BA tanısında önerilmiştir (27, 28). Fakat, serolojik yöntemlerde *Bartonella* türleri arasında çapraz reaksiyonlar olabileceği gibi, *C.burnetti* ve *Chlamydoiphilia* türleri gibi diğer patojenik bakterilerle de çapraz reaksiyonlar oluşabileceği bildirilmiştir (75, 76). *Bartonella* türleri için IFA testinin duyarlılığı %84-88, özgüllüğü %94-96 olarak bildirilmiş, ELISA yönteminde akut infeksiyonda IgM $\geq 1/250$ titreleri için duyarlılığın %83-95, özgüllüğünün ise %95 olduğu belirtilmiştir (74).

Enzim İmmün Ölçüm Yöntemi

EIA testi de KTH'nın tanısında serolojik yöntem olarak değerlendirilmektedir. Solid faz antijeni olarak agarda üretilmiş *B.henselae* bakterilerini kullanarak spesifik IgG, IgM ve IgA'nın tespiti için EIA'yı geliştirmişlerdir (20). Bergmans ve ark. (74) Hollanda'da KTH olanlarda yaptıkları serolojik çalışmada IFA, EIA yöntemini kıyaslamışlar IFA yöntemini istatistiksel olarak daha anlamlı bulmuşlar. *Bartonella* türleri için IFA testinin duyarlılığı %84-88, özgüllüğü %94-96 olarak bildirilmiş, ELISA yönteminin ise IgM $\geq 1/250$ titreleri için duyarlılığının %83-95, özgüllüğünün %95'e ulaştığı belirtilmektedir.

Bartonella sp. türleri ile *Chlamydia trachomatis*, *Coxiella burnetii*, *Rickettsia rickettsii*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Treponema pallidum*, *Francisella tularensis* ve *Mycoplasma pneumoniae* gibi birçok türler arasında çapraz reaksiyonlar tanımlanmıştır (77-81). *Bartonella sp.* IgM antikoru içeren serum örneklerinin akut EBV infeksiyonlarında kapsid antijenlerine karşı çapraz reaksiyonun olduğu gösterilmiştir (82). Graham ve ark. (79) yaptıkları çalışmada *B.henselae* ile en fazla çapraz reaksiyon *C.burnetii* ile olduğunu bulmuşlardır. Yapılan çalışmalarla benzer olarak bulunmuştur.

GEREÇ VE YÖNTEM

Deney Hayvanlarında Antikor Oluşturma

Araştırmanın başlangıcında Pamukkale Üniversitesi Deneysel Araştırma Birimi'nden etik kurul izni alındı (Ek-1). 80 adet 18-22 gr dişi BALB/c fare, ‘‘Saki Yenilli Deney Hayvanları’’ üretim laboratuvarlarından temin edildi. Fareler bir kafeste 6 tane olacak şekilde 12 saat karanlık 12 saat aydınlık ortam sağlanarak, ısıtma ve nemlendirme yapılabilen bir ortamda standart fare yemi ve su ile deney çalışması süresince barındırıldı.

Deney hayvanlarında antikor oluşturmak için Karem ve ark. (83) nın tanımladığı yöntem uygulandı. Araştırmada iki farklı köken *Bartonella henselae* (Houston-1 ATCC 49882, Hıfzısıhha C-48 kökeni) kullanıldı. Bu kökenlerden çalışma grupları oluşturuldu. Her gruba 25’şer tane BALB/c fare alındı. Kafeslere dağıtılan fareler künyelendirildi. *Bartonella henselae* Hıfzısıhha C-48 kökeni Ankara Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezinden Veteriner Hekim Bekir Çelebi’den (Ankara’da 2005 yılında kedilerde tarama amacıyla yapılan çalışmada 8 aylık, dişi sokak kedisinin kanından izole edilmiştir) temin edildi.

Bartonella kökenleri Tip II güvenlik kabini içinde %5 at kanlı agara (Salubris-medica, ABD) ekildi. Ekim yapılan besiyerleri 32°C de %5 CO₂’li ortamda üremesi için inkübasyona bırakıldı. İnkübasyona alınan petri plakları gün aşırı kontrol edilerek üreme takibi yapıldı. Karem ve arkadaşlarının çalışmasında olduğu şekilde ‘‘Brain Heart Infusion’’ (BHI) besiyeri hazırlandı. Üreyen bakteriler Tip II güvenlik kabininde, laminar akım altında, BHI içinde süspanse edildi. Süspanسیون 2500 rpm’de 15 dakika santrifüjlendi. Santrifüj edilen süspanسیونun dip çökeleği alınarak fosfatla tamponlanmış salin (Phosphate-buffered saline, PBS) içinde yeniden re-süspanse edildi. Bu solüsyon yaklaşık 10⁶ koloni (CFU) bakteri içerecek şekilde MacFarland bulanıklık eşeline göre ayarlandı. Bu aşamada elde edilen süspanسیونlar spektrofotometre cihazı (Becton Dickinson, ABD) ile doğrulandı.

Pamukkale Üniversitesi Deneysel Hayvanları Laboratuvarı'nda gruplandırılmış deneysel farelerine maske ile metoksifluran anestezisi (başlangıç konsantrasyonu %4, idame konsantrasyonu %0.5-1 olacak şekilde) uygulandı. PBS ile süspanse edilen solüsyon insülin enjektörlerine çekildi. *Bartonella* kökenleri çekilen enjektörler etiketlendirildi. Her bir gruba farklı köken *B.henselae*, yaklaşık 10^6 koloni oluşturan ünite (CFU/mm³) bakteri içecek şekilde subkutan yol ile 1.5 ml verildi. *Bartonella* kökenleri ve kontrol grupları belirlenerek kafeslere yerleştirildi ve enjeksiyon sonrası BALB/c fareler takibe alındı.

Deneysel hayvanlarına ilk enjeksiyondan 30 ve 60 gün sonra aynı doz (10^6 CFU/mm³) *Bartonella* kökenleri subkutan olarak tekrar verildi. Bu zaman zarfında deneysel hayvanları kontrol altında tutuldu. Çalışma süreci boyunca ölen deneysel hayvanları çalışma dışı bırakıldı. Deneysel hayvanlarında antikor oluşumu varlığını araştırmak için 80. günün sonunda deneysel gruplarından seçilmiş olan farelerden öldürülmeden kan örnekleri alındı. EDTA'lı biyokimya tüplerine yaklaşık 0.4 ml alınan kan örnekleri laboratuvarında 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek serumları ayrıştırıldı. Elde edilen serumlar antikor varlığının araştırılması için IFA yöntemi ile çalışılarak kontrol edildi. IFA ile antikor varlığının saptanmasında, laboratuvarımızda hazırlanarak -70°C'de saklanan *B.henselae* antijeni kaplı teflon lamalar kullanıldı (5). IFA ile antikor varlığının saptanmasından sonra deneysel 90.'cı günde sonlandırıldı.

IFA Yöntemi

Farelerden alınan serum örneklerine Regnery ve ark. (27) nin oluşturduğu protokol uygulandı.

- Fosfat tamponlu tuzlu su (PBS), yağı alınmış süt tozu ve tween 20 kullanılarak, yağı alınmış süt tozunun %5'lik çalışma dilüsyonu hazırlandı.
- Serum örnekleri 1/64 dilüe edildi (dilüsyon %5'lik yağsız süt tozu ile sağlandı).

- Dilüe edilen serum örnekleri pipet yardımıyla 25'şer µl alınarak teflon kaplı lamlar üzerindeki kuyucuklara konuldu.
- Karanlık ve nemli ortamda 37 °C'de 30 dakika inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyon sonrası lamlar tween 20 içeren PBS ile beş dakika yıkamaya bırakıldı.
- Lamlar hava akımı yardımıyla kurutuldu. Anti-human IgG konjugatından (Chemicon 101.387, ABD) her bir kuyucuğa 20'şer µl konuldu.
- Karanlık ve nemli ortamda 37 °C'de 30 dakika inkübasyona bırakıldı.
- Lamlar (10 damla Ewans blue ve PBS tween 20 içeren) şalede beş dakika yıkanmaya bırakıldı.
- Lamlar hava akımı yardımıyla kurutuldu.
- Her bir kuyucuğa 10 µl tamponlu gliserol konuldu. Hava kabarcığı kalmayacak şekilde lamel ile kapatıldı ve değerlendirildi (27).

Deney sonunda deney farelerine anestezi (metoksifluran başlangıç konsantrasyonu %4, idame konsantrasyonu %0.5-1 olacak şekilde) uygulayarak insülin enjektörleri ile kardiyak kanları alındı. Alınan kan örnekleri laboratuvarında 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek serumları ayrıştırıldı. Ayrılan serumlar 2 mm'lik steril eppendorf tüplerine alınarak serum örnekleri ELISA testi çalışılana kadar -70°C'da saklandı. Ötenazi yapılan fareler kişisel önlemler alındıktan sonra kırmızı poşetlere konuldu ve prosedüre uygun şekilde imha edildi.

ELISA TEST PLAKLARININ HAZIRLANMASI

Mikrotitrasyon plaklarına antijenlerin kaplanması Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda yapıldı. Araştırmaya alınan kökenler Tip II güvenlik kabini içinde *Bartonella* kökenleri %5 at kanlı agara ekildi. Ekim yapılan besiyerleri 32°C de %5 CO₂'li ortamda inkübasyona bırakıldı. Besiyerleri gün aşırı kontrol edilerek iki haftalık süre ile koloni üremeleri belirlendi. Yaklaşık sekiz günlük inkübasyonun sonrasında üreyen bakteriler Tip II güvenlik kabini içinde steril öze yardımı ile 4 ml PBS içeren steril tüplere aktarıldı. Bu

süspansiyondan Gram boyama ve “Acridine Orange” boyaması ile bakteri görünümü yapılarak koloni saflığı onaylandı.

Süspansiyon halindeki steril *B.henselae* bakterileri, 56°C’de 30 dakika su banyosunda bekletilerek inaktive edildi (5). İnaktive edilen kökenler 4100 rpm’de 10 dakika santrifüj edilerek süpernatant 2 ml’lik kısım steril pipet yardımıyla dışarı atıldı. Dipte kalan çökelti kısmı vorteks ile homojenize edildi. Homojenize edilen *B.henselae* Houston-1 (ATCC 49882) ve *B.henselae* Hıfzısıhha C-48 kökeni sırasıyla farklı her kuyucuğa iki farklı markada mikrotitrasyon plağının 15’şer kuyucuğuna 150 µl aktarıldı. Mikrotitrasyon plakları +4°C sıcaklıkta bir gün inkübasyona bırakıldı. Bir günlük inkübasyon sonrasında plaktaki kuyucuktaki sıvı lavaboda ters çevrilerek döküldü. Taze olacak şekilde yağsız süt tozu, PBS ile %3’ lük olacak şekilde hazırlanarak 150 µl olarak kuyucuklara dağıtıldı. Bu işlemden sonra plaklar 1 saat 37°C de etüvde bekletildi. İnkübasyondan sonra mikrotitrasyon plakları üç defa PBST (PBS + %0.05 Tween 20) ile yıkandı. IFA testi ile pozitif bulunan deney serumları mikrotitrasyon plaklarının testinde kullanıldı. Bu aşamada iki farklı plak arasında yüksek absorbanans gösteren mikrotitrasyon plağı markasının seçimi yapıldı. Test için düz taban Sarstedt (83.1835, ABD) marka mikrotitrasyon plağı kabul edildi. Araştırmaya alınacak denek fare serumlarında antikor varlığı ELISA yöntemi ile aşağıda gösterilen şekilde çalışıldı. Her grubun çalışması farklı günlerde yapıldı.

ELISA Yöntemi

Çalışma gününde serum örnekleri -70°C den çıkartılarak oda ısısında bekletildi ve çalışmaya hazır hale getirildi.

- *Bartonella* kökenleri ile antikor oluşturulan BALB/c fare serumları PBST ile 1/50 oranında dilüe edildi.
- Her bir serum örneği üç farklı kuyucukta çalışıldı.
- Dilüe edilen serum örnekleri kuyucuklara 150 µl olacak şekilde dağıtıldı.
- Negatif kontrol için üç kuyucuğa 150 µl PBS dağıtıldı.
- Mikrotitrasyon plağı iki saat 37°C de inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyondan sonrasında kuyucuklar üçer defa PBST ile yıkandı.

- Sekonder konjugat (Promega, ABD “anti-Mouse IgG-horseradish peroksidaz”) kuyucuklara 100 µl ilave edildi.
- Mikrotitrasyon plakları bir saat 37°C de inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyon sonrasında kuyucuklar üçer defa PBST ile yıkandı.
- Kuyucuklara 100 µl 2,2-azino-di-3-ethylbenzthiazoline (Sigma A3219, ABD) ilave edildi.
- Plaklar 30 dakika içerisinde 405/nm filtre ile ELISA okuyucuda değerlendirildi (83).

Her bir *B.henselae* kökenleri ve kontrol grubu BALB/c farelerden elde edilen serumlar için yukarıdaki ELISA çalışma protokolü ayrı ayrı tekrar edildi. Kontrol grubunda bulunan fareler için mikrotitrasyon plaklarına dağıtılan serum örneklerinde diğer gruplardan farklı olarak pozitif kontrol serumu ilave edildi. Pozitif kontrol için; BALB/c farelerde *B.henselae* ATCC 49882 ile antikor oluşturulmuş olan serum örneği kullanıldı. Aynı şekilde üç farklı kuyucukta çalışıldı.

ÇAPRAZ REAKSİYONLARIN İNCELENMESİ

Bu aşama için Pamukkale Üniversitesi Tıbbi Etik Kurulu’ndan etik kurul izni alınmıştır (Ek-2). Araştırma süresince Pamukkale Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkez Laboratuvarında EBV (n=11), CMV (n=11), *T.gondii* (n=11) antikorları ELISA yöntemiyle saptanmış olan insan serum örnekleri çalışmaya alındı. Her serum örneğinde (yukarıda anlatılan yöntemle hazırlanan mikrotitrasyon plaklarında) hem *B.henselae* ATCC 49882 hem de *B.henselae* Hıfzısıhha C-48 kökenine karşı antikor varlığı araştırıldı. Çalışma anına kadar -70°C de saklanan serum örnekleri çıkartıldı ve oda ısısında çalışmaya hazır hale getirildi. Yukardaki anlatılan yöntemden farklı olarak “anti-Mouse IgG-horseradish peroksidaz” yerine “goat anti-Human IgG-horseradish peroksidaz”(Promega 25.743, ABD) kullanıldı.

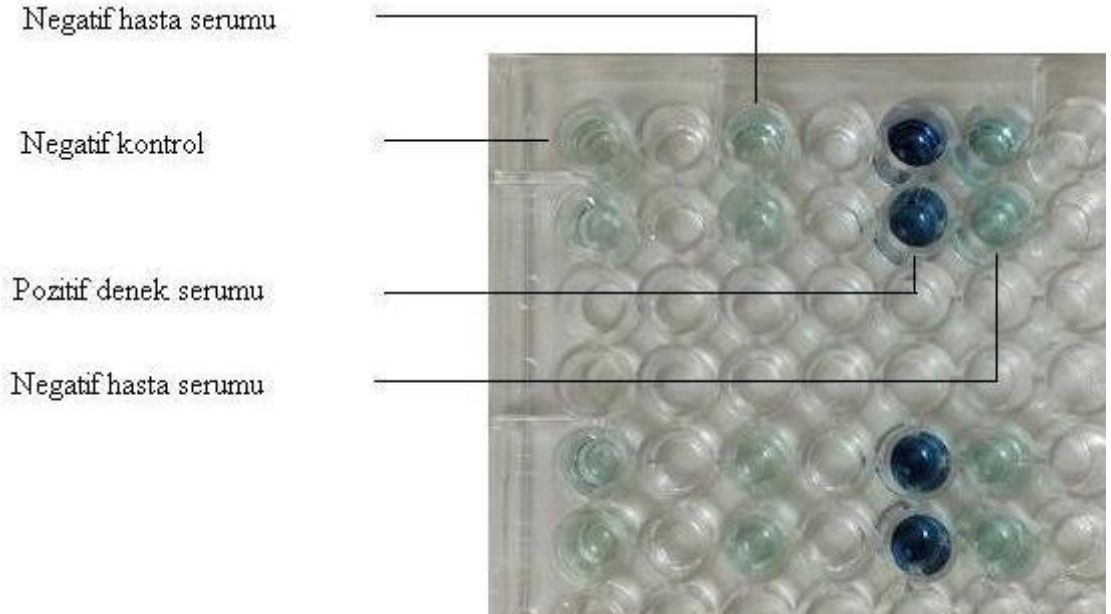
İSTATİSTİKSEL ANALİZ

İstatistiksel analizlerde gruplandırılmış veriler için Mann-Whitney U testleri kullanıldı. Test değerlerinin karşılaştırılmasında Cohen'in kapa (κ) yöntemi kullanıldı. Değerlendirme Minitab 16.0 (Minitab in, ABD) programı ile Ki-kare yapıldı. İstatistiksel hata payı (p) 0.05 olarak alındı. Farklı *B.henselae* ile kaplanan mikrotitrasyon plaklarında insan CMV, EBV ve *T.gondii* infeksiyonlarına karşı gelişen antikorların çapraz reaksiyonlarının değerlendirilmesinde istatistik test olarak Cohen'in kappa (κ) katsayısı SPSS ver 16.0 bilgisayar programı ile hesaplandı.

BULGULAR

Hayvan Deneyi Laboratuvarında BALB/c farelerine *B.henselae* ATCC 49882 ve *B.henselae* Hıfzısıhha C-48 kökeni gruplara ayrılıp subkutan yolla verilerek antikor oluşturuldu. *B.henselae* ATCC 49882 kökeni verilen 18 denekten 4'ü (%22.2) takipleri esnasında, 3'ü (%16.7) 90. gün sonunda anestezi uygulanma esnasında öldü. *B.henselae* Hıfzısıhha C-48 kökeni verilen 19 denekten 4'ü (%21.1) takipleri esnasında, 4'ü (%21.1) 90. gün sonunda anestezi uygulanma esnasında öldü. Ölen fareler çalışma dışında bırakıldı. Üç grubun her birinde 11 fare olmak üzere serumlar alındı ve çalışmaya dahil edildi.

Bu çalışmada kullanılacak mikrotitrasyon plağı belirlenmesi amacıyla yönelik olarak ön çalışma yapıldı. İki farklı marka mikrotitrasyon plağı *B.henselae* kökenleri ile kaplandı. Çalışma gününde denek fare serumu, *B.henselae* pozitif insan serumu ve negatif kontrol (PBS) yukarıdaki "in-house" ELISA yöntemine uyularak çalışıldı ve veriler bilgisayara aktarılarak analize alındı. Elde edilen veriler sonucunda çalışmanın devamı için düz taban Sarstedt (ABD, No:83.1835) marka mikrotitrasyon plağı seçildi (Şekil 1).



Şekil 1. Araştırma için seçilen mikrotitrasyon plak görüntüsü

Çalışmaya alınan birinci grup BALB/c farelerine subkutan yol ile *B.henselae*'nin ATCC 49882 kökeni verilerek antikor oluşturuldu. “in-house” ELISA yöntemi ile bu grupta negatif kontrol 0.15 (± 0.01) olarak bulundu. Bu iki farklı *B.henselae* antijeni ile kaplı mikrotitrasyon plaklarının “in-house” ELISA yönteminin sonuçları karşılaştırıldığında *B.henselae*'nin ATCC 49882 kökeni antijeni ile kaplı kuyucukların ELISA sonuçları, *B.henselae* Hıfzısıhha C-48 kökeni antijeni ile kaplı olan kuyucuklardan daha yüksek olarak saptandı (Tablo 1; $p < 0.05$).

Tablo 1. Grup 1 (n=11) serumlarının farklı antijen plaklarına göre absorbands verileri

	<i>B.henselae</i> 'nin ATCC kökeni ile kaplı plak	<i>B.henselae</i> 'nin C-48 kökeni ile kaplı plak
Ortalama	1.05	0.68
Standart sapma	0.32	0.19
Minimum	0.51	0.38
Maksimum	1.56	1.03

Çalışmaya alınan ikinci grup BALB/c farelerine *B.henselae*'nin Hıfzısıhha C-48 kökeni verilerek antikor oluşturuldu. Bu grupta negatif kontrol 0.15 (± 0.01) olarak bulundu. Bu iki farklı *B.henselae* antijeni ile kaplı mikrotitrasyon plaklarının “in-house” ELISA yönteminin sonuçları karşılaştırıldığında *B.henselae*'nin ATCC 49882 kökeni antijeni ile kaplı kuyucukların ELISA sonuçları, *B.henselae* Hıfzısıhha C-48 kökeni antijeni ile kaplı olan kuyucuklar arasında fark saptanmadı (Tablo 2; $p > 0.05$).

Tablo 2. Grup 2 (n=11) serumlarının farklı antijen plaklarına göre absorbands verileri

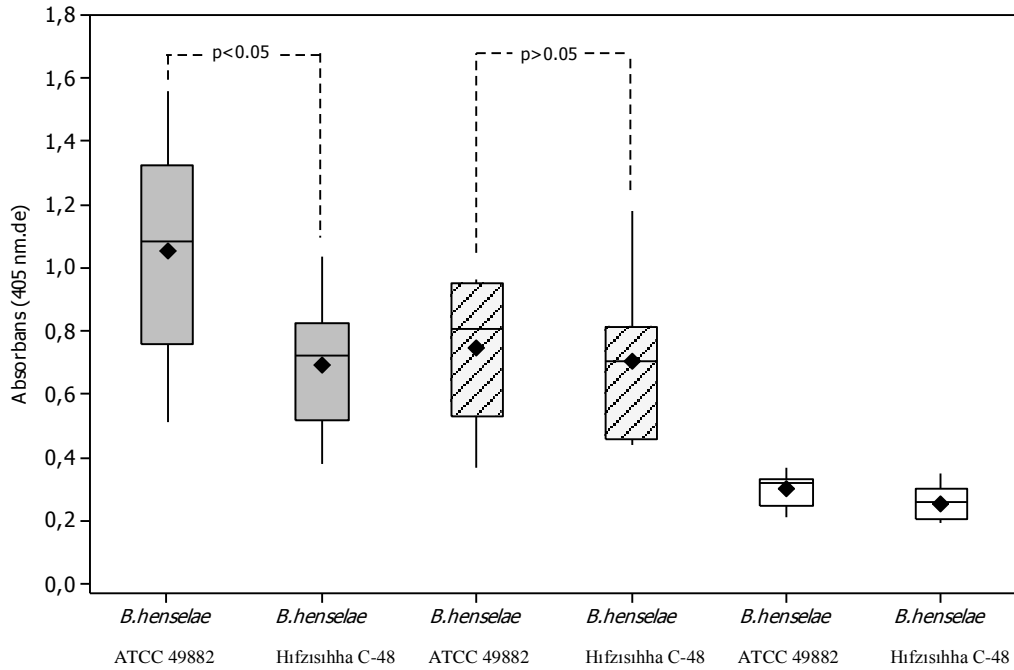
	<i>B.henselae</i> 'nin ATCC kökeni ile kaplı plak	<i>B.henselae</i> 'nin C-48 kökeni ile kaplı plak
Ortalama	0.74	0.70
Standart sapma	0.23	0.24
Minimum	0.37	0.44
Maksimum	0.96	1.18

Çalışmaya alınan üçüncü grup kontrol grubudur. Herhangi bir işlem yapılmadan takip edildi. Bu grupta negatif kontrol 0.16 (± 0.04) ve pozitif kontrol 1.05 (± 0.04) olarak bulundu. Bu iki farklı *B.henselae* antijeni ile kaplı mikrotitrasyon plaklarının “in-house” ELISA yönteminin sonuçları tablo 3 de gösterilmiştir (Tablo 3).

Tablo 3. Grup 3 (n=11) serumlarının farklı antijen plaklarına göre absorbanans verileri

	<i>B.henselae</i> 'nin ATCC kökeni ile kaplı plak	<i>B.henselae</i> 'nin C-48 kökeni ile kaplı plak
Ortalama	0.29	0.25
Standart sapma	0.05	0.04
Minimum	0.21	0.19
Maksimum	0.37	0.35

Araştırmaya alınan her iki grup ve kontrol grubu verilerinin karşılaştırmalı sunumu Şekil 2'dedir.



Şekil 2. Farklı *B.henselae* kökenleri ile oluşturulan denek gruplarında antikor ölçümleri (ara çizgi: ortalama; siyah kare: ortanca)

Araştırmanın son aşamasında insan seropozitif CMV, EBV ve *T.gondii* serumlarının farklı *B.henselae* kökenleri ile verdiği “çapraz” reaksiyon varlığı araştırıldı. *B.henselae* ATCC 49882 antijeni ile kaplı “in-house” ELISA yönteminde EBV pozitif hasta serumlarının 2’sinde (%18.18), CMV hasta serumlarının 2’sinde (%18.18) yüksek absorbands değerleri alınırken, *T.gondii* hasta serumlarında ise negatif kontrole göre yüksek değerler elde edilmedi. *B.henselae* Hıfzısıhha C-48 antijeni ile kaplı “in-house” ELISA yönteminde EBV pozitif hasta serumlarının 2’sinde (%18.18), CMV hasta serumlarının 1’inde (%9.09) yüksek absorbands değerleri alınırken, *T.gondii* hasta serumlarında negatif kontrole göre yüksek değerler elde edilmedi.

Tablo 4. İnsan EBV, CMV ve *T.gondii* antikorlarının “in-house” ELISA plaklarında verdikleri reaksiyonların karşılaştırılması

	Sayı	<i>B.henselae</i> ATCC kökeni ile yüksek absorbands		<i>B.henselae</i> C-48 kökeni ile yüksek absorbands		Cohen κ katsayısı
		n	%	n	%	
EBV antikorları	11	2	18.18	2	18.18	1.00
CMV antikorları	11	2	18.18	1	9.09	0.62
<i>T.gondii</i> antikorları	11	0	0.0	0	0.0	1.00

TARTIŞMA

Bartonella infeksiyonları dünyada oldukça yaygın görülen ve tanısında serolojik yöntemlerin sıklıkla kullanıldığı zoonotik hastalıklardandır. Özellikle HIV pozitif gibi immünsüprese kişilerde ciddi infeksiyonlara neden olmaktadır. CDC, KTH için IFA yöntemini tanıda önermektedir. Ancak IFA yönteminin her laboratuvarda yapılamaması, değerlendirmenin kişiye göre değişebilmesi ve deneyimli kişilere ihtiyaç duyulmasından dolayı IFA yerine ELISA yöntemi kullanılabilir. “In-house” ELISA testlerinin hazırlanmasında önemli bir basamak mikrotitrasyon plaklarının seçimidir. Mikrotitrasyon plakları farklı firmalar tarafından üretilmektedir ve üretilen malzemenin yapısına bağlı olarak farklı sonuçlar elde edilmektedir (84). Bu nedenle araştırmada hazırlanması planlanan mikrotitrasyon plaklarının yeterli antijen bağlanmasını sağlayan plak olması gerekliliği vardır. Mikrotitrasyon plağının taban yüzeyine antijenin kaplanması veya kuyucuğa farklı yapıdaki boncuklara bağlanmış antijenlerin ilavesi ELISA testlerinde kullanılan yöntemlerdir. Polistren boncuklar daha geniş yüzey elde edilmesinde, manyetik boncuklar mRNA ve saflaştırılmış proteinlere yüksek afiniteleri dolayısıyla seçilmektedir. Poliviniliden diflorid ve nitroselüloz proteinler için, naylon materyal nükleik asitler için tercih edilir. Membranöz ve immunoblotting tabanlı ELISA yöntemine dayalı ortamlarda yüzey alanları plastik olanlardan 100-1000 kat daha fazladır. Naylon membranlar proteinlerin nonspesifik bağlanmalarına yüksek eğilim gösterirler. Bu nedenle büyük yüzey alanına sahip olarak desorpsiyon ve “background” sorunları kantitatif deneylerde kullanımını engeller. Mikrotitrasyon plakları için en yaygın kullanılan materyal polistirendir. Polistiren nispeten daha düz bir yüzeye sahiptir, hidrofobik ve nontoksijendir. Düşük “background” aktiviteye sahiptir (85). Sunulan araştırmanın ilk aşamasında iki farklı üretim polistren mikrotitrasyon plağı kullanılarak yüksek bağlanmanın gösterildiği plak seçilmiştir. Ulaşılabilen literatürde *Bartonella* bakterilerinin ELISA plakları hazırlanmasına yönelik plak seçimi ile ilgili veri bulunamamıştır.

B.henselae bakterileri farklı yöntemler ile inaktive edilebilmektedir. Bu yöntemlerden en çok sonikasyon (620 nm ses dalgası), irradyasyon (5 ± 10^5 rads) veya

56°C'de 30 dakika bekletilerek *B.henselae* antijeninin inaktivasyonu sağlanmaktadır (5, 83, 74). Farklı yöntemler ile inaktivasyonun *Bartonella* bakterilerinin antijenik yapısına etkisi ile veri ulaşılabilen literatürde saptanamamıştır. Çalışmamızda *B.henselae* bakterileri için 56°C'de de 30 dakika bekletilerek inaktivasyon sağlanmıştır.

Karem ve ark. (83) Atlanta'da yaptıkları çalışmada 10^4 CFU/ml *B.henselae* ATCC 48992 kökenini intravasküler (IV), subkutan (SK) ve oral olarak farelere verilmiştir. ELISA ile *B.henselae* IgG düzeyleri incelenmiştir. Enfeksiyonun 13. gününden 42. gününe kadar tüm gruplarda *B.henselae* spesifik IgG artışı gözlenmiştir. İkinci doz olarak 50. günde verilen 10^4 CFU *B.henselae* düzeyleri IV ve SK olarak verilenlerde 70. günde pik yapmıştır. Oral olarak verilen farelerde ise 70. günde artış gözlenmemiştir. SK olarak verilen inaktif *B.henselae* veya SK, oral ve IV olarak 3×10^6 CFU *B.henselae* tek doz verilmiştir. Deneyin 21. gününde tüm gruplarda *B.henselae* IgG titreleri belirginleşmiş ve 42. günde ise *B.henselae* IgG titrelerinin en üst seviyeye ulaştığı görülmüştür. Deneyin 52. gününden sonra ise *B.henselae* IgG titreleri düşmeye başlamış ve 81. günde *B.henselae* IgG titreleri kontrol grubunun *B.henselae* IgG titreleri seviyelerine indiği görülmüştür. Karem ve ark.'nın bu araştırmasında *B.henselae*'nin serum antikor düzeylerinin en yüksek IV ve SK enjeksiyon yolu ile elde edildiği sonucuna varılmıştır. Antikor oluşumu başarısında IV enjeksiyonun SK metoda üstün olmaması ve IV uygulamanın zor olması nedeniyle, sunulan çalışmada SK metodoloji tercih edilmiştir. Karem ve ark.'nın (83) araştırmasında *B.henselae* IgG antikorlarının 30. ve 40. günler arasında en üst seviyeye ulaştıkları görülmüştür. Bu sürenin devamında antikor titrelerinin düştüğünü gözlemlemişlerdir. Bu süreden sonra ardışık antijenik uyarılara ihtiyaç duyulmuştur. Çalışmada 90. gün sonunda *B.henselae* IgG seviyeleri istenilen düzeylere ulaşmaktadır. Bu verilere göre, çalışmamızda denek farelerinde antikor titrelerinin yüksek olması için 30'ar gün ara ile üç defa aynı dozda *B.henselae* SK enjeksiyon ile deneklere verilmiş ve deney 90 gün sonra sonlandırılmıştır. Deneysel olarak yapılan farklı çalışmalarda da benzer antikor kinetiğine ulaşılmıştır. Araştırmalarda antijenik uyarının birden çok uygulandığı görülmektedir (86).

Kültürlerde üreme sürelerinin uzun olması, PCR yönteminin özel laboratuvar ekipmanı ve şartları gerektirmesi nedeniyle *Bartonella* tanısında bu yöntemler tercih edilmemektedir. Hastalarda kanıtlanmış *Bartonella* kökenlerinin neden olduğu infeksiyonlarda PCR ile yanlış negatif sonuçlar alınabilmektedir. Bunun nedenleri örnek alımının gecikmesi, DNA izolasyonunun azlığı veya yöntemin sensitivite sınırlılığı olabilmektedir (84). Serolojik testler ise uygulaması kolay, sıklıkla tanıda kullanılan, standardize olabilen yöntemlerdir (73). Ülkemizde daha önce *Bartonella* kökenleri ile ELISA testi uygulaması yoktur. ELISA yönteminin en öne çıkan avantajları; IFA ve moleküler yöntemlere göre daha ucuz, hızlı ve kolay yapıyor olması ile teknisyen faktörünün otomatize yöntemler ile dışlanabilmesidir (87).

Dünyada ve ülkemizde bugüne kadar birçok mikroorganizmaya karşı serolojik çalışmada “in-house” ELISA yöntemi kullanılmıştır. Vermeulen ve ark. (88) tarafından yapılan bir çalışmada *B.henselae* antijeni ile “in-house” ELISA ve “in-house” IFA yöntemleri geliştirilerek bu iki yöntem (*B.henselae* IgM ve *B.henselae* IgG seviyelerini) karşılaştırılmıştır. Herremans ve ark. (89) tarafından 2009 yılında yaptıkları araştırmalarında *B.henselae*'ya karşı gelişen IgM seviyelerini “in-house” ELISA yöntemi ile değerlendirmişlerdir. Giladi ve ark. (90) 2001 yılında yaptıkları çalışmada *Bartonella* kökenleri kullanılarak yapılan “in-house” ELISA yöntemi ile bazı mikroorganizmalarla çapraz reaksiyonlarını (EBV, CMV ve *T.gondii*) araştırmışlardır. Vermeulen ve ark. (80) Hollanda'da 2010 yılında yaptıkları çalışmada *B.henselae* antijeni ile “in-house” IFA ve “in-house” ELISA yöntemleri ile bazı mikroorganizmalarla (EBV, CMV, *T.gondii*, *C.burnetii*, *Chlamydophila pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*) çapraz reaksiyonların varlığını araştırmışlardır. Ülkemizde yapılan çalışmalarda ise farklı mikroorganizmalar kullanılarak “in-house” ELISA yöntemi uygulanmıştır. Kaya ve ark. (91) toksokariasisli hastalarda otoantikör varlığının araştırılmasında *Toxocara* larvalarını çeşitli işlemlere tabi tutarak *Toxocara* ES (Excretory-Secretory) antijenlerini filtreden süzme yoluyla “in-house” ELISA oluşturularak çalışılmıştır. Çelebi ve ark. (92) 2013 yılında yaptıkları çalışmada *Francisella tularensis* tanısında kullanılan mikroaglutinasyon testindeki (MA) reaksiyonun daha iyi görünmesi ve sonucun daha kolay değerlendirilmesi için *F.tularensis* antijenlerini kullanmışlardır. Çöplü ve ark.

(93) ise 2005 yılında yaptıkları çalışmada boğmaca seroepidemiolojik çalışmalarında “in-house” ELISA plaklarını oluşturmuşlar ve bu “in-house” ELISA ile standart ELISA kitini karşılaştırmışlar. Yapılan “in-house” ELISA yöntemi güvenilir olarak bulunmuştur. Yapılan bu çalışmalar oluşturulan “in-house” ELISA yönteminin mikroorganizmaların tanımlanmasında kullanılabilirliğini göstermektedir. Araştırmamızda iki farklı *B.henselae* antijeni (*B.henselae* ATCC 49882 ve *B.henselae* Hıfzısıhha C-48) kullanılarak *Bartonella* infeksiyonlarının tanısında “in-house” ELISA yönteminin kullanılabilirliğini göstermek amaçlanmıştır. *Bartonella* infeksiyonları tanısında “in-house” ELISA testinin hazırlanarak geliştirilmesi, hastalığın hekimler arasında farkındalığının artması, tanısal yöntemin daha ekonomik ve yaygın kullanılabilmesi açısından yararlı olacaktır.

Yabani hayvanlar *Bartonella* türleri için rezervuar olabilmekte ve hastalık hayvanlardan direkt veya vektörler yoluyla insanlara bulaşabilmektedir. Doğada yaşam ve aktivasyon bartonelloz yönünden risk oluşturabilmektedir. Kedilerde *B. henselae* seropozitifliğinin ılıman ve nemli bölgelerde yüksek, soğuk ve kurak bölgelerde düşük olduğu görülmektedir. Bu da ılıman iklimlerde kedi pirelerinin artan çoğalmalarından kaynaklanmaktadır. Buna bağlı olarak nemli, ılıman iklim şartlarında kedi pireleri kedilerde yoğun enfestasyon oluşturmakta ve *B. henselae* prevalansı yüksek olmaktadır. Çok sıcak veya çok soğuk bölgelerde ise *B. henselae* prevalansı düşüktür (94, 95). Bölgemizdeki yapılan araştırmalarda Denizli kuzey kırsal bölgesinde *B.henselae* seropozitifliği %44.0, veteriner ve hayvancılık yapanlarda %29.6 olarak gösterilmiştir (6, 96). Bölgemizde kan donörlerinde *B. henselae* IgG seropozitifliği %6.0 olarak saptanmıştır. (5, 6). Normal populasyonda *B.henselae* IgG pozitifliği görülebilmektedir. Bunun nedeni toplumun yaşam özelliklerine bağlı olarak *B.henselae*'ya maruz kalmasına bağlı olabilmektedir (74, 97). Çoğunlukla sağlıklı bireylerde subklinik tablolara neden olan *B.henselae*, immün süprese ve organ transplantasyonu olan hastalarda ciddi klinik tablolar oluşturabilmektedir. Yapılan çalışmalar karaciğer ve böbrek gibi organ nakillerinde hastaların bartonelloz açısından da değerlendirilmesini desteklemektedir. Bölgemizde böbrek alıcılarında yapılan araştırmada 59 hastanın serum ve plazma örneklerinde “in-house” IFA yöntemi ile *B.henselae* antikor pozitifliği sırasıyla %16.9 ve %6.8 oranında tespit edilmiştir (98). Tüberküloz ve malignensi gibi immün

süpresif hastalarda görülebilecek *Bartonella* infeksiyonlarının düşünülmediği için ya da yanlış tanımlandığı için yanlış tanı ile tedaviye alındıkları ileri sürülmektedir (99). Ülkemizde bölgemiz dışında insan bartonellozu verileri Denizli ile benzer iklim ve coğrafya özellikleri gösteren Aydın ilinde yapılmıştır (6, 100). Aksoy ve ark. (100) yaptıkları tez araştırmasında Aydın'ın merkez ve ilçelerinde *B.henselae* seroprevalansı % 6.1, *B.quintana* seroprevalansı %2.0 olarak bulunmuştur.

Bu veriler ile karşılaştırıldığında bölgemizde *Bartonella* türlerine karşı seroprevalans oranları yüksektir. Hipotetik olarak bölgemizde saptanan seroprevalans pozitiflik oranına göz önüne alındığında sağlık kurumuna başvuran hastalarda *Bartonella* infeksiyonunun tanınmadığı/düşünülmediği öne sürülebilir. Buna bir çözüm olarak *Bartonella* infeksiyonlarının tanısına yönelik hızlı ve ucuz yöntemler yaygınlaştırılmalıdır.

Lappin ve ark. (101) tarafından 2008 yılında yapılan çalışmada ateşi olan ve ateşi olmayan (kontrol grubu) 81'er kedide PCR ve ELISA yöntemlerini karşılaştırılmış. Ateşi olan kedilerin 8'inde, kontrol grubundaki kedilerin ise 5'inde ELISA ve PCR yönteminin her ikisinde de *Bartonella sp.* pozitif bulunmuştur. Ateşi olan grubun 21 tanesinde kontrol grubunun ise 34 tanesinde *Bartonella sp.* ELISA yöntemi ile pozitif ve PCR yöntemi ile negatif bulunmuştur. Ateşi olan grubun 6'sında kontrol grubunun ise birinde *Bartonella sp.* ELISA yöntemi ile negatif ve PCR yöntemi ile pozitif bulunmuştur. Ateşi olan grubun 46'sında kontrol grubunun ise 41'inde *Bartonella sp.* hem ELISA yönteminde hem de PCR yönteminde negatif bulunmuştur. Sunulan araştırma Lappin ve ark.'nın yaptığı araştırmadan farklı olarak Balb/c farelerinde yapılmıştır. Deneklere subkutan olarak farklı *B.henselae* kökenleri uygulanmış, Karem ve ark. yaptıkları çalışma referans alınarak 90. gününü tamamlayan farelerden alınan serum örnekleri *B.henselae* kökenlerine karşı oluşan antikorlar "in-house" ELISA yöntemi ile değerlendirilmiştir. Deneklerde ateş kontrollü yapılmamıştır.

Sunulan çalışmada iki farklı *B.henselae* kökenleri ile oluşturulan infeksiyonlarda antikor düzeylerinin ölçümlerinde farklı veriler elde edildiği

görülmektedir (Şekil 2). *B.henselae* ATCC 49882 antijeni ile kaplı “in-house” ELISA yönteminde antikor seviyeleri, aynı köken ile enfekte edilen grupta *B.henselae* Hıfzısıhha C-48 antijeni ile kaplı “in-house” ELISA yöntemindeki antikor seviyelerine göre daha yüksek saptanmışlar ($p<0.05$). Bu iki köken arasındaki farkın nedenleri olarak, iki farklı *B.henselae* kökeninin antikor cevabı oluşturan antijenik yapılarının farklı olabileceği, mikrotitrasyon plaklarında kaplanan *B.henselae*'nin antijenik epitoplarında değişkenlikler ve bu değişkenlikler nedeniyle aktivite kaybına bağlı farklı ölçüm değerleri elde edildiği ön görülebilir.

B.henselae ile yapılan IgM ölçüm testlerinde farklı *Bartonella* genotiplerinin bölgesel dağılımlara bağlı olarak farklı sonuçlara neden olabileceği bildirilmiştir. Almanya'daki KTH tanılı hastalarda yapılan bir araştırmada hem *Bartonella* genotip I (serotip Houston I) hem de *Bartonella* genotip II (serotip Marseilles II) kökenleri ile oluşan infeksiyonların serolojik değerlendirmelerinde farklılıkların görüldüğü rapor edilmiştir (74).

Vermeulen ve ark. (88) Hollanda'da 2007 yılında yaptıkları çalışmada PCR sonuçları ve klinik bilgilere göre hastaları KTH ve kontrol gruplarına ayırmışlardır. KTH grubunda 51, kontrol grubunda 56 kişi bulunmaktadır. IFA ile KTH grubundaki hastalardan 3'ünde IgM pozitifliği saptanmıştır. Kontrol grubunun hepsi negatif bulunmuştur. IFA testinin sensitivitesi %6, spesifitesi %100 olarak belirlenmiştir. In-house IFA ile KTH grubundaki hastalardan 27'sinde, kontrol grubunda ise 4 hastada IgM pozitif olarak ölçülmüştür. In-house IFA IgM testinin sensitivitesi %53, spesifitesi %93 olarak belirlenmiştir. In-house IFA ile KTH grubundaki hastalardan 34'ünde, kontrol grubunda ise 10 hastada IgG pozitif olarak ölçülmüştür. In-house IFA IgG testinin sensitivitesi %67, spesifitesi %82 olarak belirlenmiştir. IgG ve IgM birlikteindeki “in-house” IFA yönteminde ise sensitivitesi %86, spesifitesi %77 olarak gözlemlenmiştir. In-house ELISA ile KTH grubundaki hastalardan 33'ünde, kontrol grubunda ise 5 hastada IgM pozitif bulunmuştur. In-house ELISA IgM testinin sensitivitesi %65, spesifitesi %91 olarak belirlenmiştir. In-house ELISA ile KTH grubundaki hastalardan 14'ünde, kontrol grubunda ise 5 hastada IgG pozitifliği görülmüştür. In-house ELISA IgG testinin sensitivitesi %28, spesifitesi %91 olarak

belirlenmiştir. Ayrıca hastalardan iki hafta aralıklarla kan örnekleri alınmış IFA ve ELISA yöntemiyle çalışılmıştır. IFA yönteminde *B.henselae* IgM düzeylerinin ortalama 6-8 haftadan sonra düştüğü gözlemlenmiştir. *B.henselae* IgG seviyeleri ise 6-8 haftada pik yaptığı görülmüştür. ELISA yönteminde ise *B.henselae* IgG testinin sensitivitesi düşük olmasından dolayı sonuçlar açıklanamamıştır. *B.henselae* IgM ELISA ve IFA yöntemleri sonuçları arasında %86 uyumluluk bulunurken *B.henselae* IgG ELISA ve IFA yöntemleri arasında ise bu oran %67 bulunmuştur. KTH grubundaki hastalardan lenfadenopatilerden PCR yöntemiyle genotipleme yapılmıştır. Çalışmaya alınan hastaların 32'sinde *B.henselae* genotip I (serotip Houston I), 15'inde ise *B.henselae* genotip II (serotip Marseilles II) olarak belirlenmiştir. *B.henselae* genotip II'nin *B.henselae* IgG ELISA serolojik testin sensitivitesi, *B.henselae* genotip I'den istatistiksel olarak daha anlamlı bulunmuştur.

Bergmans ve ark. (74) Hollanda'da yaptıkları çalışmada muhtemel KTH olan 22 kişi çalışmaya alınmıştır. Bu hastaların 19'unda PCR pozitif, 3'ünde ise PCR negatif bulunmuştur. PCR sensitivitesi %86.4 olarak belirlenmiştir. *B.henselae* IgM ELISA yöntemiyle 21 hastanın 15'i pozitif, 3'ü şüpheli pozitif ve 3'ü de negatif bulunmuştur. *B.henselae* IgM ELISA yönteminin sensitivitesi %71.4 olarak değerlendirilmiştir. *B.henselae* IgG ELISA yöntemiyle 21 hastanın 2'si pozitif, 17'si şüpheli pozitif, 2'si de negatif olarak ölçülmüştür. *B.henselae* IgG ELISA yönteminin sensitivitesi %9.5 olarak belirlenmiştir. IFA *B.henselae* IgM yöntemiyle 22 hastanın 11'i pozitif, 11'ide negatif bulunmuştur. IFA *B.henselae* IgM yöntemiyle sensitivitesi %50 olarak belirlenmiştir. IFA *B.henselae* IgG yöntemiyle 22 hastanın 9'u pozitif, 11'i şüpheli pozitif, 2'si de negatif bulunmuştur. IFA *B.henselae* IgG yönteminin sensitivitesi %40.9 olarak belirlenmiştir. Ayrıca kan donörleri de çalışmaya alınarak ELISA ve IFA yöntemiyle değerlendirmişler. IFA *B.henselae* IgG yöntemiyle 60 donörden 3'ü pozitif, 33'si şüpheli pozitif, 24 negatif olarak bulunmuştur. IFA *B.henselae* IgG yönteminin spesifitesini %95 olarak belirlenmiştir. IFA *B.henselae* IgM yöntemiyle 60 donörün 60'ı da negatif ölçülmüştür. IFA *B.henselae* IgM yönteminin spesifitesi %100 olarak bulunmuştur. ELISA *B.henselae* IgG yöntemiyle 60 donörden 2'si pozitif, 37'si şüpheli pozitif, 21 negatif ölçülmüştür. ELISA *B.henselae* IgG yönteminin spesifitesi %96.7 olarak

bulunmuştur. ELISA *B.henselae* IgM yöntemiyle 60 donörden 1'i pozitif, 2'si şüpheli pozitif, 57'si ise negatif olarak saptanmıştır. ELISA *B.henselae* IgM yönteminin spesifitesini %98.3 bulunmuştur.

Maurin ve ark. (102) 2002 yılında Fransa'da 104 hasta ile yaptıkları çalışmada (68 KTH, 17 endokardit (5'i *B.henselae*, 12'si *B.quintana*), 19'u kronik *B.quintana* bakteriyemisi olan evsiz kişiler) KTH olan hastaların serum örneklerinden cut-off değeri 64 olarak alınan "in-house" IFA ve "in-house" ELISA yöntemi ile *B.henselae* IgG antikorlarının sensitiviteyi "in-house" IFA yönteminde %52.9, "in-house" ELISA yönteminde %91.2 olarak bulunmuştur. Serum örneklerindeki median değeri *B.henselae* IgG titre değerleri "in-house" ELISA yöntemi için 256, "in-house" IFA yöntemi için ise 64 olarak bulunmuştur. Sonuç olarak "in-house" ELISA yöntemi *B.henselae* kökenlerine karşı gelişen IgG antikorları için "in-house" IFA yöntemine göre sensitivitesi daha yüksek bulunmuştur.

Sander ve ark. (99) yaptıkları çalışmada 1998 yılında Almanya'da 42 KTH olan kişiler çalışmaya alınmıştır. Kontrol grubu A, B ve C olmak üzere üçe ayrılmıştır. Grup C kedi ile teması olmayan 142, grup B kedi ile son teması altı aydan daha fazla olan 65 ve grup A kedi sahibi olan 63 kişiden oluşmaktadır. Çalışmada A ve B olmak üzere iki farklı IFA yöntemi kullanılmıştır. Test A yöntemi sağlıklı yetişkinlerdeki *B.henselae* için, test B ise hasta grubundaki kişilerde *B.quintana* ve *B.henselae* için IFA yöntemi olarak çalışılmıştır. Kontrol grubundaki 270 kişiden 189'u seronegatif, 4 kişide ise 512 titre ve üzerinde pozitiflik saptanmıştır. *B.henselae* IgG antikorları açısından karşılaştırılan bu iki test %83 uyumluluk göstermiştir. Fakat serolojik çalışmalarda sadece 10 hastada aynı titrede pozitiflik saptanmıştır. Diğer hastaların titre değerleri farklı bulunmuştur. KTH olan 38 hastanın ≥ 64 titre üzerindeki *B.henselae* ve *B.quintana* antikorlarına göre 6'sında *B.henselae* titreleri yüksek, 14'ünde *B.quintana* titresiyi yüksek bulunmuştur. 18 hastada ise her iki *Bartonella* türünde eşit titrede antikor saptanmıştır. Zengwill ve ark. (26) Atlanta'da yaptıkları çalışmada; *B.henselae* kökeniyi kullanarak IFA yönteminin sensitivitesi %84 (45 KTH olan kişilerin 38'i pozitif) spesifitesi ise %96 (112 kontrol grubunun 108'i negatif) olarak bulunmuştur. Barka ve ark. (103)

yaptıkları çalışmada, *B.henselae*'ya karşı IFA ve ELISA serolojik yöntemlerini karşılaştırmışlardır. ELISA yönteminin IFA yöntemine göre daha sensitif ve daha spesifik olduğunu göstermişlerdir. Szec-Kelly ve ark. (104) yaptıkları çalışmada, yine ELISA ve IFA serolojik yöntemlerini karşılaştırmışlardır. *Bartonella* IgG antikorları IFA yönteminde daha sensitif ve daha spesifik olarak bulunmuştur. Herremans ve ark. (89) tarafından 2009 yılında Hollanda'da yapılan çalışmada, KTH olan PCR pozitif 126, KTH olan PCR negatif 69 ve KTH şüphesi olan 123 kişi çalışmaya alınmıştır. PCR pozitif hastaların 71'inde ELISA IgM pozitifliği, 45'inde ELISA IgG pozitifliği bulunmuştur. Araştırmada *B.henselae* IgM ELISA yönteminin sensitivitesini %56.3, spesifitesini %98.4 ve *B.henselae* IgG ELISA yönteminin ise sensitivitesini %35.7, spesifitesini ise %97.6 olarak bulunmuştur. Çalışmadaki 123 şüpheli KTH olanlarda ELISA yöntemi ile 18'inde *B.henselae* IgM pozitif bulunmuştur. *B.henselae* IgG ELISA değerleri, PCR pozitif ve PCR negatif hastaların değerleriyle benzer bulunmuştur. PCR pozitif ve PCR negatif hastaların *B.henselae* IgG değerleri kontrol grubuna göre önemli derecede yüksek bulunmuştur. Sunulan çalışmada *B.henselae* ATCC 49882 kökeni kullanılarak deney hayvanlarında oluşturulan antikor düzeyleri "in-house" ELISA yöntemi ile araştırılmıştır. Bu antikorlar *B.henselae* ATCC 49882 antijeni ile kaplı "in-house" ELISA yönteminde değerlendirilmiş, 11 serum örneğinden 10'u (%90.91) pozitif, 1'i (%9.09) negatif bulunmuştur. *B.henselae* Hıfzısıhha C-48 antijeni ile kaplanan "in-house" ELISA yönteminde ise 9'unda (%81.82) pozitif, 2'inde (%18.18) negatif olarak bulunmuştur (Tablo 1). Çalışmamızda ayrıca denek hayvanlarında *B.henselae* Hıfzısıhha C-48 antikorları oluşturulmuştur. Oluşturulan bu antikorlar *B.henselae* ATCC 49882 antijeni ile kaplı "in-house" ELISA yöntemi ile çalışılmıştır. Onbir serum örneğinden 9'u (%81.82) pozitif, 2'si (%18.18) negatif bulunurken, *B.henselae* Hıfzısıhha C-48 antijeni ile kaplı "in-house" ELISA yönteminde ise bu serumların 8'inde (%72.73) pozitif, 3'ünde (%27.27) negatif olarak bulunmuştur (Tablo 2). Negatif olarak bulunan serum örneklerinin ELISA değerleri şüpheli (gri) zonda yer almaktaydı. Deney hayvanlarında antikor oluşturulmadan elde edilen serum örneklerinin hepsinde ise her iki *B.henselae* antijenlerinde "in-house" ELISA yöntemi negatif olarak bulunmuştur (Tablo 3).

T.gondii zorunlu hücre içi bir parazittir. Dünyada yaygın olarak görülen enfeksiyonlardandır. Sıcak ve nemli yerlerde, kuru yerlere oranla daha sık enfeksiyona neden olmaktadır. İnsanlarda enfeksiyon en sık doku kisti içeren çiğ veya az pişmiş etlerin ve ookistlerle kirlenmiş su ve gıdaların tüketilmesi yoluyla veya gebelik sırasında enfeksiyon geçiren annelerden transplasental geçiş ile konjenital enfeksiyon olarak görülmektedir (105). Türkiye’de toksoplazmosis seropozitifliği konusunda yapılan çalışmalarda anti-*Toxoplasma* IgM oranları %0.68-13.4, IgG oranları ise %23.1-57.6 olarak bildirilmiştir. *T.gondii* enfeksiyonu tanısında ELISA, IFAT ve Western blot’dan yararlanılmaktadır. (105, 106).

EBV, herpesvirüs ailesinin lenfotropizm ile karakterli bir üyesidir. Özellikleri herpesvirüslerin genel özelliklerine benzer; nükleokapsit içinde çift-sarmallı DNA ve viral glikoproteinleri içeren lipit zarftan oluşur. EBV enfeksiyonu dünyada yaygın olarak görülen bir hastalıktır ve toplumda erişkinler arasında yaklaşık %90 oranında seropozitiflik vardır. Pek çok laboratuvarında rutin olarak EBV enfeksiyonunun serolojik tanısında ELISA testleri yaygın olarak kullanılmaktadır (107). CMV, herpesvirus ailesinin bir üyesidir. Hücre içinde tipik intranükleer ve intrasitoplazmik inklüzyon cisimcikleri oluşturan virüslerdir. 230 kb’lık genom yapısıyla bilinen en büyük insan herpes virüsüdür. Çift iplikli lineer DNA genomu içerir. DNA’nın çevresinde ikozahedral simetride bir kapsid yer alır. Kapsid dışında tegüment veya matriks olarak adlandırılan bir tabaka ve en dışta hepsini çevreleyen bir zarf bulunur. Tek kaynağı insan olan CMV tüm dünyada yaygın olarak görülmektedir. CMV enfeksiyonu tanısında en sık ELISA yöntemi olmak üzere pek çok serolojik yöntem kullanılmaktadır (108, 109).

Bu mikroorganizmaların yaptıkları enfeksiyonlar yaygın olarak görülmektedir. Yapılan çalışmalarda bu mikroorganizmaların *B.henselae* kökenleri ile çapraz reaksiyon verdikleri gösterilmiştir. Bu bilgilere göre planlanan araştırmada *B.henselae* kökenleri ile EBV, CMV ve *T.gondii* seropozitif hasta serumlarının çapraz reaksiyonu araştırılmıştır. *B.henselae* ve *B.quintana*’nın serolojik tanımlama testlerinde çapraz reaksiyon pozitifliğinin olduğu bilinmektedir. Aksoy ve ark. (100) 2011 yılında IFA ile yaptıkları tez çalışmasında, *B.henselae* pozitif bulunan 21 serum

örneğinin 7'sinde *B.quintana* pozitif, 14'ünde *B.quintana* negatif bulunmuştur. Bu bulguların *Bartonella* türleri arasındaki çapraz pozitifliğe bağlı olduğunu düşünmüşlerdir.

Sander ve ark. (99) yaptıkları çalışmada EBV (n=9), CMV (n=9), *T. gondii* (n=15) ve *Chlamydia pneumoniae* (n=15) pozitif olan hasta serumlarında çapraz reaksiyonu araştırmışlardır. Çalışmada *B.henselae* ile bu mikroorganizmalar arasında IFA yöntemi ile çapraz reaksiyon bulunamamıştır. Giladi ve ark. (90) Oklahoma şehrinde yaptıkları çalışmada *Bartonella* ile çapraz reaksiyonları incelemişlerdir. Çapraz reaksiyon incelemesi için 46 kişide EBV, 9 kişide CMV, 31 kişide *T.gondii* akut infeksiyonu olan pozitif serum örnekleri değerlendirmeye alınmıştır. Bu pozitif serum örnekleri ile “in-house” ELISA testi ile çapraz reaksiyon görülmemiştir. Zbinden ve ark. (82) 1997 yılında İsviçre’de yaptıkları çalışmada, KTH olan 20 çocuk ve 20 lenf nodu KTH olan çocuk ve 20 kan donörünü IFA yöntemi ile değerlendirmiştir. 20 KTH olan çocukların 18’inde *B.henselae* IgM pozitif olarak tespit edilmiştir. İki kan donöründe ve üç lenf nodu olan hastada *B.henselae* IgM pozitif olduğu görülmüştür. Ayrıca 20 hastada EBV kapsid antijeni IgM pozitif olan hastalarda *B.henselae* IgM pozitifliği saptanmıştır. Bu çalışmada IFA sensitivitesi %70-90, spesifitesi %87,5-100 olarak bulunmuştur. Maruyama ve ark. (110) 2000 yılında Tayland’da yaptıkları çalışmada 163 kan donöründe IFA yöntemiyle çalışmışlardır. Bu donörün 9’unda *B.henselae* IgG, 2’sinde *B.henselae* IgM ve 5’inde *T.gondii* pozitif olarak bulunmuştur. *B.henselae* IgG pozitif olan hastaların 3’ünde ve *B.henselae* IgM pozitif olan hastaların 2’sinde aynı zamanda *T.gondii* pozitifliği de saptanmıştır.

Çapraz reaksiyonlarla ilgili olarak literatürde az sayıda yayına rastlanmıştır. En geniş kapsamlı araştırma Vermeulen ve ark. (80) tarafından Hollanda’da 5 farklı yöntem ile yapılmıştır. Bu araştırmalarında 141 EBV, 39 CMV, 20 *T.gondii*, 54 *S.pyogenes*, 14 *C.pneumoniae*, 21 *C.burnetii* pozitif olan hasta serumları dört farklı üretime sahip IFA (birisi “in-house”, diğerleri ticari IFA) ve ayrıca “in-house” ELISA yöntemiyle çalışılmıştır. Test A (IFA) da EBV pozitif serumların %1’inde, *S.pyogenes* pozitif serumların %2’sinde, *C.burnetii* pozitif serumların ise %20’sinde

çapraz reaksiyon pozitifliği görülmüştür. Test B (Marseilles IFA) da EBV pozitif serumların %9'unda, CMV pozitif serumların %3'ünde, *T.gondii* pozitif serumların %20'sinde, *S.pyogenes* pozitif serumların %19'unda, *C.pneumoniae* pozitif serumların %14'ünde, *C.burnetii* pozitif serumların ise %20'sinde çapraz reaksiyon pozitifliği görülmüştür. *T.gondii* pozitif olanlarda en fazla çapraz reaksiyon bu yöntemle bulunmuştur. Test C ("in-house" IFA) da EBV pozitif serumların %1'inde, *S.pyogenes* pozitif serumların %2'sinde, *C.burnetii* pozitif serumlardan ise %15'inde çapraz reaksiyon pozitifliği görülmüştür. Bu çalışmada en az çapraz reaksiyon "in-house" IFA yönteminde görülmüştür. Test D ("in-house" ELISA) da EBV pozitif serumların %24'ünde, CMV pozitif serumların %24'ünde, *T.gondii* pozitif serumların %5'inde, *S.pyogenes* pozitif serumlardan %8'inde, *C.pneumoniae* pozitif serumların %36'sında, *C.burnetii* pozitif serumların ise %20'sinde çapraz reaksiyon pozitifliği görülmüştür. EBV ve CMV pozitif olanlarda en fazla çapraz reaksiyon "in-house ELISA" yönteminde bulunmuştur. Test E (IFA) da EBV pozitif serumların %8'inde, CMV pozitif serumların %5'inde, *S.pyogenes* pozitif serumların %2'sinde, *C.burnetii* pozitif serumların ise %13'ünde çapraz reaksiyon pozitifliği bulunmuştur.

Sunulan araştırmamızda iki farklı *B.henselae* kökenleri ile hazırlanan "in-house" ELISA yöntemleri ile EBV (n=11), CMV (n=11) ve *T.gondii* (n=11) pozitif olan hasta serumlarında çapraz reaksiyonları incelenmiştir. *B.henselae* ATCC 49882 antijeni ile kaplı "in-house" ELISA yönteminde EBV pozitif hasta serumlarının 2'sinde (%18.18), CMV hasta serumlarının 2'sinde (%18.18) pozitif reaksiyon alınmıştır (Tablo 4). *T.gondii* hasta serumlarında ise çapraz seropozitiflik saptanmamıştır. *B.henselae* Hıfzısıhha C-48 antijeni ile kaplı "in-house" ELISA yönteminde ise EBV pozitif hasta serumlarının 2'sinde (%18.18), CMV hasta serumlarının 1'inde (%9.09) pozitif reaksiyon verdi. *T.gondii* hasta serumlarında pozitiflik görülmemiştir (Tablo 4).

Sunulan araştırmada farklı *B.henselae* antijenleri kaplanan plaklarda ELISA yöntemi ile antikor seviyeleri gruplar arasında farklı olarak değerlendirildi. Ülkemizde benzer araştırmalar olmakla birlikte Türkiye'de KTH ve immünsüprese hastalarda *Bartonella* infeksiyonları vaka bildirimleri bulunmaktadır. Planlanacak

araştırmalar ile sunulan araştırmada gösterildiği şekilde laboratuvar ortamında hazırlanacak ELISA plaklarında toplum taramaları ve/veya olgu tanıları yapılmalıdır. Yeni geliştilmekte olan yöntemler ile *Bartonella* antijenlerine karşı tanısal serolojik cevabın araştırılması da bu planlamalara dahil edilmelidir.

SONUÇLAR

- Bu çalışmada farklı *B.henselae* kökenlerinde BALB/c farelerine subkutan yolla verilerek antikor oluşturuldu. Deney aşamasının 80.'inci gününde BALB/c farelerinden serum örnekleri alınarak antikor oluştuğu gösterilerek deney 90. günde sonlandırıldı.
- BALB/c farelerinde *B.henselae* ATCC 49882 kökeni ile antikor oluşturulan serumlarda *B.henselae* ATCC 49882 antijeni ile kaplı "in-house" ELISA yönteminde %90.91 pozitif, %9.09 negatif ve *B.henselae* Hıfzısıhha C-48 antijeni ile kaplı "in-house" ELISA yönteminde %81.82 pozitif, %18.18 negatif olarak bulundu.
- *B.henselae* Hıfzısıhha C-48 antikorlarında ise *B.henselae* ATCC 49882 antijeni ile kaplı "in-house" ELISA yönteminde %81.82 pozitif, %18.18 negatif ve *B.henselae* Hıfzısıhha C-48 antijeni ile kaplı "in-house" ELISA yönteminde %72.73 pozitif, %27.27 negatif olarak bulundu.
- Kontrol grubu serumları her iki *B.henselae* antijeni ile kaplı ELISA plaklarında negatif olarak saptandı.
- *B.henselae* ATCC 49882 antijeni ile kaplı "in-house" ELISA yönteminde EBV pozitif hasta serumlarının 2'sinde (%18.18), CMV hasta serumlarının 2'sinde (%18.18) pozitif reaksiyon verdi. *T.gondii* hasta serumlarında pozitiflik görülmedi.
- *B.henselae* Hıfzısıhha C-48 antijeni ile kaplı "in-house" ELISA yönteminde EBV pozitif hasta serumlarının 2'sinde (%18.18), CMV hasta serumlarının 1'inde (%9.09) pozitif reaksiyon verdi. *T.gondii* hasta serumlarında pozitiflik görülmedi.

KAYNAKLAR

1. Raoult D, Roux V. The body louse as a vector of reemerging human diseases. Clin Infect Dis 1999;29:888-911.
2. Tomkins LS, *Bartonella* Infections, including cat-scratch disease. Fauci AS, Braunwald E, Isselbacher KJ, Wilson JD, Martin JB, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL(eds). In: Harrison's Principles of Internal Medicine, 14th edition. New York: McGraw-Hill 2012:1314-20.
3. Köksal Y, İnce E, Ulukol B, Çiftçi E, Azık F, Kuzu I, et al. Bir olgu nedeniyle kedi tırmığı hastalığı. Ankara Üniv Tıp Fak Mec 2001;54:177-80.
4. Aydoğan İ, Parlak HA, Alper M, Aksoy KA. HIV seronegatif bir olguda gelişen basiller anjiomatozis. Turkderm 2004;38;71-4.
5. Yılmaz C, Ergin Ç, Kaleli İ: Pamukkale Üniversitesi Kan Merkezi'ne başvuran donörlerde *Bartonella henselae* seroprevalansının araştırılması ve risk faktörlerinin irdelenmesi. Mikrobiyol Bul 2009;43:391-401.
6. Sayın-Kutlu S, Ergin Ç, Kutlu M, Akkaya Y, Akalın Ş. *Bartonella henselae* seroprevalence in cattle breeders and veterinarians in the rural areas of Aydın and Denizli, Turkey. Zoonoses Public Health 2012;59:445-9.
7. Slater LN, Welch DF, Min KW. *Rochalimaea henselae* causes bacillary angiomatosis and peliosis hepatis. Arch Intern Med 1992;152:602-6.
8. Jacomo V, Kelly PJ, Raoult D. Natural history of *Bartonella infections* (an exception to Koch's postulate). Clin Diagn Lab Immunol 2002;9:8-18.

9. Guptill L. Bartonellosis. *Vet Microbiol* 2010;140:347-59.
10. Chomel BB, Kasten RW. Bartonellosis, an increasingly recognized zoonosis. *J Appl Microbiol* 2010;10:1-8.
11. Blazes LD, Mullins K, Smoak LB, Jiang J, Canal E, Solorzano N, et al. Novel *Bartonella* agent as cause of Verruga Peruana. *Emerg Infect Dis* 2013;19:1111-4.
12. Resto-Ruiz S, Burgess A, Anderson BE. The role of host immune response in pathogenesis of *Bartonella henselae*. *DNA Cell Biol* 2003;22:431-40.
13. Anderson BE, Neuman MA. *Bartonella spp.* as emerging human pathogens. *Clin Microbiol Rev* 1997;10:203-19.
14. Angelakis E, Billeter SA, Chomel BB, Raoult D. Potential for tick –borne Bartonellosis. *Emerg Infect Dis* 2010;16:385-91.
15. Ristic M, Kreier JP. Family II. *Bartonellaceae* Gieszczykiewicz 1939, 25^{AL}. In: Krieg NR, Holt JG, eds. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 1. Baltimore: Williams&Wilkins, 1984:717-9.
16. Weiss E, Moulder JW. Genus II. *Rochalimaea* (Macchiavello 1947) Krieg 1961. 162^{AL}. In: Krieg NR, Holt JG, eds. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 1. Baltimore: Williams&Wilkins, 1984:698-701.
17. Daly JS, Worthington MG, Brenner DJ, et al. *Rochalimaea elizabethae* sp. nov. Isolated from a patient with endocarditis. *J Clin Microbiol* 1993;31:872-81.

18. Aydın N. *Bartonella* türleri, Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. Enfeksiyon hastalıkları Mikrobiyolojisi kitabında, 3.baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi 2008:2266-73.
19. Slater LN, Welch DF, Hensel D, Coody DW. A newly recognized fastidious gram-negative pathogen as a cause of fever and bacteremia. N Engl J Med 1990;323:1587-93.
20. Winn W, Allen S, Janda W, Koneman E, Procop G, Schreckenberger P, et al. Miscellaneous Fastidious Gram-Negative Bacilli. Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology 6. Edition. Lippincott Williams&Wilkins Philadelphia, A Wolters Kluwer Company 2006; 497-510.
21. O'Connor SP, Dorsch M, Steigerwalt AG, Brenner DJ, Stackebrandt E. 16S rRNA sequences of *Bartonella bacilliformis* and cat-scratch disease bacillus reveal phylogenetic relationships with the α -2 subgroup of the class Proteobacteria. J Clin Microbiol 1991;29:2144-50.
22. Antoniou M, Economou I, Wang X, Psaroulaki A, Spyridaki I, Papadopoulos B, et al. Fourteen year seroepidemiological study of zoonoses in a Greek village. Am J Trop Med 2002;66:80-5.
23. Drancourt M, Birtles R, Chaumentin G, et al. New serotype of *Bartonella henselae* in endocarditis and cat-scratch disease. Lancet 1996;347:441-3.
24. Bergmans AM, Schellekens JF, van Embden JD, Schouls LM. Predominance of two *Bartonella henselae* variants among cat-scratch disease patients in the Netherlands. J Clin Microbiol 1996;34:254-60.

25. Breitschwerdt EB, Kordick DL. *Bartonella infection* in animals: Carriership, reservoir potential, pathogenicity and zoonotic potential for human infection. Clin Microbiol Rev 2000;13:428-38.
26. Zangwill KM, Hamilton DH, Perkins BA, et al. Cat scratch disease in Connecticut: Epidemiology, risk factors, and evaluation of a new diagnostic test. N Eng J Med 1993;329:8-13.
27. Regnery RL, Martin M, Olson J. Naturally occurring *Rochalimaea hensela* infection in domestic cat. Lancet 1992;340:557-8.
28. Çelebi B. *Bartonella henselae* Enfeksiyonları. Mikrobiyol Bul 2008;42:163-75.
29. Gouriet F, Lepidi H, Habib G, Collart F, Raoult D. From cat scratch disease to endocarditis, the possible natural history of *Bartonella henselae* infection. BMC Infect Dis 2007;7:30.
30. Windsor J. Cat-scratch disease: epidemiology, aetiology and treatment. Br J Biomed Sci 2001;58:101-10.
31. Numazaki K. Prevalence of *Bartonella* infection among patients with fever. African Journal of Biotechnology 2003;10:390-1.
32. McGill S, Wesslen L, Hjelm E, Holmberg M, Auvinen MK, Johnson U, et al. *Bartonella* spp. Seroprevalence in healthy Swedish blood donors. Scand J Infect Dis 2005;37:723-30.
33. Loutit JS. *Bartonella* infections: Diverse and Elusive. Hosp Pract (Minneap) 1998;33:37-49.

34. Ferres GM, Abarca VK, Prado DP, Montecinos PL, Navarrete CM, Vial PA. Prevalence of *Bartonella henselae* antibodies in Chilean children, adolescents and veterinary workers. *Rev Med Chil* 2006;34:863-7.
35. Noah, DL, Kramer CM, Verbsky MP, Rooney JA, Smith KA, Childs JE. Survey of veterinary professionals and other veterinary conference attendees for antibodies to *B.henselae* and *B. quintana*. *J Am Vet Med Assoc* 1997;210:342-4.
36. Karakaş M, Baba M, Memişoğlu HR. Basiller anjiomatozis. *Türkderm* 2001;35:100-2.
37. Jackson AL, Perkins AB, Wenger DJ. Cat scratch disease in the United States analysis of three National databases. *Am J Pub Health* 1993;83:1707-11.
38. Kordick DL, Breitschwerdt EB. Intraerythrocytic presence of *B.henselae*. *J Clin Microbiol* 1995;33:1655-6.
39. Minnick FM. Pestilence, persistence and pathogenicity: infection strategies of *Bartonella*. *Future Microbiol* 2009;4:743-58.
40. Coleman SA, Minnick MF. Differential expression of the invasion – associated locus B (IaIB) gene of *B.bacilliformis* in response to environmental cues. *Microb Pathog* 2003;34:179-86.
41. Wagner CL, Riess T, Linke D, Eberhardt C, Schäfer A, Reutter S, et al. Use of *Bartonella* adhesin A (BadA) immunblotting in the serodiagnosis of *Bartonella henselae* infections. *J Med Microbiol* 2008;298:579-90.
42. Dehio C. Infection associated type 4 secretion systems of *Bartonella* and their diverse roles in host cell interaction. *Cell Microbiol* 2008;8:1591-8.

43. Pulliainen AT, Dehio C. *Bartonella henselae*: subversion of vascular endothelial cell functions by translocated bacterial effector proteins. *Int J Bio Cell Bio* 2009;41:507-10.
44. Scherer CD, Deburon I, Minnick MF. Characterization of *B. bacilliformis* flagella and effect of anti-flagellin antibodies on invasion of human erythrocytes. *Infect Immun* 1993;61:4962-71.
45. Minnick MF, Smitherman SL, Samuels DS. Mitogenic effect of *Bartonella bacilliformis* on human vascular endothelial cells and involvement of GroEL. *Infect Immun* 2003;71:6933-42.
46. Callison JA, Battisti JM, Sappington KN, Smitherman LS, Minnick MF. Characterization and expression analysis of the groESL operon of *B. bacilliformis*. *Gene* 2005;359:53-62.
47. Rolain JM, Brouqui P, Koehler JE, Maguina C, Dolan MJ, Raoult D. Recommendations for treatment of human infections caused by *Bartonella* species. *Antimicrob Agent Chemother* 2004;48:1921-33.
48. Florin TA, Zaoutis TE, Zaoutis LB. Beyond cat scratch disease: widening spectrum of *Bartonella henselae* infection. *Pediatrics* 2008;121:1413-25.
49. Krauss H, Weber A, Appel M. *Bartonellosis*, including cat scratch disease. Krauss H, Weber A, Appel M. *Zoonoses: Infectious Diseases Transmissible from Animals to Humans*. 3. Baskin. Washington DC: ASM Press 2003;176-8.
50. Hipp SJ, O'Shield A, Fordham LA, Blatt J, Hamrick HJ, Henderson FW. Multifocal bone marrow involvement in cat-scratch disease. *Ped Infect Dis J* 2005;24: 472-4.

51. Kordick DL, Hilyard EJ, Hiedfield TL, et al. *Bartonella clarridgeiae*, a newly recognized zoonotic pathogen causing inoculation papules, fever and lymphadenopathy (cat-scratch disease). *J Clin Microbiol* 1997;35:1813-8.
52. Gray AV, Michels KS, Lauer AK, Samples JR. *Bartonella henselae* infection associated with neuroretinitis, central retinal artery and vein occlusion, neovascular glaucoma and severe vision loss. *Am J Ophthalmol* 2004;137:187-9.
53. Maguina C, Humberto G, Palmira V. Bartonellosis. *Clin Dermatol* 2009;27:271-80.
54. Maco V, Ciro M, Tirado A, Vidal JE. Carrion disease (*Bartonella bacilliformis*) confirmed by histopaology in the high forest of Peru. *Rev Inst Med Trop* 2004;46:171-4.
55. Roux V, Raoult D. The 16S-23S r RNA intergenic spacer region of *Bartonella (Rochalimae)* species is longer than usually described in other bacteria. *Gene* 1995;156:107-11.
56. Kosek M, Lavarello R, Gilman RH, Delgado J, Maguiña C, Verástegui M, et al. Natural history of infection with *Bartonella bacilliformis* in a nonendemic population. *J Infect Dis* 2000;182:865-72.
57. Ricketts WE. Clinical manifestations of Carrion's disease. *Arch Intern Med* 1949;84:751-81.
58. Koehler JE, Sanchez MA, Garrido CS, Whitfield MJ, Chen FM, Berger TG, et al. Molecular epidemiology of *Bartonella* infections in patients with bacillary angiomatosis-peliosis. *N Engl J Med* 1997;337:1876-83.

59. Roux V, Eykyn SJ, Wyllie S, Raoult D. *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii* as an agent of afebrile blood culture-negative endocarditis in a human. *J Clin Microbiol* 2000;38:1698-1700.
60. Wong R, Tappero J, Cockerell CJ. Bacillary angiomatosis and other *Bartonella* species infections. *Semin Cutan Med Surg* 1997;16:188-99.
61. Jacobs RF, Schutze GE. *Bartonella henselae* as a cause of prolonged fever of unknown origin in children. *Clin Infect Dis* 1998;26:80-4.
62. Baylor P, Garoufi A, Karpathios T, Lutz J, Mogelof J, Moseley D. Transverse myelitis in 2 patient with *Bartonella henselae* infection (cat scratch disease). *Clin Infect Dis* 2007;45:42-5.
63. Noah DL, Bresee JS, Gorenssek MJ, Rooney JA, Cresanta JL, Regnery RL, et al. Cluster of five children with acute encephalopathy associated with cat-scratch disease in South Florida. *Pediatr Infect Dis J* 1995;14:866-9.
64. Lamas C, Curi A, Lemos E. Human bartonellosis: seroepidemiological and clinical features with an emphasis on data from Brazil – a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2008;103:221-35.
65. Carithers HA. Cat-scratch disease. An overview based on a study of 1,200 patients. *Am J Dis Child* 1985;139:1124-33.
66. Grando D, Sullivan JL, Flexman JP, Watson MW, Andrew JH. *Bartonella henselae* associated with Parinaud's oculoglandular syndrome. *Clin Infect Dis* 1999;28:1156-8.

67. Fenollar F, Raoult D. Molecular genetic methods for the diagnosis of fastidious microorganisms. *APMIS* 2004;112:785-807.
68. Regnery RL, Anderson BE, Clarridge JE, et al. Characterization of a novel *Rochalimaea* species, *R.henselae* sp. nov., isolated from blood of a febrile, human immunodeficiency virus-positive patient. *J Clin Microbiol* 1992;30:265-74.
69. Welch DF, Pickett DA, Slater LN, et al. *Rochalimaea henselae* sp. nov. a cause of septicemia, bacillary angiomatosis and parenchymal bacillary peliosis. *J Clin Microbiol* 1992;30:275-80.
70. Liang Z, Raoult D. Species-specific monoclonal antibodies for rapid identification of *Bartonella quintana*. *Clin Diag Lab Immunol* 2000;7:21-4.
71. Zaiter Z, Liang Z, Raoult D. Genetic classification and differentiation of *Bartonella* species based on comparison of partial *ftsZ* gene sequences. *J Clin Microbiol* 2002;40:3641-7.
72. Kordick DL, Wilson KH, Sexton DJ, et al. Prolonged *Bartonella* bacteremia in cats associated with cat-scratch disease patients. *J Clin Microbiol* 1995;33:3245-51.
73. Iredell J, Blanckenberg D, Arvand M, Grauling S, Feil EJ. Characterization of the Natural Population of *Bartonella henselae* by Multilocus Sequence Typing. *J Clin Microbiol* 2003;41:5071-9.
74. Bergmans AM, Peeters MF, Schellekens JF. Pitfalls and fallacies of cat scratch disease serology: evaluation of *Bartonella henselae*-based indirect fluorescence assay and enzymelinked immunoassay. *J Clin Microbiol* 1997;35:1931-7.

75. Rolain JM, Foucault R, Guieu R, La Scola B, Brouqui P ve Raoult D. *Bartonella quintana* in human erythrocytes. Lancet 2002;360:226-8.
76. Foucalt C, Rolain JM, Raoult D ve Brouqui P. Detection *Bartonella quintana* by direct immunfluorescence examination of blood smears of a patient with trench fever. J Clin Microbiol 2004;42:4904-6.
77. McGill SL, Regnery RL, Karem KL. Characterization of human immunoglobulin (Ig) isotype and IgG subclass response to *Bartonella henselae* infection. Infect. Immun 1998;66:5915-20.
78. La Scola B, Raoult D. Serological cross-reactions between *Bartonella quintana*, *Bartonella henselae*, and *Coxiella burnetii*. J Clin Microbiol 1996;34:2270-4.
79. Graham JV, Baden L, Tsiodras S, Karchmer AW. Q fever endocarditis associated with extensive serological crossreactivity. Clin Infect Dis 200;30:609-10.
80. Vermeulen MJ, Verbakel H, Notermans DW, Reimerink JH, Peeters MF. Evaluation of sensitivity, specificity and cross-reactivity in *Bartonella henselae* serology. J Med Microbiol 2010;59:743-5.
81. Drancourt M, Mainardi JL, Brouqui P, Vandenesch F, Carta A, et al. *Bartonella (Rochalimaea) quintana* endocarditis in three homeless men. N Engl J Med 1995;332: 419-23.
82. Zbinden R, Ströhle A, Nadal D. IgM to *Bartonella henselae* in cat-scratch disease and during acute Epstein-Barr virus infection. Med Microbiol Immunol 1998;186:167-70.

83. Karem KL, Dubois KA, McGill SL, Regnery RL. Characterization of *Bartonella henselae*-specific immunity in BALB/c mice. *Immunology* 1999;97:352-8.
84. Sander A, Posselt M, Bohm N, Ruess M, Altwegg M. Detection of *Bartonella henselae* DNA by two different PCR assays and determination of the genotypes of strains involved in histologically defined cat scratch disease. *J Clin Microbiol* 1999;37:993-7.
85. Buther JE. Solid supports in enzyme-linked immunosorbent assay and other solid-phase immunoassays. *Methods Mol Med* 2004;94:333-72.
86. Chiaraviglio L, Duong S, Brown DA, Birtles RJ, Kirby JE. An immunocompromised murine model of chronic *Bartonella* infection. *Am J Pathol* 2010;176:2753-63.
87. Sander A, Berner R, Ruess M. Serodiagnosis of cat scratch disease: response to *Bartonella henselae* in children and a review of diagnostic methods. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2001;20: 392-401.
88. Vermeulen M, Herremans T, Verbakel H, Bergmans A, Roord J, van Dijken P, et al. Serological testing for *Bartonella henselae* infections in the Netherlands: clinical evaluation of IFA and ELISA. *Clin Microbiol Infect* 2007;13:627-34.
89. Herremans M, Bakker J, Vermeulen MJ, Schellekens JF, Koopmans MP. Evaluation of an in-house cat scratch disease IgM ELISA to detect *Bartonella henselae* in a routine laboratory setting. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2009;28:147-52.

90. Giladi M, Kletter Y, Avidor B, Metzkor-Cotter E, Varon M et al. Enzyme immunoassay for the diagnosis of catscratch disease defined by polymerase chain reaction. *Clin Infect Dis* 2001;33:1852-8.
91. Kaya S, Demirci M, Sesli Çetin E, Cicioğlu Aridoğan B, Şahin M. Investigation of the presence of autoantibodies in patents with toxocariasis. *Mikrobiyol Bul* 2009;43:661-6.
92. Çelebi B, Kılıç S. Development of a novel *Francisella tularensis* antigen stained with tetrazolium-blue for tularemia microagglutination test. *Mikrobiyol Bul* 2013;47:514-22.
93. Çöplü N, Esen B, Kurtoğlu D, Gözalan A, Miyamura K, Yoshida I. Standardization of in-house ELISA for pertussis serology and its application in a seropidemiological study. *Mikrobiyol Bul* 2005;39:281-8.
94. Maruyama S, Nakamura Y, Kabeya H, Tanaka S, Sakai T, Katsube Y. Prevalence of *Bartonella henselae*, *Bartonella clarridgeiae* and the 16S rRNA gene types of *Bartonella henselae* among pet cats in Japan. *J Vet Med Sci* 2000;62:273-9.
95. Jameson P, Greene C, Regnery R. Prevalence of *Bartonella henselae* antibodies in pet cats throughout regions of North America. *J Infect Dis* 1995;172:1145-9.
96. Akkaya Y. Kırsal bölgelerde risk oluşturan meslek gruplarında çalışan yetişkinlerde *Bartonella henselae* ve *Bartonella baciliformis*'e karşı oluşan antikor seroprevalansının araştırılması (Tıpta Uzmanlık Tezi). Denizli: Pamukkale Üniversitesi; 2011.

97. Metzkor-Cotter E, Kletter Y, Avidor B, et al. Long-term serological analysis and clinical follow-up of patients with cat scratch disease. *Clin Infect Dis* 2003;37:1149-54.
98. Kiriş Satılmış Ö, Akaya Y, Ergin Ç, Kaleli İ, Dursun B, Aydın Ç. Böbrek nakil alıcılarının serum ve plazma örneklerinde *Bartonella henselae* antikörlerinin araştırılması. *Mikrobiyol Bul* 2012;46:568-74.
99. Sander A, Posselt M, Oberle K, Bredt W. Seroprevalence of antibodies to *Bartonella henselae* in patients with cat scratch disease and in healthy controls: evaluation and comparison of two commercial serological tests. *Clin Diagn Lab Immunol* 1998;5:486-90.
100. Aksoy M. Aydın ilinde *B.henselae* ve *B.quintana* seroprevelansı ve risk faktörlerinin araştırılması (Tıpta Uzmanlık Tezi). Aydın: Adnan Menderes Üniversitesi; 2011.
101. Lappin MR, Breitschwerdt E, Brewer M, Hawley J, Hegarty B. Prevalence of *Bartonella* species antibodies and *Bartonella* species DNA in the blood of cats with and without fever. *J Feline Med Surg* 2009;11:141-8.
102. Maurin M, Rolain JM, Raoult D. Comparison of in-house and commercial slides for detection by immunofluorescence of immunoglobulins G and M against *Bartonella henselae* and *Bartonella quintana*. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002;9:1004-9.
103. Barka NE, Hadfield T, Patnaik M, Schwartzman WA, Peter JB. EIA for detection of *Rochalimaea henselae*-reactive IgG, IgM and IgA antibodies in patients with suspected cat-scratch disease. *J. Infect. Dis* 1993;167:1503-4.

104. Szelc-Kelly CM, Goral S, Perez-Perez GL, Perkins BA, Regnery RL, Edwards KM. Serologic response to *Bartonella* and *Afipia* antigens in patients with cat-scratch disease. *Pediatrics* 1995;96:1137-42.
105. Altıntaş N, Yolasığmaz A, Yazar S, Şakru N, Kitapçioğlu G. İzmir ve çevresindeki yerleşim bölgelerinde yaşayan insanlarda *Toxoplasma* antikorlarının araştırılması. *Türkiye Parazitol Derg* 1998;22:229-32.
106. Kayran İE, Yılmaz U, Östan İ, Özbilgin A. Manisa yöresinde toxoplasmosis şüpheli kişilerde *Toxoplasma gondii*'ye karşı oluşmuş IgG ve IgM antikorlarının dağılımı. *Türkiye Parazitol Derg* 2002;26:137-9.
107. Hess RD. Routine Epstein-Barr Virus diagnostics the laboratory perspective: Still challenging after 35 years. *J Clin Microbiol* 2004;42:3381-7.
108. McGavran MH, Smith MG. Ultrastructural, cytochemical, and microchemical observations on cytomegalovirus (salivary gland virus) infection of human cells in tissue culture. *Exp Mol Pathol* 1965;76:1-10.
109. Fowler KB, Stagno S, Pass RF, Britt WJ, Boll TJ, Alford CA. The outcome of congenital CMV infection in relation to maternal antibody status. *N Engl J Med* 1992;326:663-7.
110. Maruyama S, Boonnar S, Morita Y, Sakai T, Tanaka S, Yamaguchi F, et al. Seroprevalence of *Bartonella henselae* and *Toxoplasma gondii* among Healthy Individuals in Thailand. *J Vet Med Sci* 2000;62:635-7.