

Bartonella bacilliformis: Uzaktan Gelen Risk Altında mıyız?

Çağrı ERGİN, İlknur KALELİ, Yüksel AKKAYA, Özgün KİRİŞ SATILMIŞ, Cansev YILMAZ
Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

ÖZET

Amaç: *Bartonella bacilliformis* gibi Güney Amerika'da endemik olan ve vektörler ile bulaşan hastalıklar, ülkemizin de içinde bulunduğu Akdeniz ülkeleri coğrafyasında göz ardı edilmektedir. Günümüzde hava yolu taşımacılığı ile vektörlerin aktarımı ve iklim değişiklikleri Güney Amerika'ya ait vektörle bulaşan enfeksiyonlara karşı uyanık olmamızı gerektirmektedir. Serolojik tarama araştırmaları enfeksiyöz hastalıkların varlığını bulmada iyi bir göstergedir. Bu çalışmada, Güney Amerika'da vektörle bulaşan bir etken olan *B. bacilliformis*'in hastaneye başvuran gönüllü kan vericilerinde seroprevalansı incelenmiştir.

Gereç ve Yöntem: Çalışmaya 285 gönüllü kan vericisi alındı. Kan vericilerinin tüm demografik verileri sorgulama formu ile kaydedildi. Tüm serum örnekleri "cut-off" değeri 1/256 kabul edilerek immunfluoresans antikor yöntemi ile çalışıldı.

Bulgular: Araştırmaya alınan 285 serum örneğinin 1'inde (%0.3) pozitif reaksiyon saptandı. Pozitif reaksiyon saptanan gönüllü kan vericisinin mesleğinin kasap olması, kırsal alanda çiftçilik yapması nedeni ile saptanan seropozitiflik çapraz reaksiyon olarak değerlendirildi.

Sonuç: Ülkemizde vektörle bulaşan hastalıkların tehdit ettiği bölgelerde benzer tarama programları, yeni önem kazanacak olan patojenlerin bugünkü varlığı hakkında bilgi verecektir. Ek olarak, riskli bölgelerde az bilinen patojenlere karşı yürütülecek serolojik araştırmalar patojenler hakkında farkındalığı arttıracaktır.

Anahtar kelimeler: *Bartonella bacilliformis*, seroprevalans, kan vericileri, IFA

SUMMARY

Bartonella bacilliformis: Are We at Risk Coming from Far Away?

Objective: The New World's endemic vector-borne diseases such as *Bartonella bacilliformis* infections, are overlooked in the Mediterranean countries. Currently the expansion of the global transport network and the climatic changes alert the world about the emerging vector-borne infections spreading from South America. Serological screening programs are good indicators for the presence of infectious diseases. In this study, the seroprevalence of *B. bacilliformis* which is a new World's vector-borne infectious agent, was investigated in healthy blood donors admitted to the hospital.

Materials and Methods: A total of 285 healthy blood donor volunteers were included in this study. All demographic data about donors were recorded on a questionnaire. All serum samples were studied by immunofluorescence antibody method and the cut-off value was accepted as a 1/256 dilution.

Results: Out of 285 serum samples only one (0.3%) was reactive. The demographic data of this donor revealed that he had a farm in the countryside and was working as a butcher, thus the seropositivity was considered as the result of a possible cross-reactivity.

Conclusion: Similar surveys that will be conducted specifically in the areas under vector-borne threats, will provide valuable information about the real situation of the emerging pathogens in Turkey. In addition, studies which will be performed about the seroprevalence of less-known pathogens in risky areas will raise awareness against pathogens.

Key words: *Bartonella bacilliformis*, seroprevalence, blood donors, IFA

GİRİŞ

Deniz aşırı ve ülkemize uzak bölgelerdeki

endemik enfeksiyonlar Akdeniz havzasındaki ülkeler tarafından ihmal edilerek dikkatlerden kaçmaktadır. Günümüzde uluslararası

Alındığı tarih: 30.05.2013

Kabul tarihi: 28.09.2013

Yazışma adresi: Çağrı Ergin, Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kınıklı Kampüsü / Denizli
e-posta: cagri@pau.edu.tr

havacılık ve taşımacılıktaki gelişmeler ile birlikte iklim değişiklikleri, bölgemizde şimdiye kadar bulunmadığını düşündüğümüz enfeksiyöz etkenlerinin hastalık oluşturmaya olanak tanıyabilir⁽¹⁾. Bu hastalık etkenlerinden biri de Güney Amerika'da Peru'da endemik olan *Bartonella bacilliformis*'dir⁽²⁾.

Bartonella genusu *Brucella* ve *Rickettsia* ile birlikte α -proteobakteri grubunda yer alan, sessiz bir enfeksiyondan yaşamı tehdit eden klinik formlara kadar geniş bir yelpazede hastalık meydana getiren küçük, hareketli, pleomorfik, aerobik kokobasil bakterilerdir⁽²⁻⁵⁾. Etken insanlarda çoğunlukla *Bartonella henselae* ve *Bartonella quintana* (eski adıyla *Rochalimaea quintana*)'dır. Bartonelloz çoğunlukla kedi tırmığı hastalığı ve basiller anjiomatoz klinik tabloları ile ortaya çıkmaktadır. *B. bacilliformis* ise Oroya ateşi (Carrion hastalığı) ve verruga peruana klinik tablolarına neden olur. Carrion hastalığı formunda intravasküler hemoliz ve kardiyovasküler kollapsa bağlı yüksek ölüm oranları ile seyrederek diğer etkenlerden farklı olarak Peru And Dağları'nda endemiktir. Vektörü olan *Lutzomyia* cinsi tatarcıklar bu bölge dışında çok enderdir ve bu nedenle *B. bacilliformis* uzun süre coğrafi olarak sınırlı hastalıklar listesinde kabul edilmiştir^(2,5-7). Ancak bu bölgenin dışında, bildirimlerinden sonra doğruluğu onaylanamayan Bolivya'da, Şili'de ve 1960'larda Tayland'da olgu bildirimleri de bulunmaktadır⁽²⁾. Endemik bölge dışında ilk defa 1996'da Polonya'da *Ixodes ricinus* kenensinden hâlen tam olarak sınıflandırılmayan *B. bacilliformis*-benzeri olarak adlandırılan bir bakteri saptanmış, bu tarihten itibaren kenelerde *Bartonella* taşıyıcılığı sürekli olarak sorgulanmaya başlanmıştır⁽⁸⁻¹¹⁾. Ülkemizde *I. ricinus* yaygın bir kene olmakla birlikte, yalnızca *B. henselae* enfeksiyonu için kene sokması risk grubu olarak tanımlanmıştır^(12,13).

Bartonelloz tanısında immunfluoresans anti-

kor testi (IFAT) Dünya Sağlık Örgütü tarafından toplum taramalarında önerilen yöntemdir. Kolaylıkla ve yaygın kullanılabilir olmasının bir sonucu olarak tüm dünyada bartonelloz etkenlerine dair hızlı bilgi birikimi başlamıştır. *B. bacilliformis*'in endemik olduğu bölgede Kosek ve ark.⁽⁵⁾ yaptıkları araştırmada %77,5 seroprevalans saptamışlar, ancak seropozitif olguların çoğunluğunun asemptomatik olduğunu bildirmişlerdir. Bu durum, özellikle enfeksiyon etkeninin düşünülmediği bölgelerde, olguların gözden kaçırılmasına neden olmaktadır⁽⁷⁾. Sunulan araştırmada Pamukkale Üniversitesi Kan Merkezi'ne başvuran sağlıklı, gönüllü kan vericilerinde *B. bacilliformis* seroprevalansı araştırılmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Araştırmaya Pamukkale Üniversitesi Kan Merkezi'ne başvuran 285 (273 erkek, 12 kadın; yaş aralığı: 18-60) sağlıklı gönüllü kan vericisi alındı (Pamukkale Etik Kurul izni no: 2006/048). Araştırmaya katılan gönüllüler meslek dağılımları, yaş, cinsiyet, yaşam alışkanlıkları, evcil veya vahşi hayvan ile temas, yaşadıkları çevrenin coğrafi özellikleri (sulak alan, kuru tarım vb.), avcılık alışkanlıkları ve seyahat edilen yerler gibi zoonotik hastalıklar için farklı risk faktörlerini içeren sorgulama formunu doldurdular.

Araştırmada *B. bacilliformis* KC583 (ATCC 35685) kullanıldı. Köken, tip II güvenlik kabini içinde %5 defibrine at kanlı beyin-kalp infüzyonu (BKI) agar besiyerlerine ekilerek 45 gün süre ile nem ve %10 CO₂'li etüvde inkübe edildi. *B. bacilliformis*'in Vero hücre kültürlerine ko-kültüvasyonu Zbinden ve ark.⁽¹⁴⁾ tarafından belirtilen şekilde yapıldı. Hücre kültüründe tek tabaka oluşumu sağlandıktan sonra, %5 at kanlı BKI agar besiyerinde üretilen *B. bacilliformis* kökeni, BKI buyyonu ile süspanse edilerek ko-kültüvasyona alındı. Hücreler 37°C'da %10'luk

CO₂ ve nem sağlayan etüvde yaklaşık bir hafta inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda hücreler steril cam tüplere alındı ve benmaride 56°C'da 30 dakika su banyosunda bekletilerek antijen inaktivasyonu sağlandı⁽¹³⁾. Hücreler süspansiyondan 10'ar µl alınarak, teflon kaplı lamalar üzerine yayıldı. Oda ısısında kurutulan yaymalar -20°C'da soğutulmuş asetonda 15 dakika bekletilerek tespit edildi ve çalışma süresine kadar -70°C'da saklandı.

Çalışma kapsamına alınan serum örnekleri için Regnery ve ark.'nın⁽¹⁵⁾ *Bartonella* bakterileri için oluşturduğu protokol uygulandı. Serum örnekleri 1/64 ve üzeri dilüsyonlarda çalışıldı. *B. bacilliformis* antikorları varlığı hücre kültürü serisinden hazırlanan antiijenlerle kaplanmış lamalar üzerinde indirekt IFAT ile araştırıldı. Chamberlin ve ark.'nın⁽¹⁶⁾ spesifite ve sensitivitenin birlikte yüksek olduğunu belirttikleri 1/256 ve üzerinde (++) reaksiyon pozitif olarak kabul edildi. İstatistik analiz için MiniTab Ver 16.1 programı kullanıldı.

Bu araştırma Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (2007TPF008) tarafından kısmen desteklenmiştir.

BULGULAR

B. bacilliformis antikorları araştırmaya alınan 285 gönüllü kan vericisinin serumunda 1/64 dilüsyonda %4.2; 1/128'de %0.7 ve 1/256'da %0.3 oranında reaktif olarak saptandı.

Araştırmaya alınan grupta 1/256 dilüsyonda pozitiflik saptanan bir olgunun mesleği kasaplıktı, büyükbaş hayvan yetiştiriciliği ve tarım ile uğraşmaktaydı. Bağ ve bahçe çalışmaları nedeni ile bahar ve yaz dönemlerinde sulak arazide sıklıkla geceliyordu. Yurt dışına çıkış öyküsü bulunmaktaydı.

TARTIŞMA ve SONUÇ

Bartonelloz tüm dünyada yaygın bir enfeksiyondur. *B. bacilliformis* dünyada özellikle yüksek rakımlı yerleşimlerin bulunduğu Peru, Kolombiya, Brezilya ve Ekvador'da görülür. İklim özellikleri ve buna bağlı vektörlerin dağılımı epidemiyolojide etkindir. Vektör *Lutzomyia verrucosum*, *L. columbiana* ve *L. peruensis*'dir. Bu tatarcık grubu sınırlı nem ve yükseklik özelliği gösteren coğrafi bölgelerde yaşar^(2,6,7). Havayolu gibi denizaşırı insan ve yük taşımacılığı sırasında, özellikle layşmanyaz vektörü *L. longipalpis*'in Güney Amerika'dan Akdeniz havzasına taşınması yeni dünya ile sınırlı vektörlerin yayılabileceğini göstermektedir. Vektörün bu coğrafyaya adaptasyonu bilinmemektedir⁽¹⁾. Araştırmanın yapıldığı bölgede ise baskın tatarcık cinsi *Phlebotomus neglectus* ve *P. papatasi*'dir, *Lutzomyia* sp. bulunmamaktadır⁽¹⁷⁾. Ulaşılabilen literatürde henüz ülkemizde *Lutzomyia* sp. varlığını bildiren yayına rastlanmamıştır.

Bartonella bakterilerinin vektör ve konakta bulunmalarının organizmanın evrim aşamasına bağlı olması, buna rağmen farklı konak adaptasyonunu yapabileceği, farklı cinsler arasında enfeksiyon etkeninin aktarılabilmesi bildirilmiştir. Ana vektör olan *Lutzomyia* sp. ile *B. bacilliformis* konak adaptasyonu ve bunu etkileyen faktörler henüz yeterince aydınlatılmamıştır^(6,18,19). *Bartonella* sp. bakterilerinin kene vektörlüğü ile dağılımı kabul edilmekle birlikte, *B. bacilliformis* için bu hâlen tartışmalı bir konudur⁽⁹⁻¹¹⁾. Polonya'da 1996'da bir keneden *B. bacilliformis*-benzeri bakteri tanımlanmasından sonra, etkenin yayılmasında farklı vektörlerin de rol alabileceği sorgulanmaya başlanmıştır. *Bartonella* kökenlerinin vektör olabileceği ve/veya bulunabileceği çeşitli kan emen artropodlar arasında pireler (*Pulex irritans*, *Ctenocephalides felis*, *Ctenocephalides nobilis*), insan vücut biti (*Pediculus humanus corporis*), çeşitli sert keneler (*Dermacentor* sp., *Rhipicephalus*

sanguineus, *Haemaphysalis* sp.), çeşitli geyik sinekleri (*Lipoptena cervi*, *L. mazamae*) ve çeşitli kan emen sinekler bulunmaktadır⁽¹⁹⁾. Bu nedenle sunulan araştırmada serumda 1/256 ve 1/128 dilüsyonlarda pozitif reaksiyonların bulunması, çapraz reaksiyonu göz ardı etmeksizin, bölge-*Bartonella* kökenlerinin vektör olabilecek canlılarda taranması gerekliliğini de göstermektedir.

B. bacilliformis'in tanısında sıklıkla kullanılan antikor tarama yöntemlerinin en önemli sorunu antijenik proteinlerin değişkenliği, immüdominant proteinlerin tür içindeki farklılıklarıdır^(20,21). Bu durum diğer *Bartonella* türleri ile meydana gelen enfeksiyonlarda da tanısız sorun oluşturabilmektedir. Benzer şekilde rutin taramada kullanılan *Bartonella henselae* ATCC 49882 (Houston-1) ile *Bartonella henselae* CIP 104756 (Marsilya) kökenlerinin kullanıldığı taramalarda antikorların her kökene ayrı reaksiyon verdiği görülmektedir. Sorun "yanlış negatiflik" olarak ortaya çıksa da, ortamdaki antijenik farklılık, farklı cinsler ile meydana gelen çapraz reaksiyonların ortaya çıkmasına da neden olacaktır. Hücre yapısındaki bütün antijenik fraksiyonların birlikte kullanıldığı IFA yöntemi ile araştırılan bartonelloz etkenlerinin hemen hemen hepsi *Coxiella burnettii*, *Chlamydia pneumoniae*, *Rickettsia* sp., *Francisella tularensis*, *Brucella melitensis*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Treponema pallidum*, *Leptospira* sp., *Bordetella pertusis* ve *Borrelia* sp. ile çapraz reaksiyon verebilmektedir^(16,18,19,22). Sunulan araştırmada standart *B. bacilliformis* KC583 kökeni ile serumunda 1/256 dilüsyonda reaksiyon saptanan gönüllünün kasaplık yapması nedeni ile farklı zoonotik etkenler ile temasının olabileceği ve yaşam ortamı, saptanan pozitif reaksiyonun çapraz reaksiyon olabileceği düşüncesini ön plana çıkarmaktadır. Her ne kadar farklı araştırmalarda 1/64 "cut-off" dilüsyon oranının enfeksiyon lehine yorumlanması önerilmekteyse de, laboratuvar

farklı yöntemler (kültür, PCR vb.) ile etkenin saptandığı hastalarda bu oran 1/256 ve yukarısı olarak belirtilmektedir⁽¹⁶⁾. Seropozitiflik oranı endemik bölgedeki sağlıklı bireylerde %45 olarak rapor edilmiştir. Sağlıklı bireylerin %92'sinde antikor titresi $\leq 1/128$ 'dir⁽¹⁶⁾. Bu durum endemik olmayan bölgelerde "cut-off" değerinin yeniden irdelenmesi gerekliliğini ortaya çıkarmaktadır. Endemik bölgenin dışında benzer araştırmaların yapılmaması bu sorunun devam etmesine neden olmaktadır.

Bartonellozun yayılımında coğrafi yapıya bağlı olarak vektörlerin bölgesel dağılımı ve davranışları, bölge halkının yaşam özellikleri önemli role sahiptir. Benzer araştırmaların yapılması, çok farklı coğrafya özelliklerine sahip olan ülkemizde, henüz varlığını düşünmediğimiz hastalık etkenlerinin gerçek durumları hakkında bize bilgi verecektir.

KAYNAKLAR

1. Costa CH, de Miranda-Santos IK. Aircraft and risk of importing a new vector of visceral leishmaniasis. *Emerg Infect Dis* 2011; 17:1333-4. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1707.102002>
2. Sanchez Clemente N, Ugarte-Gil CA, Solórzano N, et al. *Bartonella bacilliformis*: a systematic review of the literature to guide the research agenda for elimination. *PLoS Negl Trop Dis* 2012; 6:e1819.
3. Chomel BB, Boulouis HJ, Maruyama S, Breitschwerdt EB. *Bartonella* sp. in pets and effect on human health. *Emerg Infect Dis* 2006; 12:389-94. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1203.050931>
4. Karem KL, Paddock CD, Regnery RL. *Bartonella henselae*, *B. quintana*, and *B. bacilliformis*: historical pathogens of emerging significance. *Microb Infect* 2000; 2:1193-205. [http://dx.doi.org/10.1016/S1286-4579\(00\)01273-9](http://dx.doi.org/10.1016/S1286-4579(00)01273-9)
5. Kosek M, Lavarello R, Gilman RH, et al. Natural history of infection with *Bartonella bacilliformis* in a non-endemic population. *J Infect Dis* 2000; 182:865-72. <http://dx.doi.org/10.1086/315797>
6. Chomel BB, Boulouis HJ, Breitschwerdt EB, et al. Ecological fitness and strategies of adaptation of *Bartonella* species to their hosts and vectors. *Vet Res* 2009; 40:29. <http://dx.doi.org/10.1051/vetres/2009011>
7. Lamas C, Curi A, Bóia M, 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. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762008000300001>

8. **Hercík K, Hášová V, Janeček J, Branny P.** Molecular evidence of *Bartonella* DNA in ixodid ticks in Czechia. *Folia Microbiol (Praha)* 2007; 52:503-9. <http://dx.doi.org/10.1007/BF02932111>
9. **Angelakis E, Billetter SA, Breitschwerdt EB, Chomel BB, Raoult D.** Potential for tick-borne bartonellosis. *Emerg Infect Dis* 2010; 16:385-91. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1603.081685>
10. **Billetter SA, Levy MG, Chomel BB, Breitschwerdt EB.** Vector transmission of *Bartonella* species with emphasis on the potential for tick transmission. *Med Vet Entomol* 2008; 22:1-15. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2915.2008.00713.x>
11. **Telford SR, Wormser GP.** *Bartonella* sp. transmission by ticks not established. *Emerg Infect Dis* 2010; 16:379-84. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1603.090443>
12. **Gargılı A.** Kenelerin vektörlüğü ve Türkiye’de durum. *ANKEM Derg* 2009; 23(Ek-2):249-52.
13. **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.
14. **Zbinden R, Michael N, Sekulovski M, von Graevenitz A, Nadal D.** Evaluation of commercial slides for detection of immunoglobulin G against *Bartonella henselae* by indirect immunofluorescence. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1997; 16:648-52. <http://dx.doi.org/10.1007/BF01708554>
15. **Regnery RL, Olson JG, Perkins BA, Bibb W.** Serological response to “*Rochalimaea henselae*” antigen in suspected cat-scratch disease. *Lancet* 1992; 339:1443-5. [http://dx.doi.org/10.1016/0140-6736\(92\)92032-B](http://dx.doi.org/10.1016/0140-6736(92)92032-B)
16. **Chamberlin J, Laughlin L, Gordon S, Romero S, Solórzano N, Regnery RL.** Serodiagnosis of *Bartonella bacilliformis* infection by indirect fluorescence antibody assay: test development and application to a population in an area of bartonellosis endemicity. *J Clin Microbiol* 2000; 38:4269-71.
17. **Özensoy Töz S, Şakru N, Ertabaklar H, Demir S, Şengül M, Özbel Y.** Serological and entomological survey of zoonotic visceral leishmaniasis in Denizli Province, Aegean region, Turkey. *New Microbiol* 2009; 32:93-100.
18. **Kaiser PO, Riess T, O’Rourke F, Linke D, Kempf VA.** *Bartonella* sp.: throwing light on uncommon human infections. *Int J Med Microbiol* 2011; 301:7-15. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijmm.2010.06.004>
19. **Tsai YL, Chang CC, Chuang ST, Chomel BB.** *Bartonella* species and their ectoparasites: selective host adaptation or strain selection between the vector and the mammalian host? *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2011; 34:299-314. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cimid.2011.04.005>
20. **Lydy SL, Eremeeva ME, Asnis D, et al.** Isolation and characterization of *Bartonella bacilliformis* from an expatriate Ecuadorian. *J Clin Microbiol* 2008; 46:627-37. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.01207-07>
21. **Riess T, Raddatz G, Linke D, Schäfer A, Kempf VA.** Analysis of *Bartonella* adhesin A expression reveals differences between various *B. henselae* strains. *Infect Immun* 2007; 75:35-43. <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.00963-06>
22. **Litwin CM, Johnson JM, Martins TB.** The *Bartonella henselae* *sucB* gene encodes a dihydroli-poamide succinyltransferase protein reactive with sera from patients with cat-scratch disease. *J Med Microbiol* 2004; 53:1221-7. <http://dx.doi.org/10.1099/jmm.0.45616-0>