ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΙΑΤΡΙΚΟ ΤΜΗΜΑ
ΤΟΜΕΑΣ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
Εργαστήριο Βακτηριολογίας Παρασιτολογίας
Ζωονόσων και Γεωγραφικής Ιατρικής

ΟΙΚΟΓΕΩΓΡΑΦΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΕΝΔΗΜΙΚΟΥ ΤΥΦΟΥ ΚΑΙ ΤΩΝ ΜΠΑΡΤΟΝΕΛΛΩΣΕΩΝ ΣΤΗΝ ΚΥΠΡΟ

ΠΑΠΑΕΥΣΤΑΘΙΟΥ ΑΝΔΡΕΑΣ
Κτηνίατρος
Διδακτορική διατριβή
ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2008

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

Περιεχόμενα ii

Α. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ 1

1.1. ΡΙΚΕΤΣΙΕΣ 7

1.1.1. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ 7

1.1.2. ΒΑΚΤΗΡΙΟΛΟΓΙΑ 11
1.1.2.1. Μορφολογία και χρώσεις 11
1.1.2.2. Μεταβολισμός 12
1.1.2.3. Καλλιέργεια 14

1.1.3. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΡΙΚΕΤΣΙΩΝ 16
1.1.3.1. **Γονοτυπική ταυτοποίηση** 16

1.1.4. Ο ΕΝΔΗΜΙΚΟΣ ΤΥΦΟΣ και η *R.TYPHI* (*R.mooseri*) 18

1.1.5. ΟΙΚΟΛΟΓΙΑ –ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ 20
1.1.5.1. Κύκλος ζωής 20
1.1.5.2. Μετάδοση στον άνθρωπο 21
1.1.5.3. Ο ρόλος των ψύλλων στην οικολογία και τη μετάδοση του Ε.Τ 22
1.1.5.4. Ο ρόλος των αρουραίων στην οικολογία και τη μετάδοση του ενδημικού τύφου 25
1.1.5.5. Άλλα θηλαστικά, πιθανά υπόδοχα του ΕΤ 26

1.1.6. ΓΕΩΓΡΑΦΙΚΗ ΚΑΤΑΝΟΜΗ 27

1.1.7. ΕΠΟΧΙΑΚΗ ΚΑΤΑΝΟΜΗ 27

1.1.8. ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ 28

1.1.9. ΟΜΑΔΕΣ ΥΨΗΛΟΥ ΚΙΝΔΥΝΟΥ 30

1.1.10. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ 31
1.1.10.1. Άμεση διάγνωση 31
1.1.10.1.1. Απομόνωση βακτηρίου με καλλιέργια 31
1.1.10.1.1.1. Ταχεία καλλιέργεια ρικετσιών από τα κυκλοφορούντα μονοκύτταρα του αίματος (Τεχνική shell-vial) 31
1.1.10.1.2 Ανίχνευση ρικετσιών 32
1.1.10.1.2.1. Ανίχνευση ρικετσιών με άμεσο ανοσοφθορισμό 32
1.1.10.1.2.2. Η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) και PCR-RFLP 33
1.1.10.2.Έμμεση διάγνωση 34

1.1.11. ΘΕΡΑΠΕΙΑ 36

1.1.12. ΠΡΟΦΥΛΑΞΗ – ΠΡΟΛΗΨΗ 37

1.1.13. *RICKETTSIA FELIS* 38

1.2. ΜΠΑΡΤΟΝΕΛΛΕΣ 42

1.2.1 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ 42

1.2.2. ΒΑΚΤΗΡΙΟΛΟΓΙΑ 45
1.2.2.1. Μορφολογία και χρώσεις 45
1.2.2.2. Καλλιέργια 46

1.2.3. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ 48
1.2.3.1. Γονοτυπική ταυτοποίηση 48

1.2.4. ΟΙΚΟΛΟΓΙΑ-ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ 49
1.2.4.1. Κύκλος μετάδοσης των μπαρτονελλών 51
1.2.4.1.1. Ενοφθαλμισμός ξενιστών και κυκλοφορία στο αίμα 51
1.2.4.1.2. Εκμετάλλευση των ερυθροκυττάρων 52
1.2.4.2. Μπαρτονέλλες με ξενιστή γάτα ή σκύλο 54
1.2.4.3. Τρωκτικά σαν ξενιστές Μπαρτονέλλας 57
1.2.4.4. Αρθρόποδα-Μεταβιβαστές 59

1.2.5. ΓΕΩΓΡΑΦΙΚΗ ΚΑΤΑΝΟΜΗ 64

1.2.6. ΜΠΑΡΤΟΝΕΛΛΩΣΕΙΣ 65
1.2.6.1. Μπαρτονελλώσεις στον άνθρωπο 65
1.2.6.1.1. Νόσος του Carrion 67
1.2.6.1.2. Πυρετός των χαρακωμάτων 67
1.2.6.1.3. Νόσος εξ' ονύχων γαλής (ΝΕΟΓ)- Cat scratch disease (CSD) 68
1.2.6.1.4. Ενδοκαρδίτιδα 71
1.2.6.2. Μπαρτονελλώσεις στις γάτες 72
1.2.6.3. Μπαρτονελλώσεις στα σκυλιά 72

1.2.7. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ 76
1.2.7.1. Απομόνωση βακτηρίου με καλλιέργεια 77
1.2.7.2. Ανίχνευση μπαρτονελλών με ανοσοφθορισμό 77
1.2.7.3. Μέθοδοι μοριακής βιολογίας 78

1.2.8. ΘΕΡΑΠΕΙΑ 79
1.2.8.1. Ανθρωποι 79
1.2.8.2. Γάτες 80
1.2.8.3. Σκυλιά 82

1.2.9. ΠΡΟΦΥΛΑΞΗ – ΠΡΟΛΗΨΗ 83

Β. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ 85

2.1. ΜΕΛΕΤΗ ΣΕ ΘΗΛΑΣΤΙΚΑ-ΞΕΝΙΣΤΕΣ 86
2.1.1. Οροεπιδημιολογική μελέτη σε ζώα (τρωκτικά και γάτες) 86
2.1.2. Γονοτυπική ανίχνευση και ταυτοποίηση των υπό μελέτη παθογόνων σε δείγματα αίματος από σπονδυλωτούς ξενιστές (τρωκτικά, γάτες) 86

2.2. ΜΕΛΕΤΗ ΣΤΑ ΑΡΘΡΟΠΟΔΑ 87
2.2.1. Γονοτυπική ανίχνευση και ταυτοποίηση *Rickettsia* sp και *Bartonella* sp στα αρθρόποδα-μεταβιβαστές 87

2.3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ 88
2.3.1. Δειγματοληψίες 88
2.3.1.1. Τρωκτικά 88
2.3.1.2. Γάτες 91
2.3.1.3. Εκτοπαράσιτα
2.3.2. Εργαστηριακός Έλεγχος 91
2.3.2.1. Συντήρηση δειγμάτων 91
2.3.2.1.1. Πρωτόκολο 92
2.3.2.2.Έμμεσος Ανοσοφθορισμός 92
2.3.2.2.1.Υλικά 92
2.3.2.2.2.Πρωτόκολο 92
2.3.2.3. Εξαγωγή Γενετικού υλικού (DNA Extraction) 93
2.3.2.4. Έλεγχος με τη μέθοδο Αντίδραση Αλυσιδωτής Πολυμεράσης (PCR) 97
2.3.2.4.1. Υλικά
2.3.2.4.2. Πρωτόκολο 97
2.3.2.5. Ηλεκτροφόρηση DNA – Εξαγωγη DNA από Πηκτή Αγαρόζης 98
2.3.2.5.1. Υλικά 98
2.3.2.5.2. Πρωτοκολο 99
2.3.2.6. Ταυτοποίηση των υπό μελέτη παθογόνων με τη μέθοδο PCR-RFLP [Restriction fragment length polymorphism] 99
2.3.2.6.1. Υλικά 100
2.3.2.6.2. Πρωτοκολο 100
2.3.2.7. Ταυτοποίηση των υπό μελέτη παθογόνων με τη μέθοδο *PCR- Sequencing analysis* 100
2.3.3. Στατιστική ανάλυση 102
2.3.4. Μηχανογραφημένη Χαρτογράφηση 102
2.3.5. Καταχώρηση και ανάλυση των αποτελεσμάτων - Δημιουργία βάσης δεδομένων 103

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ 105

3.1. ΜΕΛΕΤΗ ΣΕ ΘΗΛΑΣΤΙΚΑ-ΞΕΝΙΣΤΕΣ 105

3.1.1. Οροεπιδημιολογική μελέτη 105
3.1.1.1. Αποτελέσματα στα τρωκτικά 105
3.1.1.2. Γεωγραφική κατανομή των τρωκτικών ανά επαρχία 107
3.1.1.3. Αποτελέσματα ορολογικού ελέγχου στα τρωκτικά 112
3.1.1.3.1. *Rickettsia typhi* 112
3.1.1.3.2. *Bartonella henselae* 116
3.1.1.4. Αποτελέσματα στις γάτες 119
3.1.1.5. Αποτελέσματα ορολογικού ελέγχου στις γάτες 119
3.1.1.5.1. *B.henselae* 119
3.1.1.5.2. *R.typhi* 121
3.1.1.6. Γονοτυπική ανίχνευση και ταυτοποίηση *Rickettsia* sp και *Bartonella* sp στα θηλαστικά -ξενιστές 122
3.1.1.6.1. Τρωκτικά 122
3.1.1.6.2. Γάτες 123

3.2. ΜΕΛΕΤΗ ΣΤΑ ΑΡΘΡΟΠΟΔΑ 126
3.2.1. Επιδημιολογική μελέτη 126
3.2.1.1. Εκτοπαράσιτα των τρωκτικών 126
3.2.1.2. Εκτοπαράσιτα που παρασιτούσαν σε γάτες 132
3.2.1.3. Γονοτυπική ανίχνευση και ταυτοποίηση *Rickettsia* sp και *Bartonella* sp στα αρθρόποδα μεταβιβαστές 132
3.2.1.3.1. Ψύλλοι των τρωκτικών 132
3.2.1.3.2. Ανίχνευση και τυποποίηση ρικετσιακών στελεχών σε ψύλλους που παρασιτούσαν τρωκτικά 132
3.2.1.3.3. Γονοτυπική ταυτοποίηση της *R.typhi* 133
3.2.1.3.4. Γονοτυπική ταυτοποίηση της *R.felis* 133
3.2.1.3.5. Ανίχνευση και τυποποίηση *Bartonella* sp σε ψύλλους που παρασιτούσαν τρωκτικά 136
3.2.1.4. Γονοτυπική ανίχνευση και τυποποίηση *Rickettsia* spp και *Bartonella* spp στους ψύλλους που παρασιτούσαν σε γάτες 138

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ 140

5. ΠΕΡΙΛΗΨΗ 164

6. ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ 174

7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ 177

8. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 192

Α. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι λοιμώξεις που μεταδίδονται από αρθρόποδα (arthropod-borne infections) είναι λοιμώξεις στις οποίες στη σχέση παθογόνου παράγοντα και θηλαστικού ξενιστή παρεμβάλλεται αρθρόποδο-μεταβιβαστής του οποίου ο ρόλος στη διασπορά του παθογόνου είναι σημαντικός. Από τις λοιμώξεις βακτηριακής αιτιολογίας που έχουν σαν μεταβιβαστές τους ψύλλους (flea-borne bacterial diseases) σημαντικότερες και με παγκόσμια κατανομή είναι ο ενδημικός τύφος (*Rickettsia typhi*), ο fleabome κηλιδώδης πυρετός (*Rickettsia felis*), και οι μπαρτονελλώσεις.

Ο ενδημικός τύφος (ΕΤ) ή μυικός τύφος είναι μια ζωονόσος με παγκόσμια κατανομή και αποτελεί μία από τις πιο διαδεδομένες ρικετσιώσεις στον κόσμο. Ο αιτιολογικός παράγοντας της νόσου είναι η *R.typhi* (*R.mooseri*), ένα υποχρεωτικά ενδοκυττάριο Gram αρνητικό βακτήριο που ανήκει στην ομάδα του τύφου (ΟΤ) του γένους Rickettsia της οικογένειας Rickettsiaceae.Στις περισσότερες περιπτώσεις ο ΕΤ δεν διακρίνεται στην κλινική πράξη απο άλλα εμπύρετα νοσήματα, η διάγνωσή του ξεφεύγει και τα περιστατικά δεν καταγράφονται. Η *R.typhi* διατηρείται στη φύση μέσω ενός κύκλου που περιλαμβάνει τρωκτικά και τα εκτοπαράσιτά τους Τα κύρια υπόδοχα της είναι οι επίμυες (αρουραίοι) του γένους Rattus.. Άλλα είδη τρωκτικών, γάτες, σκύλοι αναφέρονται ως υπόδοχα των ρικετσιών ΕΤ σε διάφορα μέρη του κόσμου. Ο κύριος μεταβιβαστής είναι ο ψύλλος *Xenopsylla cheopis*. Στις ΗΠΑ (Τέξας, Καλιφόρνια), ο ψύλλος της γάτας *Ctenoceplalides felis* θεωρείται επίσης ως μεταβιβαστής της R. typhi. Ο άνθρωπος μολύνεται κυρίως με ρικέτσιες που βρίσκονται στα περιττώματα ή στους ιστούς ψύλλων μέσω του αναπνευστικού συστήματος, του επιπεφυκότος ή μέσω εκδορών και ανοικτών πληγών του δέρματος. Μολυσμένα κόπρανα ή ιστοί ψύλλων αντέχουν στο περιβάλλον και παραμένουν μολυσματικά για χρόνια (θεωρείται παράγοντας βιοτρομοκρατίας). Κατά κανόνα ο ενδημικός τύφος είναι μια καλοήθης λοίμωξη, που σπανίως εμφανίζει επιπλοκές. Το μεγαλύτερο ποσοστό των ασθενών δεν νοσηλεύεται. Σύμφωνα με τον Traub « Ο ενδημικός τύφος αντιπροσωπεύει ένα καλό παράδειγμα μιας νόσου που κανείς δεν εκτιμά επαρκώς τη σημασία της, εκτός από τον ασθενή, και ακόμα και σήμερα, στα

περισσότερα μέρη του κόσμου κανείς δεν ξέρει πόσο μας ταλαιπωρεί γιατί δεν τίθεται η διάγνωση».

Η *R.felis* είναι ένα παθογόνο είδος ρικέτσιας της ομάδας των κηλιδωδών πυρετών, που έχει πρόσφατα περιγραφεί και θεωρείται «αναδυόμενο» (emerging) παθογόνο. Ανιχνεύτηκε για πρώτη φορά το 1992 στην Καλλιφόρνια και πρόσφατα τυποποιήθηκε στην Ευρώπη (Γαλλία), και κατατάχτηκε στην ομάδα των κηλιδωδών πυρετών. Έχει συσχετιστεί με τον ψύλλο της γάτας *Ctenocephalides felis*,αλλά υπάρχουν πολλά ερωτηματικά για την επιδημιολογία του.

Οι μπαρτονελλώσεις έχουν παγκόσμια κατανομή και ο επιπολασμός τους και η σημασία τους διαφέρει ανάλογα με τη γεωγραφική περιοχή. Στον κύκλο μετάδοσης των μπαρτονελλών εμπλέκονται αρθρόποδα και θηλαστικά. Η κατανόηση της οικολογίας και της επιδημιολογίας των μπαρτονελλώσεων είναι πολύ φτωχή. Τα τελευταία χρονια πολλά είδη μπαρτονέλλας έχουν απομονωθεί από ένα ευρύ φάσμα θηλαστικών συμπεριλαμβανομένου του ανθρώπου και των αγρίων ζώων. Πρόσφατα, έχει αποδειχθεί η δυνατότητα μόλυνσης του ανθρώπου από μπαρτονέλλες που σχετίζονται με τρωκτικά και έχει επισημανθεί η ολοένα αυξανόμενη σχέση αυτών των στελεχών μπαρτονέλλας με την πρόκληση νόσου σε ανθρώπους. Σε διάφορες περιοχές στη Ευρώπη, την Αφρική και τη Β.Αμερική βρέθηκαν αρκετά novel species ή μη κατατάξιμα στελέχη μπαρτονέλλας (unnamed varieties of Bartonella). Η πιθανότητα κάποια απ' αυτά τα στελέχη να είναι παθογόνα για τον άνθρωπο δεν μπορεί να αποκλειστεί. Υπάρχουν ακόμα πολλοί άγνωστοι παράγοντες που συνδέονται με την οικολογία και την επιδημιολογία αυτών των ειδών. Ελάχιστες γνώσεις υπάρχουν για τον τρόπο μετάδοσης αυτών των ειδών και τους πιθανούς εμπλεκόμενος μεταβιβαστές, καθώς και για τις πηγές μόλυνσης για τον άνθρωπο. Η ανίχνευση και ο χαρακτηρισμός νέων Bartonella species, ειδικά σε ζώα που έχουν πιθανή επαφή με τον άνθρωπο, μπορεί να βοηθήσει στον χαρακτηρισμό νέων παθογόνων για τον άνθρωπο. Τα διάφορα είδη της μπαρτονέλλας μεταδίδονται μέσω αρθροπόδων μεταβιβαστών .Για λίγα μόνο είδη έχουν προσδιοριστεί οι μεταβιβαστές: π.χ. η φλεβοτόμος (*Lutzomyia verrucarum*) για την *B. bacilliformis*, η ανθρώπινη ψείρα (*Pediculus humanus*) για την B. quintana, ο ψύλλος της γάτας (Ctenocephalides felis) για την *B. henselae*. Ο χαρακτηρισμός προσφάτως του γενώματος στελεχών όπως η *B.bacilliformis, Bartonella Quintana* (strain Toulouse), *B. henselae* (strain Houston-1) και *B. tribocorum* επέτρεψε την εφαρμογή

σύγχρονων τεχνικών διάγνωσης και τυποποίησης. Με την εφαρμογή των μεθόδων μοριακής βιολογίας στην ανίχνευση και ταυτοποίηση, τα τελευταία χρόνια προσδιορίστηκαν νέα είδη σε αρθρόποδα των οποίων η παθογόνος δράση στον άνθρωπο παραμένει αδιευκρίνιστη.Η έρευνα είναι σε εξέλιξη και προστίθενται συνεχώς νέα δεδομένα.. Για παράδειγμα, μέχρι πρόσφατα η μόνη φυσική δεξαμενή και ο κύριος μεταβιβαστής για την *B. quintana*, εθεωρείτο η ανθρώπινη ψείρα *Pediculus humanus humanus*. Πρόσφατα, η *B. quintana* έχει ανιχνευτεί και τυποποιηθεί με μεθόδους μοριακής βιολογίας σε γάτες, και στους ψύλλους τους,, καθώς επίσης και σε κρότωνες αναιρώντας έτσι τη συσχέτιση αυτού του είδους μόνο με την ψείρα. Υπάρχουν επίσης πρόσφατες δημοσιεύσεις για το ρόλο των κροτώνων σαν μεταβιβαστών για μερικά από τα στελέχη της μπαρτονέλλας.

Την τελευταία 10ετία διάφορα είδη μπαρτονέλλας έχουν συσχετιστεί με ένα ταχέως αυξανόμενο φάσμα κλινικών συνδρόμων σε ανθρώπους και ζώα. Ενώ μέχρι το 1993 μόνο 3 είδη μπαρτονελλών ήταν γνωστά (*B. bacilliformis, B. quintana, B. henselae*) σήμερα το γένος *Bartonella* περιλαμβάνει περισσότερα από 20 είδη και υποείδη από τα οποία τουλάχιστον 8 είναι παθογόνα για τον άνθρωπο, τα οποία προκαλούν ένα ευρύ φάσμα κλινικών εκδηλώσεων και νόσων. Για παράδειγμα, η *B. quintana*.εθεωρείτο το αίτιο του πυρετού των χαρακωμάτων και συνδέθηκε με τους πολέμους.. Στις μέρες μας δεν απαντάται με αυτή τη μορφή, αλλά θεωρείται «αναδυόμενη νόσος». Την τελευταία δεκαετία οι μολύνσεις από *B.quintana* επανεμφανίστηκαν τόσο στην Ευρώπη, όσο και στις ΗΠΑ κυρίως σε πληθυσμούς αστέγων αστικών περιοχών προκαλώντας σποραδικές περιπτώσεις ενδοκαρδίτιδας βακτηριακής αγγειωμάτωσης χρόνια βακτηριαιμία κλπ Το είδος *B. henselae* (ο αιτιολογικός παράγοντας της νόσου εξ ονύχων γαλής) είναι επίσης ένα «αναδυόμενο» παθογόνο βακτήριο. Είναι χαρακτηριστικό ότι η νόσος αναγνωρίσθηκε ως κλινική οντότητα για πρώτη φορά το 1950 αλλά η αιτιολογία της έμεινε άγνωστη μέχρι το 1992. Η *B. henselae* συνδέεται με τη γάτα που θεωρείται το κύριο υπόδοχό της και τον ψύλλο της γάτας που είναι ο κύριος μεταβιβαστής της. Πρόσφατα, η B. henselae έχει εντοπιστεί σε μια ποικιλία οικόσιτων και άγριων ζώων όπως ο σκύλος, το λιοντάρι, ο πάνθηρας κλπ Πριν 2 περίπου χρόνια εντοπίστηκε και σε θαλάσσια θηλαστικά (φάλαινες)

Τα τελευταία χρόνια, υπάρχει αυξανόμενο ενδιαφέρον παγκόσμια, όσον αφορά σε flea-associated, zoonotic organisms όπως η *R.felis* και *Bartonella* species.

Οι μπαρτονέλλες και κάποια είδη ρικετσιών θεωρούνται αναδυόμενα παθογόνα. Οι σύγχρονες τεχνικές που εφαρμόζονται σήμερα άλλαξαν ριζικά την προσπέλαση των ρικετσιώσεων και των μπαρτονελλώσεων. Η εφαρμογή των μεθόδων μοριακής βιολογίας στην ανίχνευση και ταυτοποίηση έδωσε νέα δεδομένα. Προσδιορίστηκαν νέα είδη (κυρίως σε φυσικούς ξενιστές) για μερικά από τα οποία η παθογόνος δράση στον άνθρωπο παραμένει αδιευκρίνιστη. Νέα στελέχη που θεωρούνταν μη παθογόνα αποδεικνύονται παθογόνα για τον άνθρωπο. Σημαντικά ερωτήματα σε σχέση με την οικογεωγραφία και την επιδημιολογία τους δεν έχουν μέχρι σήμερα απαντηθεί. Οι γνώσεις όσον αφορά στην επιδημιολογία και οικολογία αυτών των βακτηρίων είναι ανεπαρκείς, ιδιαίτερα η σχέση μεταξύ ξενιστών -μεταβιβαστών και μικροοργανισμών. Οι περιβαλλοντολογικές αλλαγές που συμβαίνουν στον πλανήτη συμβάλλουν στην αύξηση της συχνότητας και της διασποράς τους. Η γεωγραφική τους διασπορά εξαρτάται από τη γεωγραφική κατανομή των μολυσμένων ξενιστών τους. Η αύξηση της θερμοκρασίας του περιβάλλοντος έχει σαν συνέπεια να αυξάνει ο ρυθμός αναπαραγωγής των μεταβιβαστών(αρθρόποδα), η συχνότητα με την οποία τσιμπούν, και δημιουργούνται συνθήκες για ταχύτερη ανάπτυξη των λοιμογόνων παραγόντων στο εσωτερικό του σώματος τους. Η εισχώρηση του ανθρωπογενούς περιβάλλοντος στο άγριο φυσικό περιβάλλον και η διαρκώς αυξανόμενη τάση, να καταπατούνται δασικές ή άλλου είδους εκτάσεις που ανέκαθεν ήταν οι βιότοποι άγριων ζώων, έχει σαν συνέπεια την προσαρμογή των αρθροπόδων σε νέα είδη σπονδυλωτών-ξενιστών, τη γειτνίαση τους με τον άνθρωπο και την αυξημένη πιθανότητα επαφής, αλλά και την τροποποίηση των κύκλων μετάδοσης αυτών των λοιμώξεων.

Στην Κύπρο υπάρχουν οι προυποθέσεις για την ανάπτυξη των παραπάνω παθογόνων, αφού οι μεταβιβαστές απαντώνται σε όλες τις επαρχίες της χώρας και επίσης τα υπόδοχα ενδημούν στην Κύπρο, βρίσκονται σε όλες τις περιοχές και είναι καλά προσαρμοσμένα σε κάθε περιβάλλον. Επιπλέον, υφίστανται αυτόχθονες ενδημικές και ενζωοτικές εστίες, υπάρχει εισαγωγή παθογόνων μικροοργανισμών είτε με μολυσμένα άγρια ζώα φορείς παθογόνων (πχ μεταναστευτικά πτηνά), είτε με κατοικίδια /παραγωγικά που εισάγονται παράνομα από την κατεχόμενη Κύπρο. Αντικείμενο της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της επιδημιολογικής αλυσίδας και της οικογεωγραφίας παθογόνων βακτηρίων μεταδιδόμενων μέσω των ψύλλων: του Ενδημικού Τύφου (*Rickettsia typhi*) του fleaborne κηλιδώδους πυρετού (*R. felis*),

και των μπαρτονελλώσεων στην Κύπρο Τα μολυσμένα θηλαστικά-ξενιστές και οι μεταβιβαστές λειτούργησαν σαν δείκτης για να εντοπιστεί και να αναδειχτεί το κάθε παθογόνο

Στην Κύπρο δεν υπήρχαν δεδομένα όσον αφορά στην παρουσία των Bartonella spp. και της *Rickettsia felis*, καθώς και των αρθροπόδων-μεταβιβαστών και θηλαστικών –ξενιστών που εμπλέκονται στον κύκλο ζωής τους, Αντίθετα, προηγούμενες μελέτες που διεξήχθησαν στην Κύπρο από τις Κτηνιατρικές Υπηρεσίες της Κύπρου σε συνεργασία με το Εργαστήριο Κλινικής Βακτηριολογίας, Παρασιτολογίας Ζωονόσων και Γεωγραφικής Ιατρικής της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης είχαν οδηγήσει στο συμπέρασμα ότι ο Ενδημικός Τύφος αποτελεί πρόβλημα υγείας για την Κύπρο. Η πρώτη αναφορά για τον ενδημικό τύφο έγινε το 1996. Κατά τη χρονική περίοδο από το καλοκαίρι του 1996 μέχρι το φθινόπωρο του 1997 καταγράφηκαν 53 κρούσματα ασθενών με Ενδημικό Τύφο. Τα περισσότερα περιστατικά εκδηλώθηκαν με τη μορφή επιδημίας και προέρχονταν από περιοχές γύρω από την πόλη της Λευκωσίας (Psaroulaki 1998). Ο έλεγχος των τρωκτικών και των εκτοπαρασίτων τους που συνελήφθησαν το καλοκαίρι του 1997 απ' αυτήν την περιοχή κατά την επιδημιολογική διερεύνηση των περιστατικών, είχε οδηγήσει στην ανίχνευση της R. Typhi τόσο στους μεταβιβαστές όσο και στα τρωκτικά. Σε οροεπιδημιολογική μελέτη που έγινε το 1997 από το Εργαστήριο Κλινικής Βακτηριολογίας, Παρασιτολογίας Ζωονόσων και Γεωγραφικής Ιατρικής της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης, σε συνεργασία με τις Κτηνιατρικές Υπηρεσίες της Κύπρου σε αντιπροσωπευτικό δείγμα ανθρώπινου πληθυσμού κατανεμημένο σ' όλη την ελεύθερη Κύπρο, ένα υψηλό ποσοστό (47 %) του υγιούς πληθυσμού εμφάνισαν αντισώματα έναντι της R. Typhi. Τα χρόνια που ακολούθησαν αναπτύχθηκε μια σταθερή συνεργασία ανάμεσα στις Κτηνιατρικές Υπηρεσίες της Κύπρου και του Εργαστηρίου Κλινικής Βακτηριολογίας, Παρασιτολογίας Ζωονόσων και Γεωγραφικής Ιατρικής της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης, για την καταγραφή περιστατικών Ενδημικού τύφου. Επιστημονικό και τεχνικό προσωπικό από τις Κτηνιατρικές Υπηρεσίες της Κύπρου (στην υπηρεσία φτάνουν για εργαστηριακή επιβεβαίωση δείγματα ασθενών απ' όλα τα νοσοκομεία της Κύπρου) εκπαιδεύτηκε στο Πανεπιστήμιο Κρήτης, στη διάγνωση των ρικετσιών, ενώ περιστατικά που χρήζουν παραπέρα εργαστηριακής διερεύνησης αποστέλλονται στην Κρήτη. Περίπου 50-60 κρούσματα ενδημικού τύφου

επιβεβαιώνονται εργαστηριακά/ έτος., που όμως είναι μόνο η κορυφή του παγόβουνου, αφού ένα μεγάλο μέρος δεν φτάνουν στις Κτηνιατρικές Υπηρεσίες για έλεγχο. Πρόσφατα, σε συνεργασία της Παιδιατρικής Κλινικής του Μακάριου Νοσοκομείου Λευκωσίας και του Εργαστηρίου Κλινικής Βακτηριολογίας, Παρασιτολογίας Ζωονόσων και Γεωγραφικής Ιατρικής της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης, μελετήθηκαν 23 παιδιατρικοί ασθενείς με ενδημικό τύφο (Koliou *et al.* 2007). Παρ' όλο που όπως αναφέρθηκε η επίπτωση της νόσου είναι υψηλή και φαίνεται να υφίστανται εστίες ενδημικού τύφου στην Κύπρο, υπάρχουν ελλιπή στοιχεία για την επιδημιολογική αλυσίδα και την οικογεωγραφία της R.typhi. Αντίθετα με την καταγεγραμμένη πληροφορία για τον ΕΤ, στην Κύπρο δεν υπάρχουν καθόλου στοιχεία για μια ομάδα αναδυόμενων ζωονόσων των μπαρτονελλώσεων, που αναφέρονται όλο και συχνότερα την τελευταία 10ετία. Δεν υπάρχουν αναφορές και ο επιπολασμός των λοιμώξεων από Bartonella σε ανθρώπους και ζώα είναι άγνωστος. Η παρούσα μελέτη αποτελεί την πρώτη προσπάθεια για αναζήτηση των μπαρτονελλών σε φυσικούς ξενιστές στην Κύπρο.

1.1. ΡΙΚΕΤΣΙΕΣ

1.1.1. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ

Αρχικά η τάξη των *Rickettsiales* περιέλαβε τρεις οικογένειες: *Anaplasmataceae, Bartonellaceae,* και *Rickettsiaceae*. Η οικογένεια των *Rickettsiaceae* περιελάμβανε τρείς «φυλές»: *Wolbachieae, Erlichieae* και *Rickettsieae*. Στη φυλή *Rickettsieae* κατατάχθηκαν αρχικά τρία γένη: *Rochalimea*, *Coxiella* και *Rickettsia*.

Με φαινοτυπικά ταξινομικά κριτήρια τα είδη του γένους *Rickettsia* χωρίστηκαν στη συνέχεια σε 2 ομάδες: α) την ομάδα του Κηλιδώδους Πυρετού β) την ομάδα του Τύφου. Τελευταία με την εφαρμογή των τεχνικών της μοριακής βιολογίας έγινε δυνατή μια ακριβέστερη ταξινόμηση των ρικετσιών. Με βάση αυτήν τη φυλογενετική ταξινόμηση το γένος *Coxiella* απομακρύνθηκε όχι μόνο από την οικογένεια των *Rickettsiaceae* αλλά και από την τάξη των *Rickettsiales*. Το γένος *Rochalimaea* ενώθηκε με το γένος *Bartonella*.

Έτσι η φυλή *Rickettsieae* η οποία περιελάμβανε αρχικά τρία γένη κατέληξε να περιλαμβάνει το γένος *Rickettsia* με τις δυο κλασικές ομάδες: ομάδα του Τύφου και την ομάδα του Κηλιδώδους Πυρετού [Πίνακας 1]. Η *Rickettsia typhi* μαζί με την *Rickettsia prowazekii* και την *Orientia* (WHO *et al.* 1982) *tsutsugamushi* αποτελούν την ομάδα του Τύφου.

1. Ομάδα των εξανθηματικών τύφων (Ο.Τ), που περιλαμβάνει κυρίως τα είδη:

- *R.prowazekii* (επιδημικός τύφος)
- *R.typhi* (ενδημικός τύφος)
- *Orientia tsutsugamushi* (τύφος των θάμνων αρχικά γνωστό ώς *Rikettsia tsutsugamushi*

Τα τρία είδη της ομάδας αυτής έχουν άριστη θερμοκρασία πολλαπλασιασμού τους 35°C, εμφανίζουν διασταυρούμενες αντιδράσεις με τον *Proteus vulgaris OX19* και η μετάδοσή τους γίνεται είτε με την ψείρα του σώματος (*R.prowazekii*) είτε με τους ψύλλους (*R.typhi*).

- **2. Ομάδα των κηλιδωδών πυρετών (Ο.Κ.Π.)**, που περιλαμβάνει σήμερα περισσότερα από 26 είδη που έχουν άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης τους 32°C, δίνουν διασταυρούμενες αντιδράσεις με τον *Proteus vulgaris OX2* (με μοναδική εξαίρεση τη *R.rickettsii* που δίνει διασταυρούμενες αντιδράσεις με τον *Proteus vulgaris OX19*) και μεταδίδονται με διάφορα είδη κροτώνων.

Για την παραπάνω ταξινόμηση των ρικετσιών αρχικά χρησιμοποιήθηκαν ως κριτήρια τα οικολογικά, γεωγραφικά, κλινικά και βακτηριολογικά χαρακτηριστικά της κάθε ομάδας.

Αργότερα, ο προσδιορισμός της αντιγονικής τους σύνθεσης επέτρεψε την ταξινόμησή τους οροτυπικά. Πρόσφατα, η γενετική ανάλυση του γονιδιώματος του γένους *Rickettsia*, επέτρεψε τον ακριβέστερο προσδιορισμό των σχέσεων του γένους αυτού με τα άλλα γένη των βακτηρίων, καθώς και τη γενετική απόσταση των διαφόρων ειδών του γένους μεταξύ τους.

Ο όρος <<*ρικέτσια*>> *ενώ* χρησιμοποιήθηκε στο παρελθόν για να προσδιορίσει την ευρύτερη τάξη των *Rickettsiales*, σήμερα χρησιμοποιείται για να προσδιορίσει τα είδη του γένους *Rickettsia.*

Τα τελευταία χρόνια, με την εφαρμογή των τεχνικών μοριακής βιολογίας έγινε δυνατή η πιο ακριβής ταξινόμηση των ρικετσιών. Η σχέση μεταξύ των γενών προσδιορίστηκε ακριβέστερα με βάση το γονίδιο *16s rRNA* (Fox *et al.* 1980; Weisburg *et al.* 1989). Ο Weisburg αφού καθόρισε τις ταξινομικές σχέσεις των ομάδων και ειδών του γένους, βρήκε, ότι τα είδη του γένους *Rickettsia* τοποθετούνται στην κορυφή της υποδιαίρεσης α των Proteobacteria πορφυρών βακτηρίων. Με βάση τις παραπάνω μελέτες το γένος *Rochalimaea* πρόσφατα ενώθηκε με το γένος *Bartonella* το οποίο επίσης μετακινήθηκε από την τάξη των *Rickettsiales* (Brenner *et al.* 1993). Τελικά, και μετά την νέα αυτή ταξινόμηση, η οικογένεια *Rickettsia*e η οποία περιελάμβανε αρχικά 3 γένη (*Coxiella Rochalimaea* και *Rickettsia*) κατέληξε σήμερα να περιλαμβάνει μόνο το γένος *Rickettsia* με 2 ομάδες: Ομάδα του τύφου ΟΤ, Ομάδα των Κηλιδωδών Πυρετών. Πρόσφατα οι Roux & Raoult με βάση τα αποτελέσματα της αλληλουχίας της 16S rRNA και συνδυάζοντας τα αποτελέσματα των ορολογικών και γονοτυπικών μελετών πρότειναν την παρακάτω ταξινόμηση για το γένος *Rickettsia* [Πίνακας 2] (Roux and Raoult 1995b).

Πίνακας 1: Η υποδιαίρεση του γένους *Rickettsia* στις 2 ομάδες και τα είδη της κάθε ομάδας.

ΓΕΝΟΣ	ΟΜΑΔΑ	ΕΙΔΟΣ
***Rickettsia*e**	**Τύφου**	*R.prowazekii* *R.typhi* *Orientia (WHO et al. 1982) tsutsugamushi*
	Κηλιδωδών Πυρετών	*R.akari* *R.australis* *R.bellii* *R.conorii* *R.helvetica* *R.japonica* *R.montana* *R.parkeri* *R.rhipicephali* *R.rickettsii* *R.sibirica* *R.slovaca* *R.massilia* *Astrakhan fever Rickettsia* *R.africae* *R.israeli* κλπ

Πίνακας 2 : Συνοπτικές ταξινομικές πληροφορίες που αφορούν την ταξινόμηση των ρικετσιών σε ομάδες και είδη. Η ταξινόμηση βασίζεται στα αποτελέσματα της αλληλουχίας της 16S rRNA (10% απόκλιση) και συνδυάζει τα αποτελέσματα των ορολογικών και γονοτυπικών μελετών (Roux and Raoult 1995b).

ΓΕΝΟΣ	ΟΜΑΔΑ	Ισχύουσα ονοματολογία
	Ομάδα I	*R.typhi*
		R.prowazekii
	Ομάδα II	*R. canada*
	Ομάδα III	*R. conorii*
		R. rickettsii
Rickettsia		*R. parkeri*
		R. africae
		R. israeli
	Ομάδα IV	*R. australis*
	Ομάδα V	*R. akari*
	Ομάδα VI	*R. montana*
	Ομάδα VII	*R. massiliae*
	Ομάδα VII	*R. helvetica*
	Ομάδα IX	*R. bellii*

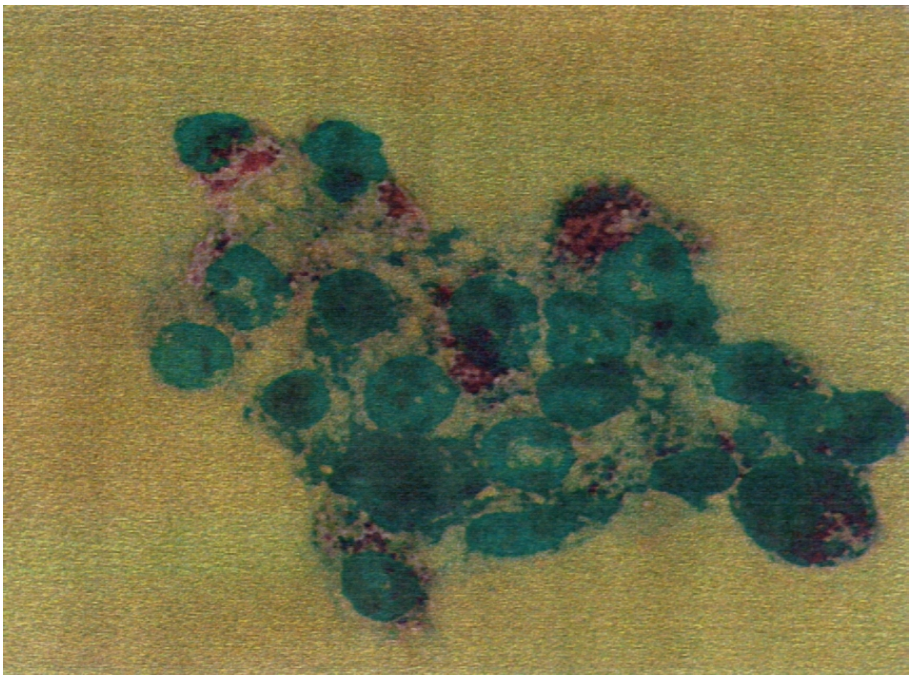
1.1.2. ΒΑΚΤΗΡΙΟΛΟΓΙΑ

1.1.2.1. Μορφολογία και χρώσεις

Οι ρικέτσιες είναι μικρά (0,8-2 μm x 0,3-0,4 μm), ενδοκυττάρια βακτήρια, που άλλοτε εμφανίζονται ως κοκκοβάκιλλοι και άλλοτε ως κόκκοι, μεμονωμένοι ή σε σχηματισμούς. Εμφανίζουν την τυπική δομή των Gram αρνητικών βακτηρίων. Περιβάλλονται από κυτταρικό τοίχωμα, που είναι όμοιο μ' αυτό των άλλων Gram αρνητικών βακτηρίων, με τη διαφορά ότι η εξωτερική στοιβάδα του τοιχώματος καλύπτεται από στρώμα, επικολλημένης σ' αυτήν <<τριχωτής ουσίας>> (slime layer).

Η πεπτιδογλυκάνη, που βρίσκεται στον περιπλασματικό χώρο είναι παρόμοια με εκείνη των Gram αρνητικών βακτηρίων. Στην πεπτιδογλυκάνη των ρικετσιών της ΟΤ έχει παρατηρηθεί η παρουσία μουραμικού οξέος, καθώς και διαμινοπιμελικού οξέος. (Allison and Perkins 1960; Myers *et al.* 1967), ενώ σε άλλες ρικέτσιες απουσιάζει. Οι πρωτεΐνες που συνδέονται με την πεπτιδογλυκάνη είναι ανθεκτικές στην επίδραση των πρωτεασών και φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο στην αντοχή που εμφανίζουν οι μικροοργανισμοί στο περιβάλλον.

Οι λιποπολυσακχαρίτες (ΛΠΣ) των ρικετσιών συνιστούν αντιγόνα ειδικά της ομάδας, εμφανίζουν διαφορές στη χημική τους δομή, ανάλογα με το είδος και εμφανίζουν και ιδιότητες ενδοτοξίνης (Raoult 1988). Ο ΛΠΣ, μαζί με τις πρωτεΐνες 120- και 190-kDa, που τοποθετούνται πάνω στην επιφάνεια της εξωτερικής μεμβράνης με τη μορφή τετράγωνων σχηματισμών, φαίνεται να είναι από τα πιο ανοσογόνα αντιγόνα και είναι το πρώτο αντιγόνο που παρουσιάζεται από τα μακροφάγα (Silverman 1991).



Εικόνα 1. Χρώση Gimenez σε κύτταρα μολυσμένα από *Rickettsia typhi* που απομονώθηκε σε ασθενή (Gimenez 1964)

Οι ρικέτσιες φέρουν γλυκοκάλυκα που αποτελείται από πολυσακχαρίτες (Weiss 1982). Δεν εμφανίζουν κινητικότητα έχουν όμως την ικανότητα να κινούνται μέσα στα κύτταρα και μεταξύ των κυττάρων χρησιμοποιώντας την F - ακτίνη του κυττάρου στο οποίο παρασιτούν (Teysseire *et al.* 1992).

Με χρώση Gram αντιδρούν ελαφρά, όπως τα Gram αρνητικά βακτήρια, ενώ με τη χρώση Giemsa εμφανίζονται κυανές. Ως ειδική χρώση χρησιμοποιείται η χρώση Gimenez (Gimenez 1964), με την οποία βάφονται κόκκινες [Εικόνα 1].

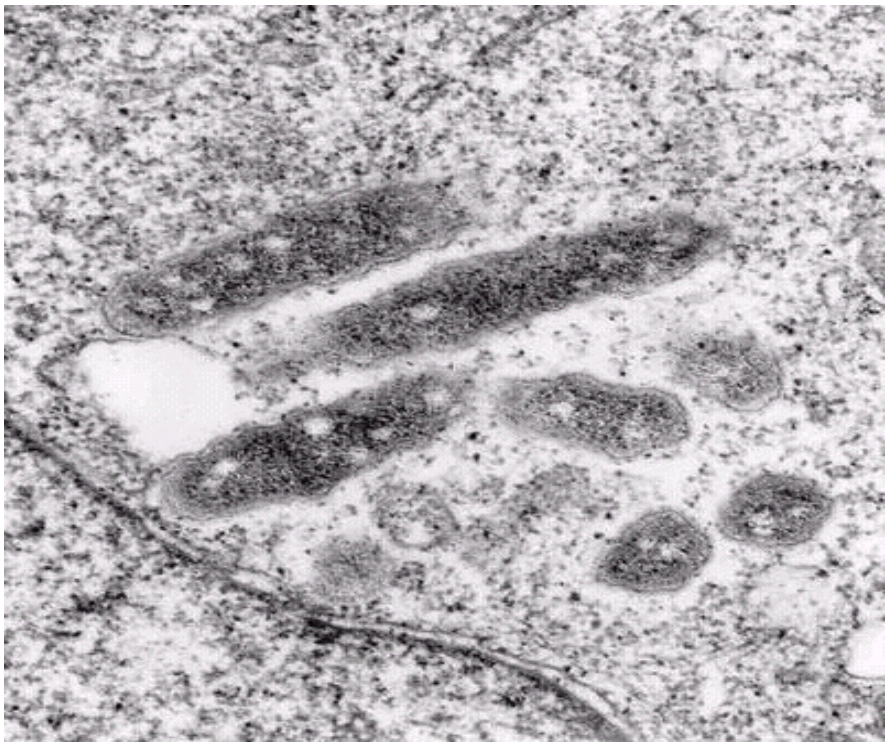
Το γένωμα των ρικετσιών είναι μόνο χρωμοσωμικό και έχει μέγεθος 1200-1300 kb. Δεν έχει παρατηρηθεί η παρουσία πλασμιδίου.

1.1.2.2. Μεταβολισμός

Τα αίτια του υποχρεωτικού ενδοκυτταρικού παρασιτισμού δεν είναι απολύτως γνωστά. Αν και έχουν ένα αυτόνομο μεταβολικό σύστημα που παράγει ενέργεια, εν τούτοις δεν μπορούν να επιζήσουν ελεύθερα, εκτός κυττάρου. Η κυτταρική μεμβράνη τους εμφανίζει αυξημένη διαπερατότητα έτσι ώστε διάφορες ουσίες και μεταβολίτες

να περνούν μέσα και έξω από το κύτταρο, διαμέσου της μεμβράνης με πολύ μεγαλύτερη ελευθερία απ' όση σε άλλα βακτήρια. Χρησιμοποιούν το ATP του κυττάρου του ξενιστή, καθώς επίσης και τα συνένζυμα A, και NAD. Παρόλο που έχουν την ικανότητα να συνθέτουν ATP, προσλαμβάνουν το ATP από το κυτταρόπλασμα του κυττάρου-ξενιστή, μέσω ενός συστήματος ανταλλαγής ATP-ADP που πιθανά εντοπίζεται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη [Εικόνα 2] (Winkler 1976; Winkler and Daugherty 1984). Ο υποχρεωτικά ενδοκυττάριος παρασιτισμός τους επομένως πιθανόν να οφείλεται στο ότι δεν μπορούν να συνθέσουν NAD ή συνένζυμο A και πρέπει να τα προμηθευτούν από το κύτταρο-ξενιστή τους. Διαθέτουν τα δικά τους μεταβολικά ένζυμα, έχουν ένα πλήρη κ.Krebs και πλήρες σύστημα μεταφοράς ηλεκτρονίων.

Ο σχηματισμός των πρωτεϊνών αναστέλλεται από την χλωραμφενικόλη και τις τετρακυκλίνες (Bovarnick *et al.* 1959). Έξω από τα κύτταρα οι ρικέτσιες είναι ασταθείς και χάνουν εύκολα το RNA, τη μεταβολική δραστηριότητα, την τοξικότητα για τα ποντίκια και τη λοιμογόνο τους δύναμη.



Εικόνα 2. Φωτογραφία από ηλεκτρωνικό μικροσκόπιο που απεικονίζει ρικέτσιες σε επαφή με την κυτταροπλασματική μεμβράνη πιθανότατα για την δέσμευση ATP.

1.1.2.3. Καλλιέργεια

Ο πολλαπλασιασμός τους είναι αυστηρά ενδοκυττάριος. Έχουν αναπτυχθεί τριών ειδών συστήματα καλλιέργειας και απομόνωσης που αναφέρονται με την χρονολογική σειρά που εφαρμόστηκαν:

1. πειραματόζωα

Σαν πειραματόζωα έχουν χρησιμοποιηθεί τα ινδικά χοιρίδια και τα ποντίκια, τα οποία εμφανίζουν ευαισθησία στη μόλυνση με ρικέτσιες. Ο ενοφθαλμισμός των ρικετσιών γίνεται συνήθως ενδοπεριτοναϊκά

2. εμβρυοφόρα αυγά όρνιθας

Χρησιμοποιούνται για την απομόνωση και τη μαζική καλλιέργεια των ρικετσιών. Το δείγμα (είτε βιολογικό υλικό από ασθενή είτε από ξενιστή), ενοφθαλμίζεται στη μεμβράνη του εμβρυοφόρου σάκου και διατηρείται σε θερμοκρασία 33,5^{0}C (Bell and Stoenner 1961). Σε 5-7 ημέρες το αυγό πεθαίνει ενώ ο πολλαπλασιασμός των ρικετσιών συνεχίζεται ακόμα για 48 ώρες. Οι ρικέτσιες ανιχνεύονται με την εφαρμογή της χρώσης Gimenez ή με ανοσοφθορισμό (Raoult 1988).

3. κυτταρικές σειρές

Η χρήση κυτταρικών σειρών στην απομόνωση ρικετσιών βασίζεται στην επώαση για μια ώρα του δείγματος, με τον κυτταρικό τάπητα σε θερμοκρασία δωματίου, επιτρέποντας έτσι να εισέλθουν οι ρικέτσιες στα κύτταρα, τα οποία επωάζονται στους 32 με 35^0 C (35^0 C για τις ρικέτσιες της ΟΤ και 32^0 C για τις ρικέτσιες της ΟΚΠ).

Οι κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιούνται είναι :

- τα L929 (ακτινοβολημένα κύτταρα ποντικιού),
- τα Vero (επιθηλιακά νεφρικά κύτταρα πιθήκου), και
- τα Hel (Human embryonic lung), διπλοειδή κύτταρα μορφής ινοβλαστών.

Η προσπάθεια απομόνωσης πολλές φορές είναι ανεπιτυχής, είτε γιατί το δείγμα έχει μολυνθεί και από άλλους βακτηριακούς παράγοντες, είτε γιατί η πυκνότητά του (ποσότητα των ρικετσιών μέσα σ' αυτό) είναι πολύ μικρή.

Οι ρικέτσιες δεν προκαλούν στις κυτταροκαλλιέργειες την χαρακτηριστική κυτταροπαθογόνο δράση που προκαλούν οι ιοί και που όπως είναι γνωστό διευκολύνει την ταυτοποίηση. Τα διάφορα είδη των ρικετσιών άλλοτε προκαλούν ποικίλου βαθμού λύση των κυττάρων ανάλογα με την κυτταρική σειρά και άλλοτε δεν προκαλούν καμιά εκφυλιστική αλλοίωση.

1.1.3. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΡΙΚΕΤΣΙΩΝ

Ο ενδοκυττάριος παρασιτισμός των ρικετσιών δυσκόλεψε την ταυτοποίησή τους, αφού οι κλασσικές μέθοδοι ταυτοποίησης των βακτηρίων-βασιζόμενες κυρίως σε μεταβολικές διαδικασίες-αποδείχθηκαν ανεπαρκείς. Τα τελευταία χρόνια, η βελτίωση και εξέλιξη των τεχνικών μοριακής βιολογίας και η εφαρμογή τους συνέβαλαν ουσιαστικά στην ταυτοποίηση των ρικετσιών.

1.1.3.1. Γονοτυπική ταυτοποίηση

Η εφαρμογή των τεχνικών μοριακής βιολογίας, σε συνδυασμό με τις σύγχρονες μεθόδους ταχείας απομόνωσης, είχε ως αποτέλεσμα μια αλματώδη εξέλιξη στην ταυτοποίηση των ρικετσιών.

Η πρόσφατη ανακάλυψη ειδικών αλληλουχιών του DNA στις ρικέτσιες επέτρεψε την κατασκευή συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων (εναρκτές) που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να ξεκινήσουν εκλεκτικό πολλαπλασιασμό DNA προερχόμενου από ρικέτσιες.

Η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης, (Polymerase Chain Reaction, PCR) (Saiki *et al.* 1988), αποδείχθηκε ιδιαίτερα χρήσιμη και χαρακτηρίστηκε ως σταθμός στη γονοτυπική ταυτοποίηση των ρικετσιών (Drancourt *et al.* 1991; Regnery *et al.* 1991). Είναι μια τεχνική ευαίσθητη και εύχρηστη, ενώ παρουσιάζει ενδιαφέρον γιατί απαλλάσσει τον ερευνητή από την χρονοβόρο, επίπονη και επικίνδυνη, πολλές φορές, απομόνωση των ρικετσιών σε κυτταροκαλλιέργειες (Peter 1991).

Τα γονίδια που κωδικοποιούν την κιτρική συνθετάση και τις πρωτεΐνες 17kDa,120kDa,190kDa, χρησιμοποιούνται στη γονοτυπική ταυτοποίηση των ρικετσιών με τη μέθοδο PCR-RFLP.

Η RFLP (ανάλυση της κατατομής του μήκους των κλασμάτων του DNA), μετά από επίδραση με περιοριστικά ένζυμα στο προϊόν του γενωμικού πολλαπλασιασμού, έχει χρησιμοποιηθεί, με αρκετά ισχυρά πλεονεκτήματα, για να

παραχθούν ειδικά του είδους κλάσματα (fragment patterns) ρικετσιακού DNA από DNA που αποτελεί προϊόν πολλαπλασιασμού του PCR.

Εφαρμόστηκε τα τελευταία χρόνια μετά την ανάλυση της αλληλουχίας των γονιδίων που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες 17- kDa (Anderson *et al.* 1987), 120-kDa (Gilmore *et al.* 1989) 190-kDa (Anderson 1990) αλλά και του γονιδίου της κιτρικής συνθετάσης (Wood *et al.* 1987). Είναι δυνατόν να γίνει διάκριση ανάμεσα στα περισσότερα είδη ρικετσιών με τη χρήση για το γενωμικό πολλαπλασιασμό (PCR) ενός ζεύγους νουκλεοτιδικών εναρκτών που έχουν προέλθει από το γονίδιο της κιτρικής συνθετάσης της *R.prowazekii* (Wood *et al.* 1987) και μια περιοριστική ενδονουκλεάση για την υδρόλυση του προϊόντος του PCR (Regnery *et al.* 1983).

Η διάκριση ανάμεσα στις ρικέτσιες της ΟΤ και της ΟΚΠ μπορεί να γίνει με τη χρήση ενός δεύτερου ζεύγους εναρκτών που είναι ειδικοί για αλληλουχία του γονιδίου για την 190-kDa πρωτεΐνη των ρικετσιών της ΟΚΠ. (Anderson 1990). Οι ρικέτσιες της ΟΤ δεν δίνουν προϊόν.

1.1.4. Ο ΕΝΔΗΜΙΚΟΣ ΤΥΦΟΣ και η *R.TYPHI* (*R.mooseri*)

Ο όρος << ενδημικός τύφος>> (murine typhus) αναφέρθηκε για πρώτη φορά το 1910, στις ΗΠΑ από τον Brill ο οποίος από το 1898 έως το 1910 μελέτησε 221 περιπτώσεις μιας νόσου που έμοιαζε με τον τυφοειδή πυρετό χωρίς να είναι κλασσικός επιδημικός τύφος (Brill 1910).

Η πρώτη περιγραφή της νόσου και αναγνώρισή της ως ανεξάρτητης κλινικοεπιδημιολογικής οντότητας έγινε από το Maxcy, ο οποίος το 1923 ανέφερε μια ενδημική νόσο σε ασθενείς (με θετική την αντίδραση Weil- Felix) στις νότιες πολιτείες των ΗΠΑ, της οποίας η επιδημιολογία διέφερε σημαντικά απ' αυτή του επιδημικού τύφου και το 1926 περιγράφει την οικολογία της νόσου, ενοχοποιώντας τα τρωκτικά και τους ψύλλους σαν ξενιστές (Maxcy 1926).

Το 1928 ο Hermann Mooser διαχωρίζει την *R.typhi* από τη *R.prowazekii* με βάση τις διαφορές στην μολυσματικότητά τους για τα ινδικά χοιρίδια (Mooser 1928). Το 1931 στη Βαλτιμόρη ο Dyer απομονώνει στον ψύλλο τον υπεύθυνο μικροοργανισμό για τον ΕΤ (Dyer *et al.* 1931) και αποκαλύπτεται ότι ο αιτιολογικός παράγοντας της νόσου είναι ένα μικρό (0,4 Χ1,3 μm) gram αρνητικό βακτήριο, που ονομάζεται *R.mooseri* προς τιμή του Mooser, ο οποίος πρώτος πραγματοποίησε μελέτες για τα βιολογικά χαρακτηριστικά αυτού του μικροοργανισμού και προσδιόρισε τις διαφορές της από την *R.prowazekii*.

Αργότερα ονομάζεται *R.typhi* και κατατάσσεται στην ΟΤ. Παρ' όλο που το όνομα *R.typhi* είναι το όνομα που παρατίθεται στο Approved Lists of Bacterial Names (Skerman *et al.* 1980), μερικοί ερευνητές προτιμούν να την ονομάζουν ακόμα *R.mooseri*.

Επιδημίες ΕΤ έχουν πρόσφατα αναφερθεί στην Αυστραλία, την Κίνα, το Ισραήλ, το Κουβέιτ και την Ταϋλάνδη (Traub *et al.* 1978; Azad 1990; Walker 1996). Χιλιάδες ανθρώπινων περιστατικών αναφέρονται ετησίως στις ΗΠΑ. (Traub *et al.* 1978; Azad 1990). Από πρόσφατες οροεπιδημιολογικές μελέτες έχει διαπιστωθεί ότι υπάρχει υψηλός επιπολασμός για τις ρικέτσιες της ΟΤ στην Ασία και τη Ν. Ευρώπη (Walker 1996).

Η δριμύτητα και σοβαρότητα του ΕΤ έχει σχέση με τη μεγάλη ηλικία, με την καθυστερημένη διάγνωση, με ηπατική και νεφρική δυσλειτουργία, ανωμαλίες του

ΚΝΣ, και αναπνευστική ανεπάρκεια. Θάνατος παρατηρείται στο 4% των νοσηλευθέντων ασθενών. (Dumler *et al.* 1991).

Η πραγματική έκταση του προβλήματος είναι δύσκολο να υπολογιστεί γιατί σε πολλές χώρες δεν είναι υποχρεωτική η δήλωση της νόσου στις υγειονομικές αρχές και ακόμα σ' αυτές που είναι υποχρεωτική δηλώνεται ελλειπώς. Υπολογίζεται πως ένα στα πέντε περιστατικά δηλώνεται.

1.1.5. ΟΙΚΟΛΟΓΙΑ –ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

Ο ενδημικός τύφος είναι μια ζωονόσος που διατηρείται στη φύση μέσω ενός κύκλου που περιλαμβάνει κυρίως τρωκτικά και τα εκτοπαράσιτά τους.

Στην κλασσική επιδημιολογία του ΕΤ ως υπόδοχα της *R.typhi* φέρονται οι αρουραίοι (R.rattus και R.norvegicus) και ως μεταβιβαστές οι ψύλλοι των αρουραίων (κυρίως ο Xenopsylla cheopis) (Traub *et al.* 1978; Azad and Traub 1985). Ο κλασσικός κύκλος μετάδοσης του ενδημικού τύφου είναι : Αρουραίος- ψύλλος- Αρουραίος και περιστασιακά : Αρουραίος- Ψύλλος- Άνθρωπος.

Η οικολογία του ενδημικού τύφου όμως φαίνεται να είναι πιο σύνθετη επειδή, εκτός απο τους αρουραίους, ένας μεγάλος αριθμός απο τρωκτικά, αλλά και πολλά είδη από άγρια ή περιοικιακά ζώα με τα εκτοπαράσιτά τους, εμπλέκονται στον κύκλο.

Νεώτερα επιδημιολογικά δεδομένα δείχνουν ότι ο κλασσικός κύκλος αρουραίος -ψύλλος- αρουραίος της *R.typhi* έχει υποκατασταθεί σε ορισμένες περιοχές (Καλιφόρνια, Τέξας) από περιοικιακά ζώα, όπως είναι οι γάτες, οι σκύλοι, το μαρσιποφόρο ζώο οπόσουμ (opossum) και από τους ψύλλους τους.

Πρόσφατα μάλιστα έχει αποδειχθεί ότι ο ψύλλος της γάτας (Ctenocephalides felis) λειτουργεί σαν διαβιβαστής της *R.typhi*.

1.1.5.1. <u>Κύκλος ζωής</u>

Ο κύκλος περιλαμβάνει ενδοκυττάριο πολλαπλασιασμό και στο σπονδυλωτό-ξενιστή και στο ασπόνδυλο και περιλαμβάνει τα εξής στάδια :

α) Αιματοφάγα παράσιτα, όπως οι ώριμοι ψύλλοι, μολύνονται προσλαμβάνοντας τις ρικέτσιες από ρικετσιαιμικά σπονδυλωτά-υπόδοχα, μετά από γεύμα αίματος.

β) Οι ρικέτσιες εγκαθίστανται στο έντερο του ψύλλου όπου και πολλαπλασιάζονται μαζικά. Ο ψύλλος αποβάλλει τα περιττώματά του που περιέχουν τις ρικέτσιες (Traub *et al.* 1978; Arango-Jaramillo *et al.* 1988).

γ) Μετά από μια περίοδο επώασης, στον ψύλλο, οι ρικέτσιες μεταδίδονται σε ένα επιδεκτικό σπονδυλωτό-ξενιστή, (από τυχόν τραύματα ή εκδορές του δέρματος,

από απόξεση, τον επιπεφυκότα και το ρινικό βλεννογόνο),κατά τη διάρκεια ενός επόμενου γεύματος.

Από τη στιγμή που θα μολυνθεί ο ψύλλος, παραμένει μολυσμένος για όλη του τη ζωή (που ποικίλει από μήνες σε ένα χρόνο), διατηρώντας σε υψηλά επίπεδα τις ρικέτσιες (Traub *et al.* 1978; Azad *et al.* 1985; Azad 1988). Έτσι οι ψύλλοι μπορούν να μολύνουν ένα μεγάλο αριθμό επιδεκτικών ξενιστών, συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου.

Το γεγονός ότι οι ψύλλοι παραμένουν μολυσματικοί δια βίου και ότι, όπως αποδείχθηκε πρόσφατα οι ρικέτσιες παραμένοντας στους ψύλλους, μεταδίδονται και δια των ωαρίων τους στους απογόνους τους, (Azad and Traub 1985; Azad and Traub 1989) υποδηλεί ότι εκτός των αρουραίων είναι και αυτοί υπόδοχα της *R.typhi*.

1.1.5.2. Μετάδοση στον άνθρωπο

Η μόλυνση στον άνθρωπο συνήθως γίνεται με την είσοδο ρικετσιοβριθών κοπράνων ψύλλου μετά από λύση της συνέχειας του δέρματος στο σημείο του νήγματος. Μπορεί επίσης να γίνει μέσω του αναπνευστικού μετά από εισπνοή ξηρών μολυσμένων κοπράνων καθώς και μέσω του αμφιβληστροειδούς (επαφή του επιπεφυκότος με μολυσμένα κόπρανα ή ιστούς του ψύλλου) (Hone 1927; Miller 1946; Saint *et al.* 1954; Traub *et al.* 1978).

Ενδεχόμενη ακόμα είναι η πιθανότητα μετάδοσης της *R.typhi* δια του στόματος που συμβαίνει κατά τη διάρκεια γεύματος που έχει έρθει σε επαφή με ρικετσιοβριθή κόπρανα ψύλλου.

Νεώτερα επιδημιολογικά δεδομένα έδειξαν ότι οι ρικέτσιες μπορούν επίσης να μεταδοθούν από το τσίμπημα του ψύλλου. (Azad and Traub 1985; Azad and Traub 1989). Πειραματικές μελέτες στον X. cheopis αποκάλυψαν ότι μολυσμένοι ψύλλοι ήταν σε θέση να μεταδώσουν τις ρικέτσιες στούς ξενιστές τους με τσίμπημα (21 ημέρες μετά τη μόλυνσή τους).

1.1.5.3. Ο ρόλος των ψύλλων στην οικολογία και τη μετάδοση του Ε.Τ

Όταν οι ρικέτσιες περάσουν στον ψύλλο μετά από ένα γεύμα αίματος, εισέρχονται στα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου του. Αυτή η διαδικασία είναι γρήγορη και συμβαίνει μέσα στις λίγες πρώτες ώρες μετά από ένα γεύμα αίματος από το σπονδυλωτό-ξενιστή.

Κατά τη διάρκεια των πρώτων 5 ημερών προσβάλλονται λίγα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου (Η ανίχνευση των ρικετσιών συνήθως γίνεται 3-4 ημέρες μετά το γεύμα.) Στη συνέχεια δραπετεύουν από τα κύτταρα-ξενιστές χωρίς να τα καταστρέψουν και διασπείρονται (7-9 ημέρες μετά το γεύμα) στην εσωτερική στιβάδα του μέσου εντέρου, προσβάλλοντας το μεγαλύτερο μέρος των επιθηλιακών κυττάρων. Μετά το μαζικό ενδοκυττάριο πολλαπλασιασμό τους μέσα στο κυτταρόπλασμα των επιθηλιακών κυττάρων, οι ρικέτσιες εμφανίζονται στην κοιλότητα του εντέρου και αργότερα εκκρίνονται με τα κόπρανα (Azad *et al.* 1983). Σε πειραματική μόλυνση με *R.typhi* σε ψύλλους και αρουραίους βρέθηκε ότι 10 μέρες μετά το μολυσματικό γεύμα οι ψύλλοι αποβάλλουν μολυσμένα κόπρανα. Άρα οι ψύλλοι είναι σε θέση να μεταδώσουν τη *R.typhi* 7-10 μέρες μετά το γεύμα, αλλά η δυνατότητα καλύτερης μετάδοσης είναι την 17 ημέρα.

Ο μεγαλύτερος αριθμός των ρικετσιών περιορίζεται στη στιβάδα των επιθηλιακών κυττάρων του εντέρου του ψύλλου, μερικές όμως ρικέτσιες δραπετεύουν στην αιμόλεμφο των μολυσμένων ψύλλων. Η θερμοκρασία επηρεάζει σημαντικά τον πολλαπλασιασμό των ρικετσιών στους ψύλλους. Σε πειραματικά μολυσμένους ψύλλους, στους 18^0 C ο βαθμός μόλυνσης ήταν χαμηλός, ενώ στους 24^0C και 30^0C ήταν 2 έως 3 φορές μεγαλύτερος. Όταν οι ψύλλοι μεταφέρονταν από ένα περιβάλλον 18^0 C σε άλλο 24^0C ή 30^0C παρατηρήθηκε αύξηση του ρυθμού πολλαπλασιασμού. (Azad and Traub 1985).

Η μόλυνση δεν έχει παθολογικό αποτέλεσμα στους ψύλλους και δεν επηρεάζει τη βιωσιμότητά τους, ούτε την αναπαραγωγική τους ικανότητα (Azad *et al.* 1983; Azad *et al.* 1985; Azad and Traub 1989). Αυτή είναι μια σημαντική διαφορά, με τη μόλυνση της ανθρώπινης ψείρας από R.prowazeki (αιτιολογικό παράγοντα του επιδημικού τύφου), που έχει σαν αποτέλεσμα το θάνατο της ψείρας, εξαιτίας της ρήξης του τοιχώματος του μέσου εντέρου. (Snyder and Wheeler 1945; Ito *et al.* 1978).

Η ικανότητα του ψύλλου να διατηρεί την *R.typhi* σε υψηλά επίπεδα δια βίου, η επί μακρόν επιβίωση των μολυσμένων ψύλλων με συνεχή αποβολή της *R.typhi* στα κόπρανα, αλλά και η μετάδοσή της στις επόμενες γενιές μέσω των ωαρίων (διαωοθηκική μετάδοση) οδηγούν στην υποστήριξη της άποψης ότι ο ψύλλος μπορεί να χρησιμεύσει και σαν υπόδοχο του ενδημικού τύφου.

Φυσική ή πειραματική μόλυνση με *R.typhi*, έχει αναφερθεί για 10 είδη που ανήκουν σε 8 γένη. Με εξαίρεση τον *Ctenocephalides felis* και τον *Pulex irritans*, όλα τα άλλα είδη είναι κοινά στους αρουραίους (Traub *et al.* 1978).

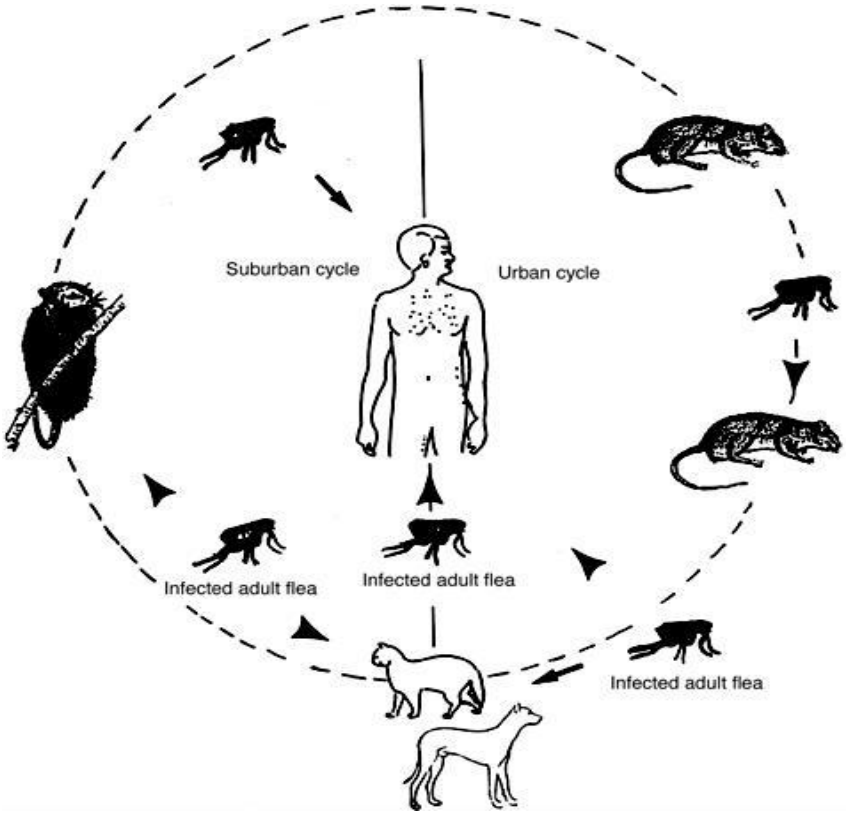
Απ' αυτά ο κύριος μεταβιβαστής είναι ο *Xenopsylla* [Εικόνα 3] ο οποίος είναι ένας σημαντικός παράγοντας στην οικολογία και επιδημιολογία του ενδημικού τύφου λόγω της παγκόσμιας κατανομής του, του ευρέως φάσματος των ξενιστών του, και την προτίμησή του να τρέφεται από τον άνθρωπο.

Εικόνα 3. Ψύλλος *Xenopsylla cheopis*. Από το άρθρο: Fleas and Murine Typhus. Jerome Goddard, Infect Med 15(7):438-440, 1998

Έχει διαπιστωθεί άμεση συσχέτιση ανάμεσα στην εποχιακή αφθονία των πληθυσμών του *X.cheopis* και της επίπτωσης του ΕΤ στον άνθρωπο (Traub *et al.* 1978). Τα περισσότερα περιστατικά παρατηρούνται στο τέλος της άνοιξης και αρχή του φθινοπώρου, όταν οι πληθυσμοί του *X.cheopis* είναι μεγάλοι. Στις Η.Π.Α., το 94% των περιπτώσεων του ενδημικού τύφου έχουν παρατηρηθεί σε 8 νότιες πολιτείες όπου το κλίμα είναι υγρό και ζεστό το μεγαλύτερο διάστημα του έτους. (Eskey and Hemphill 1948; Traub *et al.* 1978; Azad 1988)

Οι τιμές μόλυνσης σε φυσικά μολυσμένους ψύλλους ποικίλουν από περιοχή σε περιοχή. Σε υπερενδημικές περιοχές φτάνουν 50-70%. Σε άλλες, ο βαθμός μόλυνσης για ψύλλους συλλεγέντες από *R. rattus* ποικίλουν απο 3,2-9,7 % για τον *X.cheopis*, και από 8,9-15,8 % για τον *L.segnis*.

Σε ορισμένες περιοχές, όπως το Νότιο Τέξας και η Νότια Καλιφόρνια ένας επίσης σημαντικός μεταβιβαστής είναι ο ψύλλος της γάτας *Ctenocephalides felis*, ο οποίος αποδείχθηκε ότι είναι μεταβιβαστής και μιας πρόσφατα ταυτοποιημένης ρικέτσιας της *R.felis*.



Εικόνα 4. Τρόπος μετάδοσης της *Rickettsia typhi* στον άνθρωπο. Από το άρθρο: Fleas and Murine Typhus. Jerome Goddard, Infect Med 15(7):438-440, 1998

Σήμερα όμως θεωρείται ότι η λοίμωξη μπορεί να επέλθει στον άνθρωπο και μέσω διαφορετικών οδών [Εικόνα 4]. Συγκεκριμένα έχει παρατηρηθεί ότι ο άνθρωπος μπορεί να μολυνθεί και μέσω της αναπνευστικής οδού (εισπνοή αποξηραμένων κοπράνων ψύλλου) και μέσω του αμφιβληστροειδούς (επαφή του επιπεφυκότος με

μολυσμένα κόπρανα ή ιστούς του ψύλλου). Επιπλέον από μελέτες που αφορούν τον ψύλλο *Xenopsylla cheopis* φάνηκε ότι οι ψύλλοι είναι σε θέση για 21 ημέρες μετά την μόλυνση τους να μεταδώσουν την λοίμωξη και με απευθείας τσίμπημα του ανθρώπου (Azad and Traub 1985; Azad *et al.* 1985).

1.1.5.4. Ο ρόλος των αρουραίων στην οικολογία και τη μετάδοση του ενδημικού τύφου

Το 1926 ο Maxcy (Maxcy 1926) διατύπωσε την άποψη ότι τα τρωκτικά εμπλέκονται στην οικολογία του ΕΤ και αργότερα οι Hone και Rumreich επιβεβαίωσαν αυτή την άποψη (Hone 1927; Rumreich *et al.* 1931).

Οι πιο σημαντικοί παράγοντες είναι οι αρουραίοι του γένους Rattus, όπως R.rattus και R.norvegicus.

Η λοίμωξη στους αρουραίους είναι συνήθως ασυμπτωματική και οι ρικέτσιες παραμένουν στον εγκέφαλό τους για μήνες μετά τη μόλυνση (Traub *et al.* 1978; Arango-Jaramillo *et al.* 1984). Η ρικετσιαιμία εμφανίζεται περίπου 7-12 ημέρες μετά τον ενοφθαλμισμό. Σε εργαστηριακές μελέτες διαπιστώθηκε ότι αρουραίοι κάθε ηλικίας, από μιας ημέρας μέχρι τον ενήλικο, είναι ευαίσθητοι σε διαδερμική μόλυνση με *R.typhi* (Arango-Jaramillo *et al.* 1984) και ότι 7 ημέρες μετά τον ενοφθαλμισμό με 100 PFU *R.typhi*, οι αρουραίοι απέκτησαν ανιχνεύσιμη ρικετσιαιμία και ήταν σε θέση να μολύνουν ψύλλους του είδους *X. cheopis* , *L. Segnis και C.felis* (Azad *et al.* 1985).

Σχεδόν όλα τα αναφερθέντα περιστατικά Ε.Τ. έχουν σχέση με περιοχές που υπάρχουν μεγάλοι πληθυσμοί αρουραίων, κυρίως *R.norvegicus* και *R.rattus*. Οι τιμές μόλυνσης που έχουν αναφερθεί για τα παραπάνω είδη απο διάφορες εστίες Ε.Τ κυμαίνονται ανάλογα με την γεωγραφική περιοχή από 1% έως 46%. Παρ' όλ' αυτά, ο ενδημικός τύφος εμφανίζεται και σε περιοχές που οι ψύλλοι και οι αρουραίοι απουσιάζουν ή είναι σπάνιοι (Αιθιοπία, Αυστραλία, περιοχές των Η.Π.Α.) (Traub *et al.* 1978).

1.1.5.5. Άλλα θηλαστικά, πιθανά υπόδοχα του ΕΤ

Η οικολογία του ενδημικού τύφου φαίνεται να είναι πιο σύνθετη επειδή, εκτός από τους αρουραίους, ένας μεγάλος αριθμός από τρωκτικά, μπορούν να λειτουργήσουν ως υπόδοχα για τη *R.typhi* (White 1970). Φυσική μόλυνση σ' αυτά τα τρωκτικά έχει διαπιστωθεί σε πολλές περιοχές όπου αναφέρονται ανθρώπινα κρούσματα (Traub *et al.* 1978).

Ενδεικτικά αναφέρονται τα είδη: R.exulans, Bandicota bengalensis και indica ο οικιακός ποντικός, Mus musculus, σε διάφορα μέρη του κόσμου, ο African giant pouched rat, *Cricetomys gambianus* στη Σενεγάλη (Juminer 1972) και ο *suncus murinus* στη Μπούρμα και τη Μαλαισία.

Η μόλυνση με ρικέτσιες συχνά αναφέρεται για ψύλλους που έχουν συλλεγεί από πολλά είδη από άγρια ζώα. (Freyche and Deutschman 1950; Marshall *et al.* 1967; Traub *et al.* 1978). Σε πολλά τέτοια, μη συμβιούντα με τον άνθρωπο ζώα (σχεδόν 20 είδη ελέγχθηκαν) έχει μεταδοθεί η ρικέτσια πειραματικά από μολυσμένους ψύλλους, όμως δεν έχει αποδειχθεί αν εμπλέκονται στον κύκλο μετάδοσης στη φύση (Lepine, P. 1934 (Dyer *et al.* 1931; Brigham 1937; Brigham and Dyer 1938; Soliterman 1954; Traub *et al.* 1978).

Αντίθετα, σημαντικό ρόλο φαίνεται να παίζουν άλλα οικιακά και περιοικιακά ζώα, που ζουν σε στενή σχέση ή έρχονται σε επαφή με τους ανθρώπους αλλά και με συμβιούντες μ' αυτούς αρουραίους μέσα σε κατοικήσιμες περιοχές (Adams *et al.* 1970).

Τέτοια περιοικιακά ζώα, όπως γάτες, opossums (*Didelphis marsupialis*) (Traub *et al.* 1978) φαίνεται να εμπλέκονται σε επιμένουσες ενδημικές εστίες ΕΤ στις ΗΠΑ (Καλιφόρνια, Τέξας) σε περιοχές που οι παράγοντες του κλασσικού κύκλου απουσίαζαν (Azad *et al.* 1992; Schriefer *et al.* 1994). Σ' αυτές τις ενδημικές εστίες ανιχνεύτηκε ή απομονώθηκε η *R.typhi* από γάτες και οπόσουμς.

1.1.6 ΓΕΩΓΡΑΦΙΚΗ ΚΑΤΑΝΟΜΗ

Κρούσματα ΕΤ εκδηλώνονται σ' όλο τον κόσμο είτε σποραδικά είτε σαν επιδημίες, ενώ μερικές περιοχές χαρακτηρίζονται σαν ενδημικές (κυρίως περιοχές που έχουν διεισδύσει συμβιούντες με τον άνθρωπο αρουραίοι και οι ψύλλοι τους) (Eskey and Hemphill 1948; Derrick and Pope 1960; Traub *et al.* 1978; Edlinger 1980; Al-Awadi *et al.* 1982). Πολλές απ' αυτές τις ενδημικές εστίες είναι διεθνή λιμάνια, γεγονός που αποδίδεται στη μεταφορά και εισαγωγή μολυσμένων αρουραίων και των ψύλλων τους με τα πλοία (Traub *et al.* 1978). Έτσι, είναι γνωστό ότι ένας μεγάλος αριθμός λιμανιών είναι ενδημικές περιοχές. Μετέπειτα μετακινήσεις των μολυσμένων τρωκτικών και των εκτοπαρασίτων τους από τις παραθαλάσσιες περιοχές σε κοντινές πόλεις και κωμοπόλεις μέσα από κύριες οδικές αρτηρίες (διαδρομές εμπορίου) οδηγούν στη διασπορά και τη διάδοση της νόσου σε ευρύτερες περιοχές.

Αναφέρεται με μεγαλύτερη συχνότητα σε παραθαλάσσιες περιοχές με ζεστό κλίμα. Σε τέτοιες περιοχές οι κλιματολογικές συνθήκες είναι ιδανικές για την επιβίωση των τρωκτικών και των εκτοπαρασίτων τους. Σε αρκετές χώρες, όπως Ταϊλάνδη, Ινδία, Πακιστάν και νότιες Η.Π.Α., η νόσος έχει ευρύτατη εξάπλωση στις αστικές περιοχές.

1.1.7. ΕΠΟΧΙΑΚΗ ΚΑΤΑΝΟΜΗ

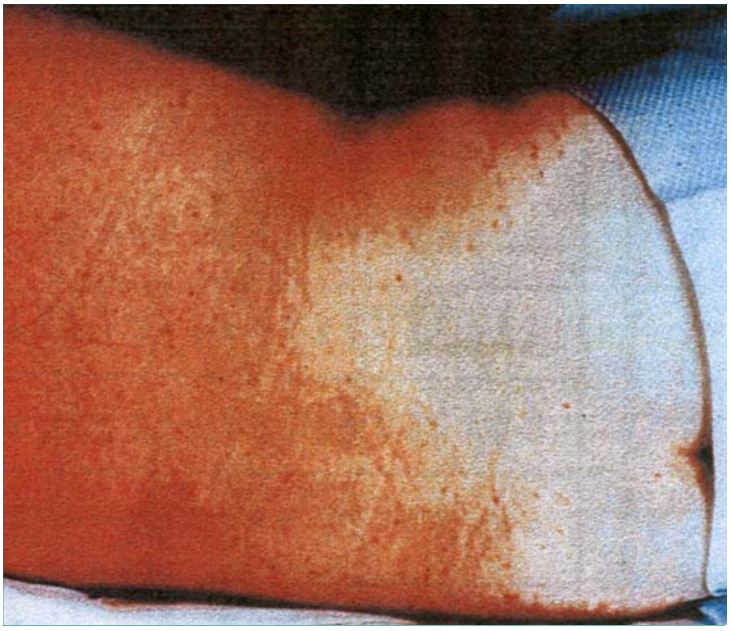
Εμφανίζεται με αυξημένη συχνότητα κατά τους θερινούς μήνες και τους πρώτους μήνες του φθινοπώρου. Η εποχιακή κατανομή των περιστατικών Ε.Τ. στους ανθρώπους, φαίνεται να έχουν σχέση με την έντονη παρουσία και την αφθονία των διαβιβαστών - ψύλλων, η οποία παρατηρείται το τέλος του καλοκαιριού και την αρχή του φθινοπώρου.

1.1.8. ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ

Η κλινική συμπτωματολογία εμφανίζεται μετά από επώαση 8-16 μέρες με μέσο όρο τις 10 μέρες. Συνήθη πρόδρομα συμπτώματα είναι κεφαλαλγία, κακουχία, αρθραλγία. Μελέτες σε εθελοντές αρρώστους με ενδημικό τύφο έδειξαν ρικετσιαιμία κατά την περίοδο επώασης και πριν την πυρετική έξαρση (Woodward 1949).

Τις περισσότερες φορές η εξέλιξη της νόσου είναι αργή αλλά υπάρχει περίπτωση η νόσος να εισβάλλει απότομα με πυρετό, έντονη κεφαλαλγία, ρίγος, μυαλγίες, και ναυτία.

Ο πυρετός ο οποίος παρατηρείται στο 96% των ασθενών κυμαίνεται από 38 έως 40^0 C. Η θερμοκρασία μπορεί να φτάσει σε υψηλά επίπεδα απότομα μετά την εισβολή της νόσου ή να ανέλθει σταδιακά στο διάστημα των λίγων πρώτων ημερών. Η πυρετική καμπύλη διατηρείται υψηλή, με ελαφρές πρωϊνές υφέσεις μόνο κατά 1-2 βαθμούς. Στον ενδημικό τύφο ο πυρετός είναι συνεχής αλλά συχνά μικρότερης διάρκειας σε σχέση με άλλες ρικετσιώσεις. Εάν δεν χορηγηθεί θεραπεία ο πυρετός διαρκεί 12 περίπου μέρες και στο 44% των περιπτώσεων συνοδεύεται από ρίγος. Επανεμφάνιση κατά διαστήματα του πυρετού ή υποτροπές παρατηρούνται σπάνια. Σε μεγάλο ποσοστό των ασθενών (50%) εμφανίζεται εξάνθημα συνήθως κατά την πέμπτη μέρα του πυρετού [Εικόνα 5].



Εικόνα 5. Κηλιδοβλατιδώδες εξάνθημα στον ενδημικό (μυϊκό) τύφο. (Psaroulaki 1998)

Η κεφαλαλγία εμφανίζεται σε ποσοστό 45% των ασθενών και είναι κυρίαρχο στοιχείο της κλινικής εικόνας. Εντοπίζεται οπισθοβολβικά και μετωπιαία και διαρκεί περίπου δυο εβδομάδες. Συχνά παρατηρείται σπληνομεγαλία (25% των ασθενών), και ηπατομεγαλία .

Οι αιματολογικές και βιοχημικές εξετάσεις εμφανίζουν χαρακτηριστική πορεία. Στο πρώτο δεκαήμερο, εμφανίζεται θρομβοπενία, λευκοπενία, ηπατική κυτταρόλυση, υποπρωτεϊναιμία, και υπονατριαιμία. Στο δεύτερο δεκαήμερο εμφανίζεται λευκοκυττάρωση, ενώ τα αιμοπετάλια, τα ηπατικά ένζυμα, η πρωτεϊναιμία και το Na αποκαθίστανται στα φυσιολογικά όρια. Η αύξηση των τρανσαμινασών είναι ενδοθηλιακής προέλευσης και δεν οφείλεται σε ηπατικές διαταραχές.

Από τον εργαστηριακό έλεγχο στο περιφερικό αίμα, στο 25-50% των ασθενών παρουσιάζεται ελαφρά λευκοπενία συνοδευόμενη από θρομβοκυτοπενία κατά το διάστημα των πρώτων 7 ημερών. Ο χρόνος προθρομβίνης, περιστασιακά παρατείνεται, αλλά πολύ σπάνια παρατηρείται αληθής διάχυτη ενδοαγγειακή πήξη με ελάττωση του ινωδογόνου. Συχνό εργαστηριακό εύρημα (90% των ασθενών) είναι η αύξηση της ασπαρτικής αμινοτρανσφεράσης (SGOT) και υποδηλώνει ηπατοκυτταρική βλάβη. Επίσης μπορεί να παρατηρηθεί αύξηση της αμινοτρανσφεράσης της αλανίνης (SGPT) της αλκαλικής φωσφατάσης, και της γαλακτικής αφυδρογονάσης. Σαν αποτέλεσμα της αγγειακής βλάβης παρατηρείται υποαλβουμιναιμία και υποπρωτειναιμία στο 89% και 45% αντίστοιχα, και ηλεκτρολυτικές διαταραχές ειδικά υπονατριαιμία στο 60% και υποασβεστιαιμία στο 79%. Ευρήματα που σχετίζονται με βαριά νόσηση είναι η λευκοκυττάρωση, η αύξηση της ουρίας του αίματος και της κρεατινίνης, υποασβεστιαιμία, υποκαλλιαιμία, υπονατριαιμία και υποαλβουμιναιμία.

Η λοίμωξη απο ρικέτσια δεν εμφανίζεται πάντοτε με τη μορφή της οξείας λοίμωξης (τυπική μορφή). Σε πολλές περιπτώσεις είναι ασυμπτωματική ή παρουσιάζεται με τη μορφή ελαφράς γρίππης (αφανής ή λανθάνουσα λοίμωξη) (Betz *et al.* 1983; Gikas *et al.* 2004).

1.1.9. ΟΜΑΔΕΣ ΥΨΗΛΟΥ ΚΙΝΔΥΝΟΥ

Η νόσος εμφανίζεται με μεγαλύτερη συχνότητα σε ομάδες πληθυσμού που οι συνήθειες, ο τρόπος και οι συνθήκες ζωής τους τούς φέρνουν σε στενή επαφή με αρουραίους και τους ψύλλους τους.

Η λοίμωξη στον άνθρωπο είναι συνδεμένη με την παρουσία των αρουραίων και των ψύλλων τους σε αγροτικές περιοχές και σε περιαστικά περιβάλλοντα.

Στις αναπτυγμένες χώρες, ομάδες υψηλού κινδύνου αποτελούν άτομα επαγγελματικώς εκτεθειμένα στους αρουραίους και κυρίως άτομα που εργάζονται σε αποθήκες τροφίμων ιδιαιτέρως δημητριακών ή σε κεντρικές αγορές καθώς επίσης και εργαζόμενοι σε ερευνητικά εργαστήρια. Στις αναπτυσσόμενες ή υπανάπτυκτες χώρες στις οποίες οι πληθυσμοί των οικιακών τρωκτικών είναι μεγάλοι, προσβάλλεται ο γενικός πληθυσμός αδιακρίτως. Η νόσος προσβάλλει κυρίως ενήλικες παρόλο που όλες οι ηλικίες μπορεί να προσβληθούν.

1.1.10. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ

1.1.10.1.Άμεση διάγνωση

1.1.10.1.1. Απομόνωση βακτηρίου με καλλιέργια

Η απομόνωση των ρικετσιών σήμερα γίνεται σε κυτταροκαλλιέργειες, είναι πολύπλοκη και απαιτεί εξειδικευμένα εργαστήρια. Η μεταφορά των παθολογικών υλικών (αίμα ή βιοψικά) υλικά πρέπει να είναι ταχεία και η λήψη τους πρέπει να γίνεται πριν από τη χορήγηση αντιβιοτικών. Ο ενοφθαλμισμός των παθολογικών υλικών γίνεται σε κυτταρικές σειρές. Οι κυτταρικές σειρές, εμφανίζουν διαφορετική ευαισθησία στα διάφορα είδη ρικετσιών. Επειδή το υπό απομόνωση στέλεχος είναι άγνωστο, ο ενοφθαλμισμός του παθολογικού υλικού γίνεται συνήθως σε περισσότερες της μιας κυτταρικές σειρές.

1.1.10.1.1.1. Ταχεία καλλιέργεια ρικετσιών από τα κυκλοφορούντα μονοκύτταρα του αίματος (Τεχνική shell-vial)

Η τεχνική αυτή αποτέλεσε ένα σημαντικό βήμα,στην απομόνωση και τη διάγνωση των ρικετσιών, αφού η ανίχνευση είναι δυνατή σε 48 ώρες. Η ταχεία καλλιέργεια των ρικετσιών εφαρμόστηκε για πρώτη φορά από τους Marrero- Raoult (Marrero and Raoult 1989) και αποτελεί τροποποίηση της μεθόδου απομόνωσης του κυτταρομεγαλοϊού (CMV) (Paya *et al.* 1987). Ο ενοφθαλμισμός του πλάσματος με την λευκοκυτταρική στιβάδα γίνεται σε κυλινδρικά σωληνάρια, (shell-vials), στο έλασμα των οποίων έχουν αναπτυχθεί μονόστιβοι ινοβλάστες Hel. Μετά τον ενοφθαλμισμό τα σωληνάρια φυγοκεντρούνται, απορρίπτεται η υγρή φάση και αφού προστεθεί νέο θρεπτικό υλικό, επωάζονται σε ατμόσφαιρα διοξείδιου του άνθρακα στους 37^0 C.

Τα ελάσματα εξετάζονται με ΑΦ μετά από 48, 72, 96, ή 120 ώρες. Όσες καλλιέργειες είναι θετικές ενοφθαλμίζονται σε κανονικές κυτταρικές σειρές για να καλλιεργηθούν και να τυποποιηθούν. Η ευαισθησία της μεθόδου είναι πολύ μεγαλύτερη από εκείνη των παλαιότερων μεθόδων καλλιέργειας και αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η φυγοκέντρηση ευνοεί την είσοδο των ρικετσιών στα κύτταρα (Weiss and Dressler 1960; Wike and Burgdorfer 1972).

Η ταυτοποίηση γίνεται με συνδυασμό φαινοτυπικών και γονοτυπικών μεθόδων (PCR-RFLP, SDS-PAGE, Western-blot, PFGE, μέθοδος Phillips).

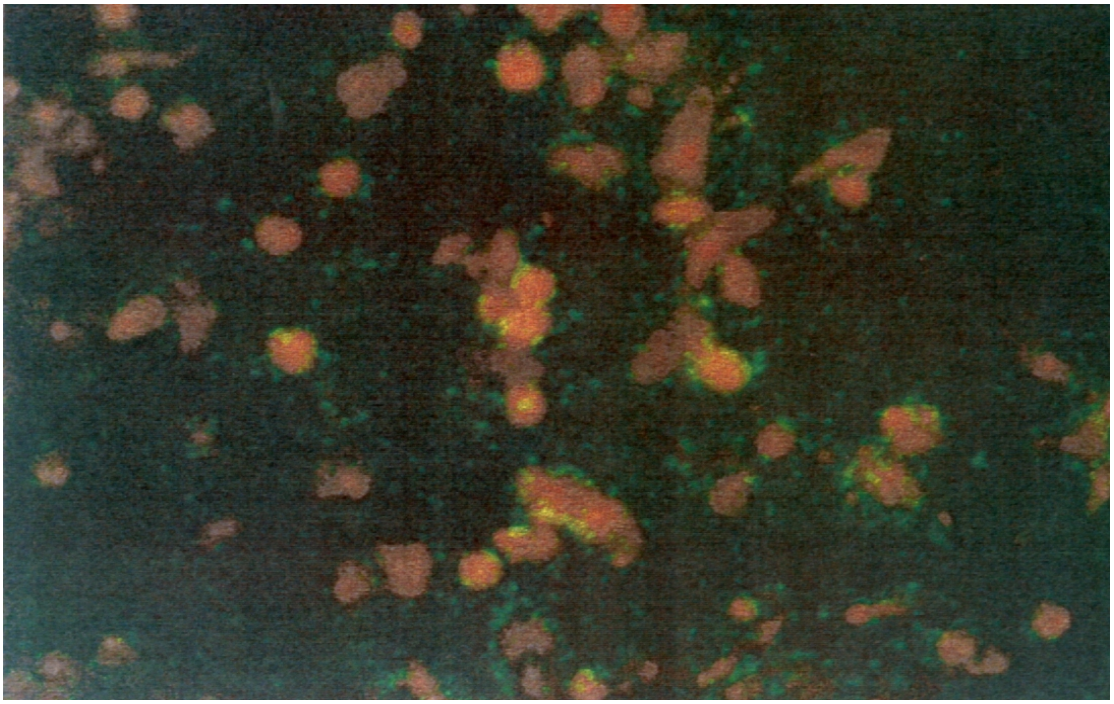
1.1.10.1.2. Ανίχνευση ρικετσιών

Η άμεση ανίχνευση των ρικετσιών επιτρέπει την έγκαιρη διάγνωση των ρικετσιώσεων και είναι ιδιαίτερα χρήσιμη στις βαριές και άτυπες μορφές της νόσου.

1.1.10.1.2.1. <u>Ανίχνευση ρικετσιών με άμεσο ανοσοφθορισμό</u>

Εκτελείται σε ιστούς, σε βιοψικό υλικό, επιχρίσματα αίματος, δερματικά έλκη, πλακούντα, λεμφαδένες.

Ανίχνευση ρικετσιών με άμεσο ανοσοφθορισμό γίνεται επίσης σε κυκλοφορούντα ενδοθηλιακά κύτταρα. Ο διαχωρισμός των ενδοθηλιακών κυττάρων από τα υπόλοιπα στοιχεία του αίματος επιτυγχάνεται με μαγνητικά σφαιρίδια επικαλυμμένα με μονοκλωνικά αντισώματα έναντι των ενδοθηλιακών κυττάρων. Στη συνέχεια τα διαχωρισθέντα κύτταρα εξετάζονται με ΑΦ [Εικόνα 6]. Η μέθοδος εμφανίζει υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα.



Εικόνα 6 . Τεχνική του ανοσοφθορισμού σε κύτταρα μολυσμένα με στέλεχος *Rickettsia typhi* που απομονώθηκε σε ασθενή (Psaroulaki 1998).

1.1.10.1.2.2. Η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) και PCR-RFLP

Η γονοτυπική διάγνωση των ρικετσιώσεων γίνεται από το αίμα ασθενών (λευκοκυτταρική στοιβάδα) με τη μέθοδο PCR-RFLP. Στην PCR χρησιμοποιούνται ζεύγη εναρκτών των γονιδίων που κωδικοποιούν την κιτρική συνθετάση (δίνει πληροφορίες για όλα τα είδη της οικογένειας *Rickettsia*ceae), την πρωτεΐνη 17-kDa (κοινή στην ΟΚΠ και ΟΤ), την πρωτεΐνη 120-kDa και την πρωτεΐνη 190-kDa (ειδική της ΟΚΠ και χρησιμεύει για τη διερεύνηση των γενετικών σχέσεων μεταξύ των ειδών της ΟΚΠ).

Γίνεται πολλαπλασιασμός τμημάτων των γονιδίων των παραπάνω πρωτεινών με την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης και στη συνέχεια ανάλυση του πολυμορφισμού των κλασμάτων του DNA, μετά απο επίδραση με περιοριστικά

ένζυμα (AluI για το προιόν του γονιδίου της κιτρικής συνθετάσης, και RsaI- PstI για το προιόν της 190kDa).

Στη συνέχεια συγκρίνονται οι κατατομές των υπό τυποποίηση στελεχών, με πρότυπα στελέχη.

1.1.10.2. Έμμεση διάγνωση

Η έμμεση διάγνωση των ρικετσιώσεων βασίζεται στην ανίχνευση αντισωμάτων με ορολογικές μεθόδους. Έχουν εφαρμοστεί μέχρι σήμερα όλες οι υπάρχουσες ορολογικές τεχνικές.

Η αντίδραση Weil-Felix ήταν η πρώτη αντίδραση που χρησιμοποιήθηκε (Weil and Felix 1916), σήμερα όμως δεν χρησιμοποιείται πλέον και έχει μόνο ιστορική σημασία, λόγω της χαμηλής της ειδικότητας και ευαισθησίας (Hechemy *et al.* 1979; Raoult *et al.* 1984; Kaplan and Schonberger 1986). Έκτοτε έχουν χρησιμοποιηθεί: η σύνδεση συμπληρώματος, η δοκιμασία της μικροσυγκόλλησης, η συγκόλληση με latex , η παθητική αιμοσυγκόλληση, η μέθοδος ELISA, η δοκιμασία του Western Blot.

Σήμερα, η μέθοδος αναφοράς είναι ο έμμεσος ανοσοφθορισμός (WHO *et al.* 1982). Η μέθοδος είναι ευαίσθητη, ειδική, εμφανίζει τις λιγότερες διασταυρούμενες αντιδράσεις με τον κηλιδοβλατιδώδη πυρετό και τον επιδημικό τύφο, επιτρέπει τον προσδιορισμό IgG, IgM και IgA αντισωμάτων και απαιτεί ελάχιστη ποσότητα αντιγόνου. Εμφανίζει ακόμα το πλεονέκτημα ότι η κινητικη των αντισωμάτων στις ρικετσιώσεις έχει μελετηθεί με τη μέθοδο αυτή. Τα αντισώματα μπορούν να ανιχνευτούν συστηματικά με τον ανοσοφθορισμό από τη δέκατη περίπου ημέρα από την έναρξη της νόσου και παραμένουν 2 με 3 χρόνια μετά τη νόσο. Για τη διάγνωση τίτλος μεγαλύτερος από 1 : 128 θεωρείται θετικός.

Η παρουσία IgM αντισωμάτων υποδεικνύει ότι η λοίμωξη είναι πρόσφατη, αρκεί η αύξηση των IgM να συνοδεύεται από παράλληλη αύξηση των IgG. Μόνο η ύπαρξη των IgM μπορεί να οφείλεται στην ύπαρξη μη ειδικών αντιπολυσακχαριδικών αντισωμάτων (αντι-LPS) και άρα να πρόκειται για διασταυρούμενη αντίδραση με τη Legionella ή με άλλες ρικέτσιες.

Καμμιά από τις ορολογικές δοκιμασίες δεν προσφέρει τη δυνατότητα διάγνωσης στα πρώτα στάδια της λοίμωξης ώστε να καθοδηγήσει έγκαιρα τη θεραπευτική αγωγή. Σημαντική παράμετρος στην επιτυχία της ορολογικής διάγνωσης είναι η ποσότητα και η ποιότητα των χρησιμοποιουμένων αντιγόνων. Όλες οι τεχνικές που έχουν χρησιμοποιηθεί στην ορολογική διάγνωση των ρικετσιών εμφανίζουν πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα, η γνώση των οποίων είναι σημαντικό στοιχείο στην αξιολόγηση και την ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

1.1.11. ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Η θεραπεία αναφοράς για τους εξανθηματικούς πυρετούς είναι η χλωραμφαινικόλη, η τετρακυκλίνη και το παράγωγό της, η δοξυκυκλίνη (Raoult and Walker 1990; Gikas *et al.* 2004). Τα αντιβιοτικά αυτά, παρά το γεγονός ότι είναι μόνο ρικετσιοστατικά, οδηγούν στη βελτίωση των κλινικών συμπτωμάτων σε 24-36 ώρες, και υποχώρηση του πυρετού σε 2-3 ημέρες.

Η δοξυκυκλίνη και η χλωραμφενικόλη προτιμούνται σε ασθενείς με νεφρική ανεπάρκεια. Σε εγγύους χορηγείται χλωραμφενικόλη το πρώτο τρίμηνο της κύησης ενώ στο τρίτο τρίμηνο γίνεται χρήση της δοξυκυκλίνης.

Τα τελευταία χρόνια, η αποτελεσματικότητα της χλωραμφαινικόλης, αμφισβητείται. Έχουν αναφερθεί αποτυχίες στη θεραπεία και υποτροπές στο Ισραήλ και τις ΗΠΑ (Shaked *et al.* 1988; Fishbein *et al.* 1990). Έχουν αναφερθεί περιπτώσεις απλαστικής αναιμίας μετά από χορήγηση χλωραμφαινικόλης.

‘Εχει επίσης παρατηρηθεί ότι η τετρακυκλίνη προκαλεί οδοντικές διχρωμίες και υποπλασίες σε παιδιά μικρότερα των 8 ετών. Συμπερασματικά, η δοξυκυκλίνη αποτελεί το αντιβιοτικό πρώτης εκλογής. Πρόσφατα έγιναν αρκετές κλινικές μελέτες για τις κινολόνες, η κλινική αποτελεσματικότητα των οποίων αμφισβητείται.

Η Ciprofloxacin αποδείχτηκε εναλλακτική λύση σε αντικατάσταση της τετρακυκλίνης (Raoult *et al.* 1986; Ruiz-Beltran and Herrero-Herrero 1991). Έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί η ερυθρομυκίνη και η κοτριμοξαζόλη. Η Josamycin είναι αποτελεσματική και μάλιστα συνιστάται σε παιδιά και εγκύους (Raoult and Drancourt 1991), ενώ αντίθετα η ριφαμπικίνη απέτυχε στη θεραπεία όταν χορηγήθηκε σε παιδιά (Bella *et al.* 1991). Σε εγκύους και παιδιά η Josamycin αποτελεί την καλύτερη λύση (50 mgr/ kgr/ημέρα, για 5 ημέρες).

1.1.12.ΠΡΟΦΥΛΑΞΗ - ΠΡΟΛΗΨΗ

Η διασπορά και εξάπλωση του Ε.Τ. μπορεί να ελεγχθεί και να περιοριστεί με τη μείωση ή την εξάλειψη των αρουραίων και των ψύλλων. Τα προληπτικά μέσα επομένως αποσκοπούν στην καταπολέμηση των αρουραίων και των εκτοπαρασίτων τους.

Ο έλεγχος των ψύλλων πρέπει πάντα να προηγείται των μέτρων ελέγχου των αρουραίων. Σε ενδημικές περιοχές του ΕΤ για να μειωθεί η παραπέρα διάδοσή του είναι αναγκαία η εφαρμογή αποτελεσματικών μυοκτόνων παράλληλα με τα εντομοκτόνα που έχουν εφαρμοστεί εναντίον των ψύλλων.

Η πιο ενδεδειγμένη και αποτελεσματική καταπολέμηση του Ε.Τ. είναι η καταστροφή των αρουραίων σε μια ευρεία περιοχή (κοινοτική) με τη χρήση δηλητηριωδών ουσιών και καταστροφή των καταφυγίων τους.

Στις ενδημικές περιοχές εφαρμόζεται ψεκασμός με εντομοκτόνα για εξάλειψη των ψύλλων. Τα εντομοκτόνα πρέπει να εφαρμόζονται πρώτα στις διαδρομές, τις φωλιές και τις αποικίες των αρουραίων και κατόπιν να δηλητηριάζονται οι αρουραίοι ή να συλλαμβάνονται με παγίδες. Εντομοκτόνα που χρησιμοποιούνται για την καταπολέμηση των ψύλλων είναι τα pyrethrums, συνθετικά pyrethroids, βότανα-εντομοκτόνα, (d-limonene,citrusextract) και τα carbamates. Από τρία συνθετικά pyrethroids που ελέγχθηκαν η dacamethrin βρέθηκε να είναι η πιο αποτελεσματική. Σημαντικά προβλήματα στον έλεγχο των διαβιβαστών είναι η αντοχή που αναπτύσουν στα εντομοκτόνα και η αρνητική επίδραση των εντομοκτόνων στο περιβάλλον. Επιπρόσθετα μέτρα μπορεί να είναι η χρήση απωθητικής αλοιφής για ψύλλους στα άτομα που εκτίθενται σε ψύλλους. Η Amitraz/Mitaban(Liquid Concentrate), αποδείχτηκε μια καλή απωθητική αλοιφή για ψύλλους.

Παράγοντες που ευνοούν την αύξηση των διαβιβαστών και των υποδόχων θα πρέπει να λαμβάνονται υπ' όψιν. Πρακτικές καθαριότητας, υγιεινής και σωστής αποκομιδής, μεταφοράς και εναπόθεσης των απορριμάτων, πρέπει να λαμβάνονται έτσι ώστε να μειώνεται ο πληθυσμός των αρουραίων και να περιορίζεται η εξάπλωσή τους. Τα οικήματα πρέπει να γίνονται απρόσιτα στους αρουραίους.

1.1.13. *RICKETTSIA FELIS*

Ο κηλιδώδης πυρετός που μεταδίδεται μέσω του ψύλλου (Flea-borne spotted fever) αποκαλούμενος επίσης με την ονομασία τύφος του ψύλλου της γάτας (cat flea typhus), είναι μια αναδυόμενη λοιμώδης νόσος με αιτιολογικό παράγοντα ένα είδος ρικέτσιας της Ομάδας των Κηλιδωδών Πυρετών (ΟΚΠ), τη *Rickettsia felis*.

Το είδος αυτό είναι μια ρικέτσια που ανακαλύφθηκε πρόσφατα και δεν έχει ακόμα πλήρως περιγραφεί λεπτομερώς ούτε η παθογένεια της αλλά ούτε και η επιδημιολογία της. Πρόκειται για τη μοναδική ρικέτσια της ΟΚΠ που έχει σαν μεταβιβαστή τον ψύλλο, σε αντίθεση με τα άλλα είδη ρικετσιών της ομάδας που μεταδίδονται μέσω των κροτώνων. Αρχικά η *Rickettsia felis* ανιχνεύτηκε στον ψύλλο της γάτας του είδους *Ctenocephalides felis* (Adams *et al.* 1990). Ακολούθως το βακτήριο χαρακτηρίστηκε με μεθόδους μοριακής βιολογίας το 1991 και ονομάστηκε ELB agent (EL Laboratory, Soquel, CA). Εξ' αιτίας των διασταυρούμενων αντιδράσεων με αντιγόνα της *R typhi* αρχικά επεκράτησε η αντίληψη ότι ήταν μια ρικέτσια της ομάδας του τύφου (Azad *et al.* 1992).

Παραπέρα μελέτες με τη χρήση μεθόδων μοριακής βιολογίας και βακτηριολογικών τεχνικών έδειξαν ότι το βακτήριο είναι μια ρικέτσια της ΟΚΠ. (Higgins *et al.* 1996; Azad *et al.* 1997; Bouyer *et al.* 2001; La Scola *et al.* 2002b; Blair *et al.* 2004). Λόγω της ανάπτυξης του σε χαμηλές θερμοκρασίες, η πρώτη οριστική απομόνωση και καλλιέργεια αυτού του βακτηρίου που ονομάστηκε *R.felis* έγινε δυνατή μόλις το 2001 (La Scola *et al.* 2002a).

Πρόσφατα ολοκληρώθηκε ο προσδιορισμός της αλληλουχίας του γενώματος της *R.felis*. Το «χρωμόσωμά» της είναι μεγαλύτερο σε σύγκριση μ' εκείνο των άλλων ρικετσιών. Διαθέτει 2 πλασμίδια τα οποία είναι μοναδικά μεταξύ των χρωμοσωμάτων των οποίων έχει βρεθεί η αλληλουχία των βάσεων του DNA.

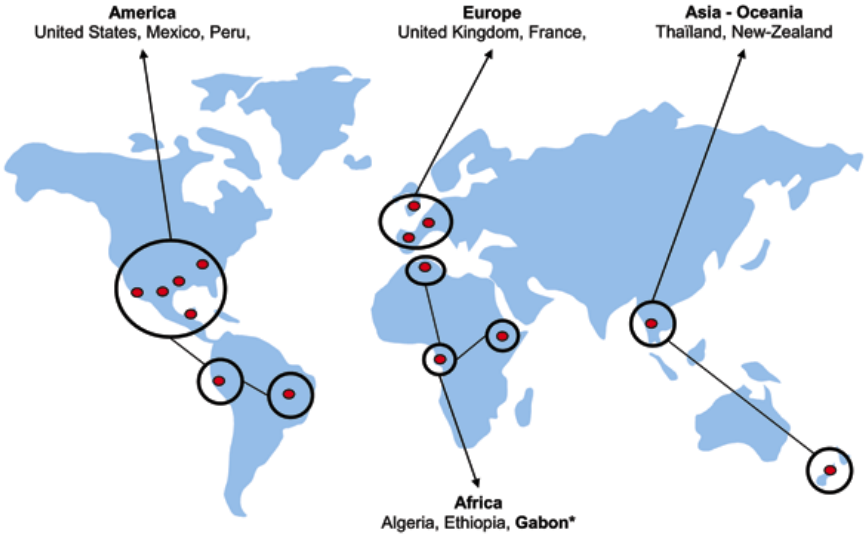
Η *Rickettsia felis* εμφανίζει ένα επιφανειακό προσάρτημα που μοιάζει με συζευκτικό σωλήνα και πιθανόν να έχει την ικανότητα της σύζευξης με άλλα βακτήρια (Ogata *et al.* 2005). Η συζήτηση γύρω από την παθογονικότητα της *R.felis* για τον άνθρωπο ξεκίνησε το 1994 (Schriefer *et al.* 1994), και μέχρι σήμερα πολύ λίγα περιστατικά από λοίμωξη *R.*felis στον άνθρωπο έχουν περιγραφεί παγκόσμια.

Από τις λίγες κλινικές περιπτώσεις που έχουν αναφερθεί τα κύρια κλινικά συμπτώματα είναι πυρετός, κηλιδοβλατιδώδες εξάνθημα και εσχάρα, Πυρετός,

κεφαλαλγία, μυαλγία, κηλιδώδες εξάνθημα και εσχάρα είναι τα τυπικά χαρακτηριστικά της λοίμωξης από *R.felis* όπως έχουν περιγραφεί σε μερικές χώρες στον κόσμο (Schriefer *et al.* 1994; Zavala-Velazquez *et al.* 2000; Raoult *et al.* 2001; Boostrom *et al.* 2002; Oliveira *et al.* 2002; Richter *et al.* 2002; Parola *et al.* 2003; Perez-Arellano *et al.* 2005; Marquez *et al.* 2006). Η *R.felis* έχει ενοχοποιηθεί σαν αίτιολογικός παράγοντας νόσου, σε 3 ασθενείς με πυρετό και εξάνθημα και η διάγνωση έχει επιβεβαιωθεί με ειδικό PCR στο αίμα ή βιοψικό υλικό από το δέρμα και με ορομετατροπή (4πλάσια αύξηση του τίτλου ειδικών αντισωμάτων έναντι της *R.felis*) στις ΗΠΑ. Η κλινική εικόνα δύσκολα διακρίνεται από την τυπική εικόνα των γνωστών ρικετσιώσεων που μεταδίδονται με τους κρότωνες (Parola *et al.* 2005). Πέρα απο την δεισδιάκριτη κλινική εικόνα ένας επιπλέον σημαντικός λόγος για την δυσκολία εντοπισμού του βακτηρίου είναι το γεγονός ότι στα περισσότερα εργαστήρια για τη διάγνωση των ρικετσιών χρησιμοποιείται η ορολογική μέθοδος του έμμεσου ανοσοφθορισμού με τη χρήση commercial kits στα οποία τα χρησιμοποιούμενα αντιγόνα είναι κυρίως αντιγόνα άλλων ειδών ρικετσιών όπως : *R.typhi, R.conori, R. Rickettsiae*. Συνεπώς, λόγω των διασταυρούμενων αντιδράσεων που εμφανίζονται ανάμεσα στα διάφορα είδη των ρικετσιών, κλινικές περιπτώσεις που οφείλονται σε *R.felis* να αποδίδονται λαθεμένα σε άλλες ρικέτσιες. Στα παραπάνω συνηγορεί και το γεγονός ότι το παθογόνο έχει βρεθεί σε ψύλλους που παρασιτούσαν διάφορα είδη θηλαστικών σε αρκετές χώρες απ' όλο τον κόσμο. Φαίνεται ότι το βακτήριο έχει παγκόσμια κατανομή [Εικόνα 7].

Η παρουσία της λοίμωξης από *R.felis* έχει διαπιστωθεί με τη χρήση ορολογικών μεθόδων σε ασθενείς στη Γαλλία, τη Βραζιλία. Στη Βραζιλία έχει επίσης ανιχνευτεί με PCR στον ορό ασθενούς (Zavala-Velazquez *et al.* 2000; Richter *et al.* 2002; Brouqui *et al.* 2007). Το 2002, στη Γερμανία αναφέρθηκαν δυο περιστατικά με τυπική εικόνα κηλιδώδους πυρετού ρικετσιακής αιτιολογίας, με γενικευμένο κηλιδοβλατιδώδες εξάνθημα και τη χαρακτηριστική εσχάρα. Στους 2 αυτούς ασθενείς –οι οποίοι ήταν αντρόγυνο- η λοίμωξη από *R.*felis αποδείχθηκε ορολογικά, ενώ το DNA της *R.felis* ανιχνεύτηκε στον ορό της γυναίκας (Komitova *et al.* 2003). Η πρώτη περίπτωση λοίμωξης από *R.felis* στην Ασία, επιβεβαιωμένη ορολογικά, περιγράφηκε στην Ταϋλάνδη (Parola *et al.* 2003). Μια περίπτωση λοίμωξης από *R.felis* που εμφάνισε νευρολογικά συμπτώματα αναφέρθηκε το 2004 στο Μεξικό

(Galvao *et al.* 2004). Το πιο πιθανόν είναι ότι η νόσος είναι ευρύτατα διαδεδομένη, απλώς δεν έχει μελετηθεί και υποδιαγιγνώσκεται.



Εικόνα 7. Εντοπισμός της *Rickettsia felis* σε ψύλλους παγκοσμίος
Από το άρθρο: *Bartonella quintana* and *Rickettsia felis* in Gabon. Rolain *et al.* 2005

Τα είδη των ψύλλων που έχουν συσχετιστεί με την *R.felis* συμπεριλαμβάνουν τον ψύλλο της γάτας C*tenocephalides felis*, *Ctenocephalides canis*, και τον ανθρώπινο *Pulex irritans* και πιο πρόσφατα την *Archeopsylla erinacei* (Azad *et al.* 1997). *H Ricketsia felis* δεν προκαλεί το θάνατο του ψύλλου, (Azad *et al.* 1992) και όπως και η *R.typhi* μπορεί να μεταδοθεί διαωοθηκικά στους «απογόνους» του αρθροπόδου-ξενιστή ; συνεπώς το βακτήριο έχει τη δυνατότητα να παραμένει και να συντηρείται στη φύση μέσα στους πληθυσμούς των αρθροπόδων, κάνοντας έτσι τους ψύλλους, ειδικά τον *C. felis* ένα σημαντικό reservoir αλλά και amplifying host του βακτηρίου.Συνεπώς, επιτρέπεται η παραμονή του και η εγκατάσταση του παθογόνου σε μια «φωλεά» (niche) κάτω από ευνοικές συνθήκες περιβάλλοντος.

Ο ψύλλος *Ctenocephalides felis* φαίνεται να έχει ρόλο «κλειδί» και στη μετάδοση και τη διασπορά του παθογόνου. Έχει βρεθεί να παρασιτεί ένα ευρύ φάσμα θηλαστικών-ξενιστών, περιοικιακά (γάτες, σκυλιά) ή άγρια ζώα (opossums, τρωκτικά), και άλλα θηλαστικά στα οποία μπορεί να προσαρμοστεί αν χρειαστεί. Παρασιτεί επίσης τον άνθρωπο (Birtles *et al.* 1999). Από τα παραπάνω προκύπτει το συμπέρασμα πως ένας μολυσμένος με *Ricketsia felis* ψύλλος που παρασιτούσε ένα

τρωκτικό είναι δυνατόν να μολύνει ένα δεύτερο ξενιστή διαφορετικού είδου πχ ένα περιοικιακό ζώο κατά τη διάρκεια ενός γεύματος αίματος παρασιτισμό του σ' αυτό. Δίνεται ΄με τον τρόπο αυτό η δυνατότητα αφ' ενός της διασποράς του βακτηρίου σε διαφορετικούς φυσικούς ξενιστές και άρα την εγκατάσταση του, αφ' ετέρου την ευκαιρία στο παθογόνο για «γειτνίαση» με το ανθρωπογενές περιβάλλον. Το παραπάνω είναι πολύ σημαντικό για τη διασπορά της λοίμωξης από *Rickettisa felis* , αφού μεταφέρεται ο αιτιολογικός παράγοντας στο εγγύτερο περιβάλλον του ανθρώπου

Ο ρόλος των θηλαστικών συμπεριλαμβανομένων των γατιών, των σκύλων, των τρωκτικών και των σκαντζόχοιρων στον κύκλο ζωής της *R.felis* δεν είναι ακόμα ξεκάθαρος (Parola et al. 2005; Bitam et al. 2006).

Η *Rickettsia* felis έχει ανιχνευτεί κυρίως με τη μέθοδο της PCR στους ψύλλους *C felis, C canis,* και *Pulex irritans*; Είδη τα οποία έχουν παγκόσμια κατανομή (Rolain *et al.* 2003c).

Μέχρι σήμερα η παρουσία της *Rickettsia* felis έχει επιβεβαιωθεί στις ΗΠΑ, Βραζιλία, Μεξικό, Ισπανία, Γαλλία, Ηνωμένο Βασίλειο, Αιθιοπία, Νέα Ζηλανδία, Ταυλάνδη, Ουγγαρία, Β. Αφρική (Αλγερία), Ισραήλ, Αφρική κάτωθεν της Σαχάρας (Gabon), Αφγανιστάν και Αυστραλία.

Ανοικτά ερωτήματα παραμένουν: ποιό είναι το υπόδοχο της στη φύση καθώς και ποιός είναι ο κύκλος μετάδοσης αυτής της ρικέτσιας.

Παρ' όλο που *R felis* DNA έχει βρεθεί (σε ψηλά ποσοστά) σε ψύλλους *C.felis* που παρασιτούσαν σε γάτες, σε αρκετές χώρες όπως : Γαλλία (Kenny *et al.* 2003; Shaw *et al.* 2004), Ηνωμένο Βασίλειο (Bauer *et al.* 2006), Ισραήλ (Kelly *et al.* 2005), Νέα Ζηλανδία (Schloderer *et al.* 2006), Αυστραλία. (Parola *et al.* 2003), Ταϋλάνδη (Wedincamp and Foil 2000), εν' τούτοις έχουν εντοπιστεί ελάχιστες μόνο γάτες οι οποίες να έχουν ενεργή μόλυνση με *R.felis.*Εργαστηριακές γάτες οι οποίες εκτέθηκαν σε ψύλους που ήταν γνωστό οτι ηταν φορείς του βακτηρίου παρουσίασαν οροθετικότητα μετά απο τέσσερις μήνες και σε δυο απο τις δώδεκα γάτες εντοπίστηκε το DNA της ρικέτσιας στο αίμα με την μέθοδο PCR (Sorvillo *et al.* 1993; Breitschwerdt *et al.* 2005; Case *et al.* 2006). Σε μελέτες όπου ελέγχθηκαν γάτες που είχαν εκτεθεί με φυσικό τρόπο, ανιχνευθηκαν αντισώματα της *R.felis* αλλά δεν υπηρξε θετική αντίδραση PCR αλλα ούτε και επιτυχής καλλιέργια (Wedincamp and Foil 2002).

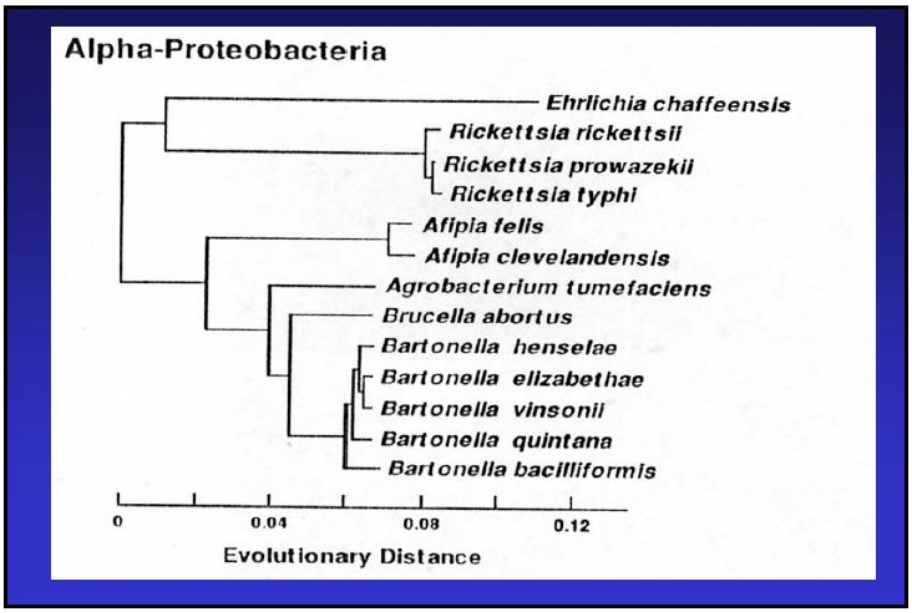
1.2. ΜΠΑΡΤΟΝΕΛΛΕΣ

1.2.1. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ

Τα είδη του γένους *Bartonella* (Μπαρτονέλλα) είναι Gram αρνητικά βακτήρια που ανήκουν στην άλφα-2 υποομάδα των Πρωτεοβακτηρίων. Οι μπαρτονέλλες έχουν μια στενή εξελικτική ομολογία με μέλη των γενών *Brucella*, *Agrobacterium* and *Rhizobium* [Εικόνα 8].

Μέχρι το 1992 το γένος *Bartonella* περιλάμβανε ένα μόνο είδος την *B.bacilliformis*. Τα τελευταία χρόνια, το γένος *Bartonella* επεκτάθηκε από την ενοποίηση με τα γένη *Rochalimaea* και *Grahamella*. Το γένος συνδυάζει τώρα όλα τα είδη των *Bartonella, Rochalimaea*, και *Grahamella* στην οικογένεια *Bartonella*ceae. Η οικογένεια *Bartonella*ceae έχει σήμερα αφαιρεθεί από την τάξη *Rickettsiales* (Kelly *et al.* 1998; Bereswill *et al.* 1999; Marston *et al.* 1999). Το γένος *Bartonella* σήμερα περιλαμβάνει περισσότερα από 20 είδη από τα οποία τουλάχιστον 8 είναι παθογόνα για τον άνθρωπο. Είδη παθογόνα για τον άνθρωπο: *B.bacilliformis*, *B.henselae*, *B.quintana*, *B. Elizabethae, B. Vinsonii, B. Clarridgeiae, B.grahamii, B. Washoensis.* Λαμβάνοντας υπ'όψιν τα είδη και στελέχη του βακτηρίου, τους ζωικούς ξενιστές και μεταβιβαστές, τη γεωγραφική τους κατανομή, και παθογένεια, η ποικιλομορφία του γένους των μπαρτονελλών, εμφανίζεται να είναι εκτεταμένη και σύνθετη.

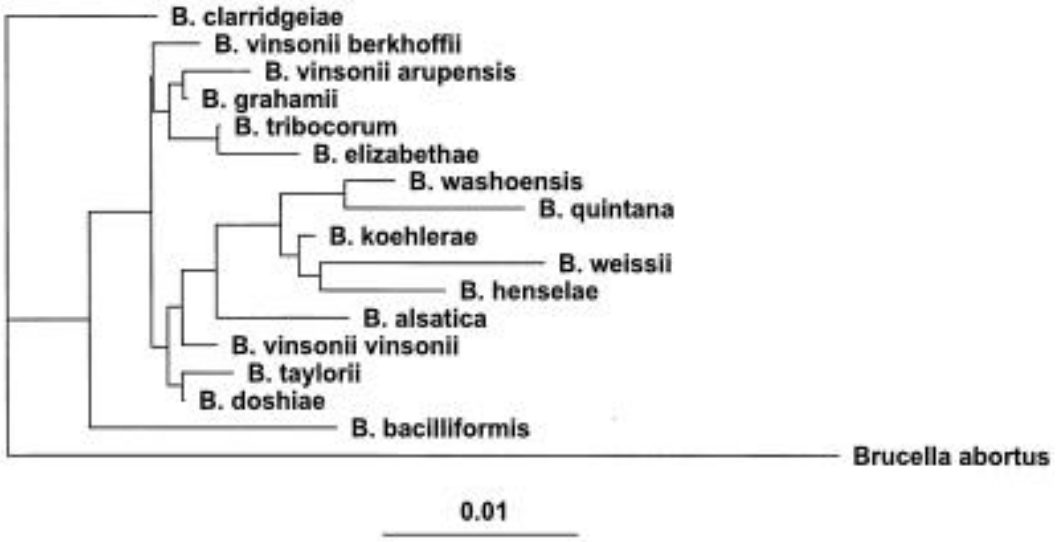
Μέχρι σήμερα για τη φυλογενετική ανάλυση των μπαρτονελλών έχουν χρησιμοποιηθεί συγκρίσεις των ακολουθιών από επτά γονίδια ή γονιδιακές θέσεις. Αυτά είναι το γονίδιο που κωδικοποιεί το 16S rRNA, η περιοχή ανάμεσα στα γονίδια των 16S και 23S (16S/23S intergenic spacer region-ITS) και πέντε γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες: το γονίδιο ribC (riboflavin synthetase), το γονίδιο ftsZ (πρωτεΐνη κυτταροδιαίρεσης), το γονίδιο gltA (citrate synthetase), και το groEL (60 kDa heat-shock πρωτεΐνη). Τα παραπάνω γονίδια σχετίζονται με βασικές κυτταρικές λειτουργίες. Έχει επίσης χρησιμοποιηθεί το 17 kDa αντιγόνο, μια πρωτεΐνη εξωτερικής μεμβράνης που προκαλεί ισχυρή ανοσοποιητική αντίδραση στους μολυσμένους ξενιστές (Olsen and Woese 1993). Η σύγκριση της ακολουθίας του 16S rRNA γονιδίου θεωρείται γενικά χρήσιμη για τις εξελικτικές σχέσεις, λόγω του υψηλού περιεχομένου πληροφοριών του γονιδίου, της αυτοσυντηρητικής του φύσης



Εικόνα 8. Κατάταξη των μπαρτονελλών εντός της άλφα-2 υποομάδας των Πρωτεοβακτηρίων

και της καθολικότητάς του [Εικόνα 9] (Birtles and Raoult 1996; Marston *et al.* 1999; Birtles *et al.* 2000).

Επειδή όμως, τα ριβοσωμικά γονίδια, όπως το 16S rRNA, είναι ιδιαίτερα διατηρημένα ανάμεσα στα βακτήρια, μπορεί να προκύψουν λανθασμένα αποτελέσματα. Περιοχές του γονιδιώματος που κωδικοποιούν πρωτεΐνες εμφανίζουν



Εικόνα 9: Φυλογενετικό δενδρόγραμμα με βάση το 16S DNA βακτηρίων του γένους *Bartonella* (1,272 nucleotides του γονιδίου)

μεγαλύτερο βαθμό στην διαφορετικότητα της αλληλουχίας και αυτό μπορεί να αποτελέσει κριτήριο για την διάκριση μεταξύ των διαφορετικών στελεχών του ίδιου είδους. Συνεπώς το ενδιαφέρον επικεντρώθηκε σε γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες επειδή εμφανίστηκαν να συντηρούνται σε επίπεδο ειδών του βακτηρίου αλλά να είναι ιδιαίτερα μεταβλητά μεταξύ διαφορετικών υποειδών. Η δυνατότητα, επίσης, της ανάλυσης των ακολουθιών τόσο σε πρωτεϊνικό οσο και σε γονιδιακό επίπεδο, προσθέτει μεγαλύτερη αξιοπιστία στα συμπεράσματα (Kelly *et al.* 1998; Bereswill *et al.* 1999). Στην πραγματικότητα, το μεγαλύτερο μέρος της παρούσας γνώσης για την ταξινόμηση των μπαρτονελών στηρίζεται σε τρία μόνο γονίδια, που χρησιμοποιούνται για τις φυλογενετικές μελέτες: αυτά είναι το γονίδιο που κωδικοποιεί το 16S rRNA (ITS), το gltA (citrate synthase), και το groEL (60 kDa heat-shock protein) (Birtles and Raoult 1996; Marston *et al.* 1999). Τα παραπάνω γονίδια έχουν γνωστή ακολουθία για τα περισσότερα είδη μπαρτονελλών. Όμως, η ερμηνεία των φυλογενετικών δέντρων παραμένει δύσκολη: η ταξινόμηση που βασίζεται στο 16S rRNA παρουσιάζει έλλειψη στατιστικής υποστήριξης μεταξύ των ειδών του βακτηρίου που εντοπίζονται σε ενδιάμεσα μεταβατικά στάδια μεταξύ ήδη καθορισμένων ειδών. Επιπροσθέτως, τα φυλογενετικά δέντρα που προκύπτουν από τις ακολουθίες γονιδίων groEL και gltA, αν και παρέχουν σ' ένα βαθμό σημαντική πληροφορία για την καταγωγή του βακτηρίου, παρουσιάζουν αποκλίσεις (Roux and Raoult 1995a; Birtles and Raoult 1996). Η χρήση της μεταβαλλόμενης ακολουθίας ITS είναι αμφισβητούμενη λόγω των αμφιβολιών σχετικά με την αξιοπιστία τέτοιων ακολουθιών ως δείκτες της μοριακής εξέλιξης (Dehio 2004).

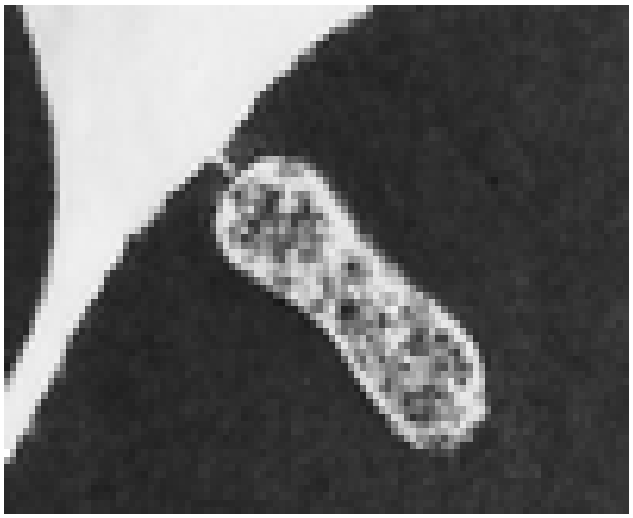
Περαιτέρω φυλογενετικές μελέτες απαιτούνται για να διευκρινίσουν την ταξινομική οργάνωση μέσα στο γένος και τις σχέσεις εξέλιξης μεταξύ των ειδών Μπαρτονέλας.

1.2.2. ΒΑΚΤΗΡΙΟΛΟΓΙΑ

1.2.2.1. Μορφολογία και χρώσεις

Οι μπαρτονέλλες είναι μικρά (0,3-0,6μm x 1-1,7μm), Gram-αρνητικά ραβδόμορφα βακτήρια. Είναι μέλη της άλφα-2 υποομάδας των άλφα-πρωτεοβακτηρίων.

Εκτός από τη *B.bacilliformis* δίνουν αρνητική αντίδραση οξειδάσης και καταλάσης. Είναι αερόβια, απαιτητικά, ραβδόμορφα βακτήρια . Τα περισσότερα είδη είναι ακίνητα εκτός από τη *B.bacilliformis* που έχει μαστίγια και εμφανίζει πολική κινητικότητα. Ως προς την μορφολογία και την χρώση τους μοιάζουν πολύ με τις ρικέτσιες . Σε μολυσμένους ιστούς, χρώση με Warthin-Starry silver stain αποκαλύπτει μικρούς βακίλους, οι οποίοι τείνουν να εμφανίζονται σαν συσσωματώματα. Ομοίως, οι μικροοργανισμοί μπορούν προσδιορισθούν στα ερυθροκύτταρα με τη χρώση May-Grünwald Giemsa.



Εικόνα 10. Φωτογραφία της *B.henselae* απο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο

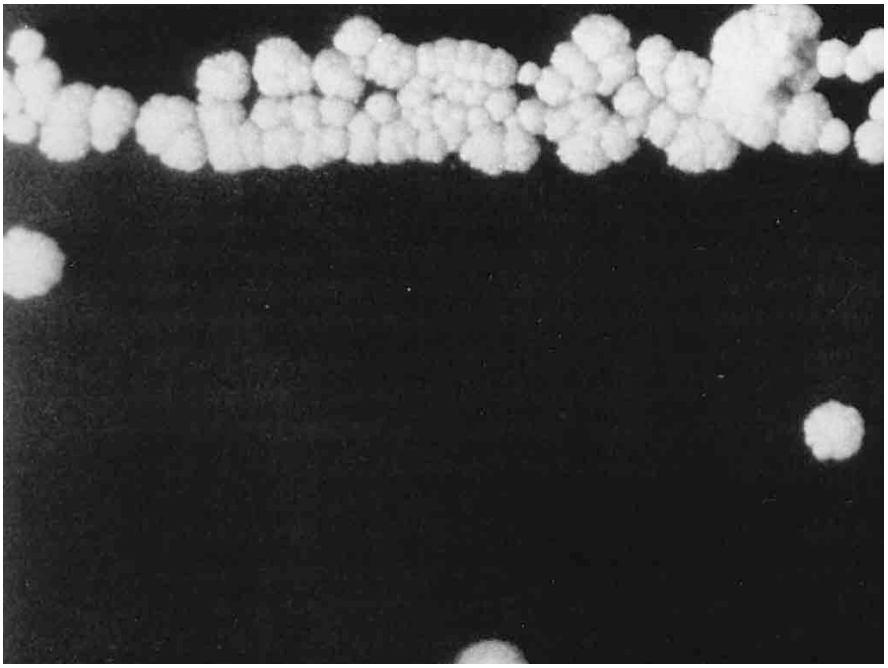
Τα περισσότερα είδη είναι βάκιλοι που προσκολλώνται στα ερυθροκύτταρα, τα μολύνουν και μπορεί να προκαλέσουν παρατεταμένη ενδοερυθροκυττάρια

βακτηραιμία στον ξενιστή τους [Εικόνα 10] (Heller *et al.* 1998). Μια τέτοιου είδους μόλυνση έχει λεπτομερώς περιγραφεί σε πείραμα με μόλυνση αρουραίων με *την B. tribocorum* (Dehio 2004). Επιπλέον, μερικά είδη μπαρτονέλλας είναι μοναδικά μεταξύ όλων των γνωστών παθογόνων βακτηρίων όσον αφορά τη ιδιότητα τους να προκαλέσουν νεοαγγείωση μέσω της δυνατότητάς τους να εισβάλουν στα ενδοθηλιακά κύτταρα και να ωθήσουν τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση αυτών των κυττάρων (Breitschwerdt and Kordick 2000).

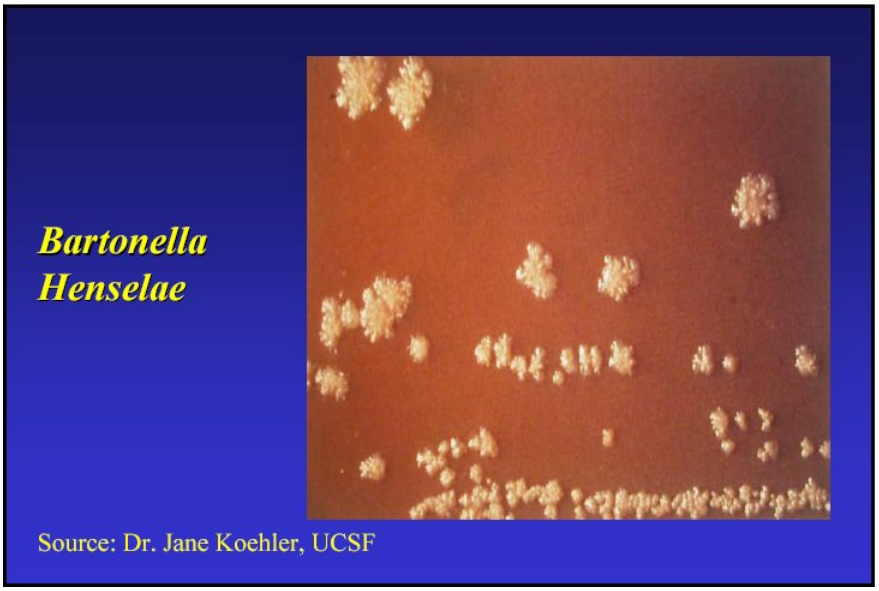
1.2.2.2. <u>Καλλιέργια</u>

Οι μπαρτονέλλες είναι βακτήρια ιδιαίτερα εξαρτώμενα από την αιμίνη (hemin). Καλλιεργούνται σε άγαρ εμπλουτισμένο με αίμα κουνελιού, προβάτου ή αλόγου σε θερμοκρασία 35°C - 37oC και σε ατμόσφαιρα 5% CO_2, εκτός από τη *B. bacilliformis*, η οποία πολλαπλασιάζεται καλύτερα στους 28°C.

Σχηματίζουν διαφανείς και στερεά προσφυόμενες στο άγαρ αποικίες στην πρωτοκαλλιέργεια. Στις ανακαλλιέργειες ο χρόνος εμφάνισης των αποικιών και η πρόσφυσή τους στο άγαρ προοδευτικά μειώνονται.



Εικόνα 11. Μορφολογία αποικιών μπαρτονέλλας



Εικόνα 12: Μορφολογία αποικιών της *B.henselae* σε αιματούχο άγαρ

Κατά την αρχική απομόνωση, κάποιες μπαρτονέλλες, όπως *B.henselae, B. clarridgeiae, B. vinsonii*, ή *B. elizabethae* δημιουργούν αποικίες με άσπρη, τραχιά, ξηρή, εξογκωμένη μορφή [Εικόνες 11 και 12]. Οι αποικίες είναι δύσκολο να χωριστούν ή να μεταφερθούν. Ο χρόνος επώασης κυμαίνεται απο 2 έως 6 εβδομάδες (5 - 15 μέχρι και πάνω από 45 μέρες για να γίνουν ορατές οι πρωτοκαλλιέργειες)

1.2.3. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ

Οι μπαρτονέλλες είναι καταλάση-, οξειδάση-, ουρεάση-αρνητικές (Houpikian and Raoult 2001). Λόγω της αργής αύξησης των μπαρτονελλών, δεν είναι εφαρμόσιμες οι πρότυπες βιοχημικές μέθοδοι για την ταυτοποίηση. Για την ταυτοποίηση των στελεχών και των ειδών των μπαρτονελλών χρησιμοποιούνται σήμερα μοριακές γενετικές μέθοδοι.

1.2.3.1. Γονοτυπική ταυτοποίηση

Μέθοδοι που έχουν χρησιμοποιηθεί στην ταυτοποίηση είναι η RFLP και η ανάλυση αλληλουχίας στα γονίδια που κωδικοποιούν την κιτρική συνθετάση *(gltA)*, την 16SrRNA ή 16S–23S rRNA spacer region. Έχει επίσης χρησιμοποιηθεί ανάλυση βασισμένη στην αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR) τυχαίων, επαναλαμβανόμενων εκτός γονιδίων παλινδρομικών ακολουθιών.

Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης για την αύξηση της ποσότητας του DNA αλλά και την ανάλυση γονιδίων χρησιμοποιείται, πλέον, ευρέως για την διάκριση των ειδών της μπαρτονέλλας. Οι γονιδιακές αλληλουχίες των γονιδίων της περιοχής 16S/23S rRNA intergenic spacer region (Marston *et al.* 1999), της heat shock πρωτείνης (*gro*EL) (Birtles and Raoult 1996), της κιτρικής συνθετάσης (*glt*A) (Bereswill *et al.* 1999), της ριβοφλαβίνης (*rib*C) (Ehrenborg *et al.* 2000), του *fts*Z που λαμβάνει μέρος στηνκυτταρική διαίρεση (La Scola *et al.* 2002a), και του *pap*31 (Schulein *et al.* 2001) έχουν χρησιμοποιηθεί για τον εντοπισμό, την ταυτοποίηση, την φυλογενετική ταξινόμηση και την εύρεση υποτύπων της μπαρτονέλλας.

1.2.4. ΟΙΚΟΛΟΓΙΑ-ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

Ένας από τους προφανέστερους δείκτες της επιτυχίας των μπαρτονελλών ως παράσιτα είναι η ποικιλομορφία των θηλαστικών που μπορούν να μολύνουν. Μολύνσεις με μπαρτονέλλα έχουν ανακαλυφθεί ουσιαστικά σε όλα τα είδη που ερευνώνται, τα οποία μέχρι σήμερα επεκτείνονται σε μέλη επτά διαφορετικών οικογενειών των θηλαστικών συμπεριλαμβανομένων των σαρκοβόρων, πρωτευόντων θηλαστικών, οπληφόρων, τρωκτικών, λαγόμορφων, εντομοφάγων, και χειρόπτερων (Pretorius *et al.* 2004). Τα είδη που δεν φαίνονται επιρρεπή σε μόλυνση είναι τα άλογα και το είδος λαγού *Pedetes capensis* (Boulouis *et al.* 2005) χωρίς να έχει διευκρινιστεί ο λόγος που αυτά τα ζώα είναι ανθεκτικά στις μπαρτονέλλες.

Οι μπαρτονέλλες έχουν απομονωθεί από διάφορα είδη μικρών θηλαστικών τρωκτικά (αρουραίοι, ποντικοί), αλλά και οικόσιτων ζώων (γάτες, σκύλοι, βοοειδή). Τα ζώα είναι συνήθως ασυμπτωματικά. Η γάτα φαίνεται ότι αποτελεί το κυριότερο υπόδοχο της *B.henselae*, *B. clarridgeiae* και *B. koehlerae. Η Bartonella vinsonii* απομονώθηκε από σκύλους, η *Bartonella tribocorum* και η *B. elizabethae* απομονώθηκαν από τρωκτικά, ενώ η *B. Alsatica* απομονώθηκε από άγρια κουνέλια. Μηρυκαστικά και άγρια ζώα επίσης αναφέρονται σαν φυσικοί ξενιστές.

Η προσαρμογή των μπαρτονελλών ούτως ώστε να εκμεταλλευτούν μια τέτοια ποικιλομορφία θηλαστικών ξενιστών τις έχει γενικά οδηγήσει σε κάποιο βαθμό ειδικότητας όσων αφορά τους ξενιστές τους. Και τα 20 είδη μπαρτονελλών που περιγράφονται μέχρι σήμερα είναι σε θέση να παρασιτίσουν μόνο σε ένα περιορισμένο αριθμό θηλαστικών (Birtles *et al.* 1994). Για παράδειγμα, η *B.bacilliformis* και η *B.quintana* υπό φυσιολογικές συνθήκες μολύνουν μόνον ανθρώπους, και η *B. henselae* μολύνει ένα ευρύτερο φάσμα αιλουροειδών ξενιστών ενώ η *B. alsatica* μολύνει μόνο κουνέλια (Birtles *et al.* 1994; Holmberg *et al.* 2003). Κάποιοι ξενιστές είναι επιρρεπείς σε μόλυνση από διαφορετικά είδη μπαρτονελλών; οι γάτες μολύνονται από τα *B.clarridgeiae* και *B.koehlerae* καθώς επίσης και την *B.henselae*, και πληθυσμοί ευρωπαϊκών τρωκτικών του δάσους όπως τα ποντίκια του ξύλου *Apodemus sylvaticus* και αρουραίοι των αγρών *Clethrionomys glareolus* μπορούν να διατηρήσουν τουλάχιστον τέσσερα διαφορετικά είδη μπαρτονελλών (Pretorius *et al.* 2004). Φυλογενετικές έρευνες έχουν δείξει ότι τα είδη μπαρτονελλών που μολύνουν έναν συγκεκριμένο θηλαστικό ξενιστή δεν συσχετίζονται. Επιπλέον,

δεν υπάρχει καμία προφανής σχέση μεταξύ της φυλογένεσης των μπαρτονελλών και των συγκεκριμένων ξενιστών που παρασιτούν (Regnery *et al.* 1992a; Koehler *et al.* 1994; Chomel *et al.* 1995). Η μετάδοση των μπαρτονελλών μεταξύ των ζώων και στις περισσότερες περιπτώσεις από τα ζώα στον άνθρωπο γίνεται από αιμομυζητικά αρθρόποδα [Πίνακας 3].

Πίνακας 3. Είδη και υποείδη *Bartonella* των οποίων η παθογονικότητα για τον άνθρωπο είναι επιβεβαιωμένη ή πιθανή

***Bartonella* sp.**	**Primary reservoir**	**Vector**
B.bacilliformis	Human	Sand fly (Lutzomyia verrucarum)
B.quintana	Human	Body louse (Pediculus humanus corporis)
B. elizabethae	Rat (Rattus norvegicus)	Oriental rat flea (Xenopsylla cheopis)
B. grahamii	Wild mice (Clethrionomys giareolus, Microtus agrestis, Apodemus flavicollis)	Rodent fleas
B.henselae	Cat (Felis catus)	Cat flea (Ctenocephalides felis)
B. clarridgeiae	Cat	Cat flea
B. koehlerae	Cat	Cat flea
B. vinsonii subsp. Berkhoffii	Coyote (Canis latrans) dog (C. familiaris)	Unknown (ticks?)
B. vinsonii subsp. Arupensis	White-footed mouse (Peromyscus leucopus)	Unknown (fleas?, ticks?)
B. washoensis	California ground squirrel (Spermophilus beecheyii)	Unknown (fleas?)
B. alsatica	Rabbit	Unknown (flea?)
***Bartonella* sp.**	**Accidental host**	
B.bacilliformis	None	
B.quintana	Cat, dog, monkey	
B. elizabethae	Human, dog	
B. grahamii	Human	
B.henselae	Human, dog	
B. clarridgeiae	Human?, dog	
B. koehlerae	Human	
B. vinsonii subsp berkhoffii	Human	
B. vinsonii subsp arupensis	Human	
B. washoensis	Human, dog	
B. alsatica	Human?	

1.2.4.1. Κύκλος μετάδοσης των μπαρτονελλών

Κοινά χαρακτηριστικά γνωρίσματα των μπαρτονελλών είναι η μετάδοση τους μέσω ενός αρθροπόδου- μεταβιβαστή και η επιβίωση τους σε θηλαστικά- ξενιστές.

Σύγκριση της επιδημιολογίας και φυσιοπαθολογίας των ιατρικά σημαντικών μπαρτονελλών αποκαλύπτει κοινά γνωρίσματα. Όλες προκαλούν αιμοτροπικές μολύνσεις στους ξενιστές τους και, σε γενικές γραμμές, εμφανίζουν να μην προκαλούν άμεση παθογένεια στον ξενιστή. Τέλος, όλοι οι παράγοντες μόλυνσης μεταβιβάζονται μεταξύ των θηλαστικών ξενιστών από τα αιματοφάγα αρθρόποδα.

Οι μελέτες στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικά είδη μπαρτονελών έδειξαν ότι υπάρχουν πολλές ομοιότητες μεταξύ των κύκλων μετάδοσης τους, αλλά και το ότι αυτοί οι κύκλοι είναι εκπληκτικά σύνθετοι. Κάποια από τα στάδια του κύκλου μετάδοσης που συνδέονται με θηλαστικά ανακαλύφθηκαν χρησιμοποιώντας αρουραίους που μολύνθηκαν πειραματικά με την *B. tribocorum* (Padmalayam *et al.* 2000; Schmiederer and Anderson 2000). Άλλα στάδια δεν έχουν χαρακτηριστεί με την ίδια επιτυχία.

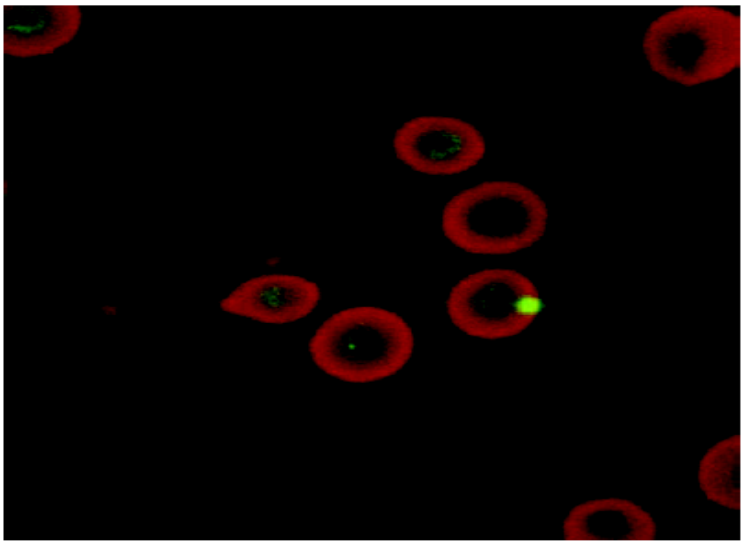
1.2.4.1.1. Ενοφθαλμισμός ξενιστών και κυκλοφορία στο αίμα

Τα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων χρησιμεύουν ως μια αρχική θέση για τις μπαρτονέλλες πριν από την εισαγωγή τους στην κυκλοφορία του αίματος. Η μεταφορά της μόλυνσης από την περιοχή του ενοφθαλμισμού παραμένει αδιευκρίνιστη. Έχουν ανακαλυφθεί και χαρακτηριστεί μερικοί παράγοντες παθογονικότητας των μπαρτονελλών που συνδέονται με την ανατροπή της λειτουργίας των ενδοθηλιακών κυττάρων. Στην *B. henselae* βρέθηκαν και χαρακτηρίστηκαν διάφορα γονίδια ομόλογα της περιοχής *vir* του *Agrobacterium tumefaciens* που κωδικοποιούν διάφορους παράγοντες του τύπου IV εκκριτικού συστήματος (Schulein *et al.* 2001). Η χρονική περίοδος όπου οι μπαρτονέλλες διατηρούνται μέσα στα ενδοθηλιακά κύτταρα είναι συγκεχυμένη. Σύμφωνα με το μοντέλο *B. tribocorum*- αρουραίοι η περίοδος στειρότητας του αίματος μετά από τον ενοφθαλμισμό τερματίζεται απότομα μετά από περίπου πέντε ημέρες με την

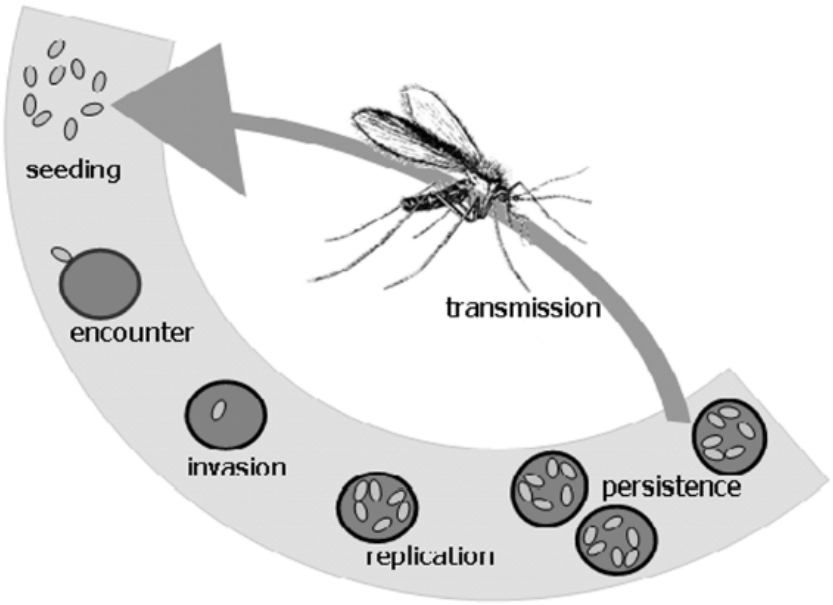
απελευθέρωση μεγάλου αριθμού βακτηριδίων στην κυκλοφορία του αίματος (Schulein *et al.* 2001). Πρόσθετες απελευθερώσεις ακολουθούν αυτό το αρχικό επεισόδιο ανά τακτά διαστήματα πέντε ημερών, με συνέπεια νέα μόλυνση του πληθυσμού των ενδοθηλιακών κυττάρων από τα βακτηρίδια που απελευθερώθηκαν κατά τη διάρκεια του προηγούμενου επεισοδίου (Rolain *et al.* 2002). Εάν αυτό συμβαίνει *in vivo*, τότε η σύνδεση μεταξύ των μπαρτονελλών και των ενδοθηλιακών κυττάρων είναι αρκετά σύντομη.

1.2.4.1.2. Εκμετάλλευση των ερυθροκυττάρων

Η αποίκιση των ερυθροκυττάρων είναι, ίσως, η πιο ενδιαφέρουσα παρασιτική στρατηγική που εξελίχθηκε από τις μπαρτονέλλες. Η ενδοερυθροκυττάρια θέση των Μπαρτονελών μπορεί να επιβεβαιωθεί με τη χρήση ομοεστιακής μικροσκόπησης με σάρωση λέιζερ [Εικόνα 13] (Abbott *et al.* 1997; Boulouis *et al.* 2001; Schulein *et al.* 2001).



Εικόνα 13. Ομοεστιακή απεικόνιση με σάρωση λέιζερ της ενδοερυθροκυττάριας θέσης των Μπαρτονελλών



Εικόνα 14. Τυπικό παράδειγμα της πορείας του κύκλου μετάδοσης των μπαρτονελλών στο θηλαστικό ξενιστή. Μετά από τον ενοφθαλμισμό, τα βακτηρίδια διασπείρονται τελικά στην κυκλοφορία του αίματος, όπου συνδέονται, και έπειτα εισβάλουν στα ερυθροκύτταρα. Μέσα στα ερυθροκύτταρα, οι μπαρτονέλλες πολλαπλασιάζονται και παραμένουν καθ' όλη τη διάρκεια της διάρκειας ζωής του κυττάρου ξενιστή τους, διευκολύνοντας τη λήψη τους από τα παρασιτικά αρθρόποδα που χρησιμεύουν ως φορείς τους.

Όλες οι μελέτες (Abbott *et al.* 1997) έχουν καταδείξει ότι η βακτηριαιμία μπορεί να είναι εξαιρετικά χρόνια με διάρκεια, παραδείγματος χάριν, για αρκετές εβδομάδες στα τρωκτικά και αρκετούς μήνες στις γάτες, γεγονός που διευκολύνει τη λήψη των μπαρτονελλών κατά τη διάρκεια σιτίσεως των αιματοφάγων αρθρόποδων. Εντούτοις, ο βαθμός μόλυνσης δεν διατηρείται στο ίδιο επίπεδο καθ' όλη τη διάρκεια της μόλυνσης, αλλά μάλλον η συγκέντρωση των μπαρτονελλών στο αίμα αυξάνεται γρήγορα κατά τη διάρκεια των αρχικών σταδίων της βακτηριαιμίας και έπειτα βαθμιαία μειώνεται κατά την υπόλοιπη περίοδο της λοίμωξης. Το μέγιστο επίπεδο μόλυνσης ποικίλλει μεταξύ ξενιστών. Κατά τη διάρκεια μιας *in vivo* μόλυνσης σε ανθρώπους μολυσμένους με *B.quintana,* 1 στα 20.000 ερυθροκύτταρα είναι μολυσμένο, ενώ στα τρωκτικά οι μπαρτονέλλες προκαλούν πολύ εντονότερες μολύνσεις, παρασιτώντας 1 σε 250 ερυθροκύτταρα. Ο λόγος για αυτήν την

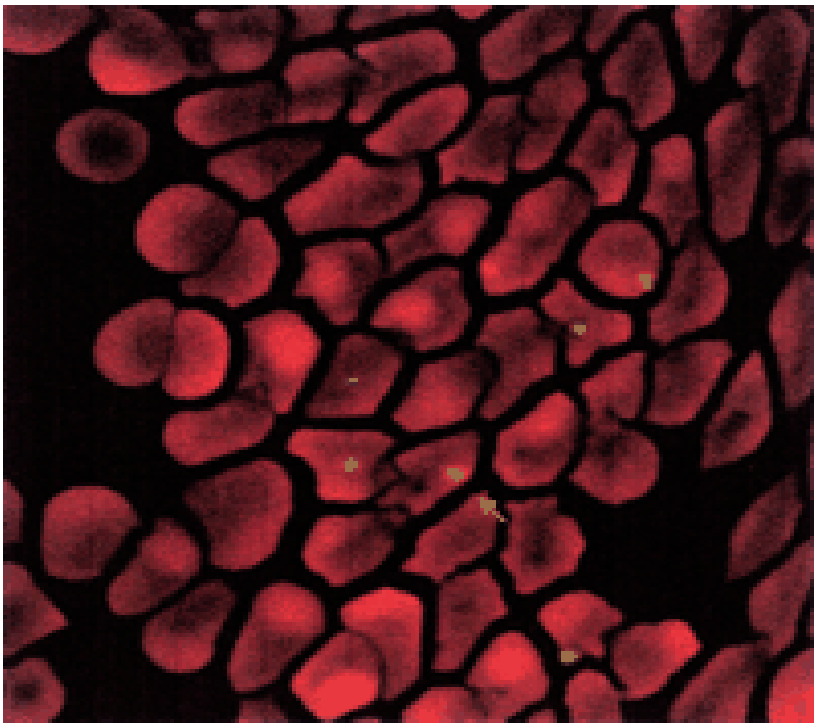
διαφοροποίηση είναι ασαφής. Εντονότερος βαθμός μόλυνσης θα ευνοήσει μεν τη μετάδοση, αλλά αυτό το όφελος πρέπει να σταθμιστεί ενάντια στο κόστος της ευημερίας των ξενιστών που είναι απαραίτητοι για τη διατήρηση των βακτηρίων.

Μερικοί ξενιστές, όπως οι γάτες, αντιδρούν με σημαντική ανοσολογική απόκριση, αν και η βακτηριαιμία εμμένει (Kosoy *et al.* 1997). Εν τούτοις, σε άλλους ξενιστές, ιδιαίτερα στα μικρά θηλαστικά, ειδικά αντισώματα ανιχνεύονται πολύ σπάνια (Koesling *et al.* 2001). Έτσι, αν και μελέτες που περιλαμβάνουν πειραματικά μολυσμένα τρωκτικά έχουν υποδείξει έναν ρόλο των αντισωμάτων στον περιορισμό της βακτηριαιμίας (Boulouis *et al.* 2005; Concannon *et al.* 2005) αμφισβητείται αν το ίδιο συμβαίνει και στους φυσικά μολυσμένους ξενιστές.

1.2.4.2. Μπαρτονέλλες με ξενιστή γάτα ή σκύλο

Οι κατοικίδιες γάτες είναι ο κύριος ξενιστής για τα είδη *Bartonella henselae*, *Bartonella clarridgeiae,* και η *Bartonella koehlera* (Chomel *et al.* 1995; Heller *et al.* 1997; Spach and Koehler 1998; Jensen *et al.* 2000; Jacomo *et al.* 2002; Yamamoto *et al.* 2002). Τα 3 αυτά είδη μπαρτονέλλας έχουν απομονωθεί από την οικόσιτη γάτα (*Felic catus*) η οποία και είναι γνωστή «δεξαμενή» του βακτηρίου (La *et al.* 2005). Έχει επίσης ανιχνευθεί DNA από *B.quintana* σε οδοντικό πολφό γάτας (Chomel *et al.* 1996). Τα παραπάνω στελέχη *(B. henselae*, *B. clarridgeiae* και *B. koehlerae)*, είναι παθογόνα για τους ανθρώπους και μπορούν να μεταδοθούν μέσω εκδορών του δέρματος που μπορεί να προκαλέσουν τα νύχια ή το δάγκωμα μιας μολυσμένης γάτας, καθώς επίσης και μέσω του τσιμπήματος του ψύλλου της γάτας, *Ctenocephalides felis* ή από κρότωνα (Carithers 1985; Lucey *et al.* 1992; Zangwill *et al.* 1993; Foil *et al.* 1998; Finkelstein *et al.* 2002; Rolain *et al.* 2003b). Εντούτοις, τελευταία έχει προταθεί ότι μάλλον δεν είναι το δήγμα από ψύλλο ο τρόπος μόλυνσης αλλά ότι τα περιττώματα ψύλλων είναι το μολυσματικό υλικό που ενοφθαλμίζεται σε υγιή άτομα μέσω γρατσουνιάς από γάτα (Chung *et al.* 2004). Έχει ανιχνευθεί DNA από *B. henselae* σε μύγα, γεγονός που προκαλεί την ανησυχία για το ρόλο αυτού του εντόμου ως μεταβιβαστή μπαρτονελλών (Koehler *et al.* 1994).

Σε φυσιολογικές συνθήκες οι μολυσμένες γάτες αποτελούν συνήθως υγιείς φορείς του μικροβίου (Chomel *et al.* 1995). Αν και ασυμπτωματικές, οι γάτες μπορεί να παραμείνουν βακτηριαιμικές για αρκετούς μήνες ή και χρόνια [Εικόνα 15] (Chomel *et al.* 1995; Kordick *et al.* 1995; Abbott *et al.* 1997; Kordick and Breitschwerdt 1997; Kordick *et al.* 1997b; Kordick and Breitschwerdt 1998; Kordick *et al.* 1999). Ο οροεπιπολασμός και το επίπεδο βακτηραιμίας (cfu/ μίλιλιτρο αίματος) είναι συνήθως υψηλότερα στις νέες γάτες (< 1 έτος) απ'ό,τι στις ενήλικες (Koehler *et al.* 1994; Chomel *et al.* 1995; Demers *et al.* 1995; Kordick *et al.* 1995; Maruyama *et al.* 1996).



Εικόνα 15. Παρουσία *B.henselae* μέσα σε μολυσμένα ερυθροκύτταρα γάτας (arrow) Η βακτηριαιμία στις γάτες είναι ασυμπτωματική συνεχής ή διαλείπουσα. Διατηρούν τα βακτήρια (μέσα στα ερυθροκύτταρα) μέχρι και ένα χρόνο.

Το υψηλό επίπεδο επιπολασμού ασυμπτωματικής βακτηριαιμίας που εντοπίζεται στις γάτες σήμερα υποδεικνύει ένα μακρύ ιστορικό παράλληλης εξέλιξης της μπαρτονέλλας και της γάτας. Ο εντοπισμός και μοριακή ανάλυση του γενετικού

υλικού της *Bartonella* spp. από απομεινάρια γατών του παρελθόντος ίσως αποτελέσει βοήθημα για τους ερευνητές ώστε να κατανοήσουν περισσότερο την εξέλιξη της συμβιωτικής σχέσης μεταξύ βακτηρίου και γάτας.

Η *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii* έχει προσδιοριστεί σε περίπτωση ενδοκαρδίτιδας σε άνθρωπο (Breitschwerdt and Kordick 2000). Αυτό το υποείδος εμφανίζεται να είναι το πιο κοινό είδος / υποείδος Μπαρτονέλας που προκαλεί ενδοκαρδίτιδα στα σκυλιά (Chomel *et al.* 2001; Chomel *et al.* 2003a; MacDonald *et al.* 2004) εντούτοις κι άλλα είδη Μπαρτονέλας, συμπεριλαμβανόμενων των *B. clarridgeiae* και *B. washoensis* έχουν προσδιορισθεί σε περιπτώσεις ενδοκαρδίτιδαςσε σκυλιά (Pappalardo *et al.* 1997; Solano-Gallego *et al.* 2004; Henn *et al.* 2005). Συνολικά, ο επιπολασμός των αντισωμάτων για την *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii* σε κατοικίδια σκυλιά είναι αρκετά χαμηλός (< 5%) (Baneth *et al.* 1998; Honadel *et al.* 2001), αλλά μπορεί να είναι υψηλότερος σε συγκεκριμένους πληθυσμούς (Chang *et al.* 1999; Chang *et al.* 2000) και ειδικά στα αδέσποτα σκυλιά στους τροπικούς που κυμαίνεται από 19% (5/26) για σκυλιά στη γαλλική Γουιάνα και τη Μαρτινίκα εώς 65% (33/51) για σκυλιά στο Sudan. Στις δυτικές ΗΠΑ, τα κογιότ (*Canis latrans*) αποτελούν ένα σημαντικό ξενιστή για τη *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii* (Demers *et al.* 1995; Barnes *et al.* 2000; Henn *et al.* 2005). Τα περιορισμένα στοιχεία που είναι διαθέσιμα για τον επιπολασμό της *B.henselae* στα σκυλιά (Solano-Gallego *et al.* 2004) δείχνουν να είναι αρκετά χαμηλός. Εντούτοις, μελέτη ανάφερε τον υψηλότερο επιπολασμό αντισωμάτων για *B. henselae* σε υγιή (10,1%) και άρρωστα (27,2%) σκυλιά στις νοτιοανατολικές ΗΠΑ (Greene *et al.* 1996; Regnery *et al.* 1996; Abbott *et al.* 1997; Guptill *et al.* 1997).

Λίγες μελέτες αναφέρουν τον οροεπιπολασμό της *B.quintana* στις γάτες. Οι περισσότερες έρευνες πάνω στην παθογένεια του βακτηρίου συντελέστηκαν σε οικόσιτες γάτες οι οποίες μολύνονταν με *B.henselae* (Regnery *et al.* 1996). Οι γάτες που μολύνθηκαν με *B.henselae* ανέπτυξαν επίμονη βακτηριαιμία για 1-8 μήνες ενώ οι γάτες που μολύνθηκαν με *B.quintana* δεν εμφάνισαν βακτηριαιμία (Haimerl *et al.* 1999).

Στη Γερμανία, ο οροεπιπολασμός των *B.quintana*-IgG αντισωμάτων σε οικιακές γάτες ήταν >14% (Baneth *et al.* 1996), ενώ στο Ισραήλ 20.2% (Rolain *et al.* 2003b). Σε πρόσφατες μελέτες, *B.quintana* DNA ανιχνεύτηκε σε ψύλλους της γάτας

(Kosoy *et al.* 1999). Όμως, απαιτείται παραπέρα διερεύνηση για να τεκμηριωθεί η υπόθεση ότι οι γάτες λειτουργούν σαν reservoirs για τη *B.quintana*.

1.2.4.3. Τρωκτικά σαν ξενιστές Μπαρτονέλλας

Προς το παρόν, μόνο ένας περιορισμένος αριθμός μπαρτονελλώσεων σε ανθρώπους που προκαλούνται από είδη ή υποείδη μπαρτονέλλας με ξενιστές τρωκτικά έχουν περιγραφτεί στην βιβλιογραφία. Υπάρχουν ακόμα πολλά ερωτηματικά για την επιδημιολογία και τον τρόπο μετάδοσης των μπαρτονελλών που έχουν συνδεθεί με τρωκτικά (π.χ. τρόπος και πηγή μόλυνσης, εμπλεκόμενος μεταβιβαστής, κ.λ.π.).

Σε μια σειρά πειραμάτων χρησιμοποιώντας 3 στελέχη μπαρτονέλλας, τα οποία είχαν απομονωθεί από φυσικά μολυσμένους αρουραίους, προκλήθηκε βακτηριαιμία σε εργαστηριακά μεγαλωμένους αρουραίους, του ιδίου είδους, ανεξαρτήτως της ποσότητας υλικού μόλυνσης που χρησιμοποιήθηκε (Comer *et al.* 1996; Comer *et al.* 2001; McGill *et al.* 2003). Η βακτηριαιμία επέμεινε για ένα διάστημα 35 με 77 ημερών. Μετά το πέρας του συμπτώματος της βακτηριαιμίας, η μόλυνση των ίδιων οργανισμών από ένα ετερόλογο είδος προκάλεσε και πάλι ανιχνεύσιμη βακτηριαιμία ενώ 8 από τα 9 πειραματόζωα που μολύνθηκαν με ένα ομόλογο είδος μπαρτονέλλας παρέμειναν μη-βακτηριαιμικά.

Τα είδη μπαρτονέλλας που σχετίζονται με τρωκτικά είναι η *B. Elizabethae,* η *B. Grahamii, η B. taylorii* και η *B. vinsonii* subspecies *arupensis.* Σε μελέτη έχει βρεθεί σε τρωκτικά και η *B.henselae*.

Σύμφωνα με ορολογικές μελέτες, μεταξύ των μπαρτονελλών με τρωκτικά σαν ξενιστή, η λοίμωξη με *B. elizabethae* φαίνεται να είναι συχνή στους χρήστες ενδοφλέβιων (IV) φαρμάκων και σε άστεγους σε διάφορα μέρη των ΗΠΑ και στη Σουηδία (Comer *et al.* 1996). Σε χρήστες, ενδοφλέβιων φαρμάκων ο οροεπιπολασμός για την *B. elizabethae* κυμαίνεται από 33% στη Βαλτιμόρη (McGill *et al.* 2003) σε 39% στην Στοκχόλμη (Comer *et al.* 2001) και 46% στη Νέα Υόρκη (Smith *et al.* 2002). Στους άστεγους από το Λος Αντζελες της Καλιφόρνιας, ο οροεπιπολασμός ήταν 12,5% (McGill *et al.* 2001). Επιπλέον, 31% από 1.136 Σουηδούς αθλητές του orienteering βρέθηκαν οροθετικοί για την *B. elizabethae* (Daly *et al.* 1993; O'Halloran *et al.* 1998). Λοιμώξεις που προκαλούνται από την *B. elizabethae* σε

ανθρώπους έχουν συνδεθεί με ενδοκαρδίτιδα και νευρορετινίτιδα (Birtles and Raoult 1996; Ellis *et al.* 1999).

Αρουραίοι του γένους *Rattus* μεταφέρουν βακτήρια πανομοιότυπα ή σε μερικές περιπτώσεις στενά συγγενικά με την *B.elizabethae* (Childs *et al.* 1999; Ellis *et al.* 1999). Οι αρουραίοι *Rattus norvegicus* αποτελούν τον κύριο ξενιστή της *B. elizabethae* (Birtles and Raoult 1996; Ellis *et al.* 1999). Αυτό το είδος Μπαρτονέλλας έχει απομονωθεί από αρουραίους σε διάφορα μέρη του κόσμου από την βόρεια και νότια Αμερική (ΗΠΑ: Λουιζιάνα, Μέρυλαντ- Περού), αλλά και την Ευρώπη (Πορτογαλία) (Ying *et al.* 2002). (βλ. Πίνακας 1 Παράρτημα). Στην Κίνα (Yunnan), οι αρουραίοι είναι μολυσμένοι με μεγάλο αριθμό στελεχών Μπαρτονέλλας που σχετίζονται γενετικά με την *B. elizabethae* (Castle *et al.* 2004). Στην Ταϊλάνδη, απομονωθέντα στελέχη μπαρτονέλλας από τρωκτικά σχετίζονται με την *B. grahamii* και την *B. elizabethae,* δύο είδη που έχουν συνδεθεί με ανθρώπινη ασθένεια (Birtles *et al.* 1994).

Η *B. grahamii* έχει απομονωθεί κυρίως από αρουραίους (*Clethrionomys glareolus*) στο Ηνωμένο Βασίλειο (Bajer *et al.* 2001) και στην Πολωνία (Holmberg *et al.* 2003) και από ποντίκια (*Flavicollis Apodemus*) στη Σουηδία (Ellis *et al.* 1999), όπως επίσης και από αρουραίους στις ΗΠΑ (Kerkhoff *et al.* 1999; Serratrice *et al.* 2003). Ο ψύλλος τρωκτικών *Ctenophthalmus nobilis* αποδείχθηκε πρόσφατα να είναι ικανός μεταβιβαστής για τουλάχιστον δύο είδη Μπαρτονέλλας, τη *B. grahamii*, η οποία έχει συνδεθεί με οφθαλμικές λοιμώξεις στον άνθρωπο, νευρορετινίτιδα και αμφιβληστροειδίτιδα (Bown *et al.* 2004), και τη *B. taylorii* (Hofmeister *et al.* 1998; Welch *et al.* 1999). Τα ποντίκια του είδους *Peromyscus leucopus* είναι ο ξενιστής της *B. vinsonii* subspecies *arupensis*, η οποία έχει απομονωθεί σε 5% από 81 ποντίκια στη Μινεσότα και το Ουισκόσιν και η οποία είναι συνδεμένη με μπαρτονέλλωση σε ανθρώπους (πυρετός, βακτηραιμία, νευρολογικά συμπτώματα) (Kosoy *et al.* 2003). Οι σκίουροι της Καλιφόρνιας (*Spermophilus beecheyi*) είναι ο κύριος ξενιστής της *B. washoensis* η οποία προσδιορίστηκε σε περίπτωση μυοκαρδίτιδας σε άνθρωπο (Chomel *et al.* 2003a) και σε μια περίπτωση ενδοκαρδίτιδας σε σκυλί (Engbaek and Lawson 2004). Τέλος, αναφέρθηκε η απομόνωση της *B.henselae* type Houston I από τρία ποντίκια του αγρού (*Sylvaticus apodemus*) (Iralu *et al.* 2006) όπου και τείθεται το ερώτημα της πιθανότητας της μόλυνσης *in vivo* με *B.henselae* σε άγρια τρωκτικά. . Πολλά νέα είδη Μπαρτονέλλας έχουν απομονωθεί στη Νοτιοανατολική Ασία (Birtles

et al. 1994; Kosoy *et al.* 1997) και μερικά από αυτά θα μπορούσαν να είναι πηγή μόλυνσης σε ανθρώπους.

Πρόσφατες έρευνες σε πληθυσμούς τρωκτικών σε περιοχές της Ευρώπης, Αφρικής και νότιας Αμερικής, αποκάλυψαν ένα αριθμό νέων ειδών ή αταξινόμητων ποικιλιών μπαρτονέλλας. Κάποιες προσπάθειες που έγιναν για να δημιουργηθούν απλοί κανόνες οι οποίοι θα ίσχυαν για όλα τα απομονωμένα στελέχη και τα μολυσμένα τρωκτικά, γρήγορα απέτυχαν (Tyzzer 1941). Τα δεδομένα που συσσωρεύτηκαν από τις μοριακές αναλύσεις των απομονωθέντων στελεχών αναίρεσαν υποθέσεις για απλή και αυστηρή εξειδίκευση-προτίμηση μεταξύ ξενιστή και βακτήριο οι οποίες είχαν διατυπωθεί με βάση το γένος *Grahamella* (Birtles *et al.* 1994). Βασιζόμενοι στην παρατήρηση ότι ένα μοναδικό είδος μπαρτονέλλας απομονώθηκε από διάφορα είδη τρωκτικών ο Birtles και η ομάδα του διετύπωσαν την υπόθεση ότι αν υπάρχει προτίμηση-εξειδίκευση, αυτή είναι πιθανότατα μεταξύ μεταβιβαστή και βακτηρίου, παρά ξενιστή και βακτηρίου (Kosoy *et al.* 1997). Παρ΄όλ' αυτά υπάρχουν ενστάσεις και για την παραπάνω υπόθεση, αφού μελέτες έχουν δείξει ότι ένα μοναδικό είδος ψύλλων μπορεί να μεταφέρει δύο διαφορετικά είδη μπαρτονέλλας, γεγονός που υποδηλώνει μικρή σχέση εξειδίκευσης μεταξύ μεταβιβαστή και βακτηρίου. Αν και η υπόθεση «ένα είδος τρωκτικού – ένα είδος βακτηρίου» δεν μπορούσε να υποστηριχθεί, αναμφίβολα, παρατηρήθηκε μια τέτοια σχέση σε μια μεγάλη έρευνα που έγινε σε εκατοντάδες τρωκτικά και το ανάλογο είδος μπαρτονέλλας (Schouls *et al.* 1999; La Scola *et al.* 2002b; Parola *et al.* 2003; Rolain *et al.* 2003b; Stevenson *et al.* 2003).

1.2.4.4. Αρθρόποδα-Μεταβιβαστές

Τα βακτήρια του γένους *Bartonella* μεταδίδονται από αιμομυζητικά αρθρόποδα [Πίνακας 4] (ψείρα, ψύλλοι, κρότωνες). Το DNA του βακτηρίου (*Bartonella* spp) έχει εντοπιστεί σε ψύλλους και και κρότωνες που παρασιτούν άγρια και οικόσιτα ζώα (Alexander 1995). Μόνο για λίγα είδη έχουν προσδιοριστεί οι μεταβιβαστές: π.χ. η φλεβοτόμος (σκνίπα) *Lutzomyia verrucarum* για την *B.bacilliformis* (Maurin and Raoult 1996), η ανθρώπινη ψείρα *Pediculus humanus* για

την *B.quintana* (Chomel *et al.* 1996) και ο ψύλλος της γάτας *Ctenocephalides felis* για την *B.henselae* (Lucey *et al.* 1992; Pappalardo *et al.* 1997; Chang *et al.* 2001). Υπάρχουν πρόσφατα δημοσιεύσεις για το ρόλο των κροτώνων σαν μεταβιβαστών τουλάχιστον για μερικά από τα στελέχη της μπαρτονέλλας (Rolain *et al.* 2005; Brouqui and Raoult 2006; Marie *et al.* 2006).

Bartonella spp. είχαν ανιχνευθεί στους ψύλλους πολλών θηλαστικών (Kerkhoff *et al.* 1999; Serratrice *et al.* 2003). Το νύγμα του ψύλλου δημιουργεί έντονη φλεγμονώδη αντίδραση που αναγκάζει το θύμα να ξύσει το σημείο του νύγματος και είναι επίσης γνωστό ότι οι ψύλλοι έχουν τη συνήθεια να αφοδεύουν κατά τη διάρκεια της αιμομύζησης και είναι πιθανόν τα δύο αυτά γεγονότα να συντελούν στον ενοφθαλμισμό της *B.henselae* μέσω της πληγής που έχει δημιουργηθεί από το νύγμα.

Πίνακας 4 . Bartonella species που έχουν βρεθεί σε ψύλλους

Είδος ψύλλου	**Είδος *Bartonella***	**Χώρα/ζώο-ξενιστής**	**Αναφορά**
Ctenocephalides felis	B. clarridgeiae	France/cat Thailand/cat New Zealand/cat	Rolain J,2003;Gurfield A,2001 Parola P, 2003 Kelly PJ, 2004
	B. koehlerae	France/cat	Rolain JM,2003
	B.quintana	France/cat	Rolain JM,2003
Ctenophthalmus nobilis	B. grahamii	United Kingdom/ bank vole	Bown KJ, 2004
	B. taylorii	United Kingdom/ bank vole	Bown KJ, 2004
Nosopsyllus fasciatus	*Bartonella* spp.	Thailand/rodent	Parola P, 2003
Oropsylla hirsuta	*Bartonella* spp.	United States/ τρωκτικό γένους cynomys	Stevenson HL, 2003
0. tuberculatus cynomuris	*Bartonella* spp.	United States/ τρωκτικό γένους cynomys	Stevenson HL, 2003
Pulex spp.	*Bartonella* spp.	Peru/human	Parola P, 2002
Pulex irritans	*B.quintana*	sub-Saharan Africa, Gabon /monkey	Rolain J M, 2005

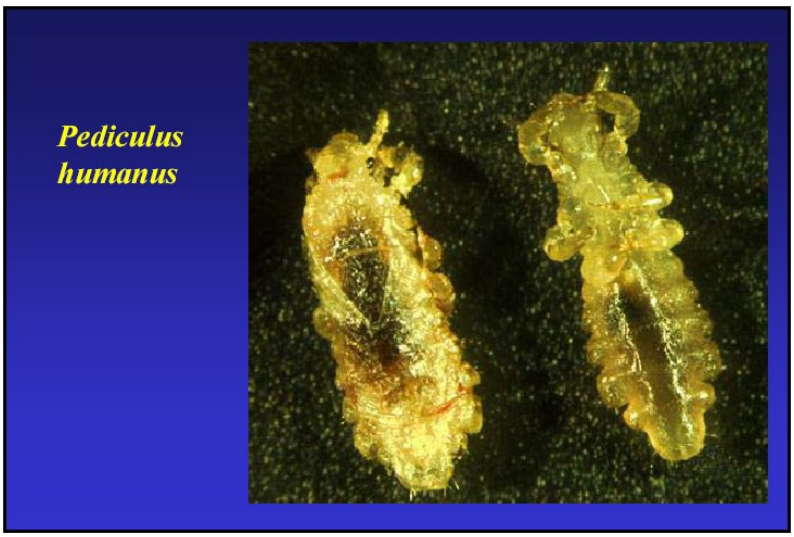
Με ανάλογο τρόπο γίνεται και η μετάδοση της *B.quintana* μέσω της ψείρας. Η παραδοχή μέχρι πρόσφατα ήταν ότι η *B.quintana* πολλαπλασιάζεται στην εντερική

κοιλότητα του εντέρου της ψείρας και η μετάδοση γίνεται από μολυσμένα περιττώματα/ συνθλιμμένους ιστούς της ψείρας. από άνθρωπο σε άνθρωπο. Πρόσφατα η παραπάνω παραδοχή αναιρέθηκε, αφού η *B.quintana*, έχει ανιχνευτεί και τυποποιηθεί με μεθόδους μοριακής βιολογίας σε γάτες, καθώς και σε ψύλλους,. Σε πρόσφατες μελέτες η *B.quintana* ανιχνεύτηκε σε ψύλλους (Fournier *et al.* 2001b), αναιρώντας έτσι τη συσχέτιση αυτού του είδους μόνο με την ψείρα. Μεταβιβαστές της B.vinsonii είναι ακάρεα και κρότωνες.

Σε ένα πειραματικό μοντέλο μόλυνσης χρησιμοποιήθηκε η *B. quintana* με τον φυσικό ξενιστή της την ψείρα ανθρώπων (*Pediculus humanus corporis*) [Εικόνα 16], για να αποδειχθεί ότι οι μπαρτονέλλες διατηρούν μια ισόβια εξωκυτταρική μόλυνση στο μεσαίο έντερο της ψείρας (Fournier *et al.* 2001b). Η μόλυνση δεν προκάλεσε οποιαδήποτε συμπτώματα στις ψείρες, με το ποσοστό επιβίωσης μολυσμένων ψειρών να είναι το ίδιο με αυτό των μη μολυσμένων. Επιπλέον, δεν μπόρεσαν να ανιχνευθούν μπαρτονέλλες στα αυγά είτε στις προνύμφες που παρήχθησαν από τις μολυσμένες ψείρες, υποδεικνύοντας δεν εμφανίστηκε κάθετη μετάδοση. Ωστόσο, βρέθηκαν ζωντανές μπαρτονέλλες σε περιττωματικά υλικά των μολυσμένων ψειρών (Higgins *et al.* 1996).

Μελέτες σε ψύλλους γατών (*Ctenocephalides felis*) μολυσμένους με *B.henselae* έχουν αποκαλύψει παρόμοια συμπεράσματα (Krampitz 1962). Δεδομένου ότι τα βακτήρια περιορίζονται στο μεσαίο έντερο, η μετάδοση της μπαρτονέλλας από τα αρθρόποδα στα θηλαστικά δεν είναι μια άμεση διαδικασία, αλλά μάλλον μεσολαβεί μολυσμένο περιττωματικό υλικό. Μια τέτοια στρατηγική φαίνεται κάπως ανεπαρκής εντούτοις, λαμβάνοντας υπόψη ότι τα αρθρόποδα- μεταβιβαστές που χρησιμοποιούνται από τις μπαρτονέλλες έχουν μια στενή σχέση με τους ξενιστές τους , οι εξαιρετικά συχνές επαφές μεταξύ τους παρέχουν άφθονες ευκαιρίες για την απόθεση των μολυσμένων περιττωμάτων επάνω στο δέρμα των ξενιστών. Επιπλέον, δαγκώματα αρθρόποδων γενικά προκαλούν ερεθισμό του δέρματος, που προκαλεί το γρατσούνισμα που μπορεί να οδηγήσει στην εισαγωγή του μολυσμένου περιττωματικού υλικού στο σώμα του ξενιστή.

Για τις μπαρτονέλλες που έχουν σαν φυσικό ξενιστή τα τρωκτικά, έχουν αναφερθεί δυο μεταβιβαστές. Ο ψύλλος των τρωκτικών *Xenopsylla cheopis* έχει αποδειχθεί ότι είναι μεταβιβαστής ενός μη καθορισμένου, ακόμα, είδους



Εικόνα 16. Ο φυσικός ξενιστής της *B. quintana Pediculus humanus corporis*

μπαρτονέλλας που προσβάλλει τους αγροδίαιτους αρουραίους *Clethrionomys glareolus* (Baker 1946). Επίσης, τα ακάρεα του αρουραίου *Trombicula microti* θεωρούνται μεταβιβαστές της *B.vinsonii* (Smit 1957). Η κάθετη μεταφορά του βακτηρίου έχει προταθεί ως πιθανός μηχανισμός μετάδοσης εξαιτίας του οποίου διατηρείται η μόλυνση στον πληθυσμό (Boulouis *et al.* 2001). Ερευνητικά δεδομένα έδειξαν την διαπλακουντική μεταφορά του βακτηρίου σε BALB/c ποντίκια μολυσμένα με *B. birtlesii* (Chomel *et al.* 1996; Higgins *et al.* 1996; Foil *et al.* 1998). Έχει βρεθεί ότι 61% των ψύλλων των αρουραίων είναι μολυσμένοι με στελέχη μπαρτονέλλας συμπεριλαμβάνοντας την *B. Elizabethae.* Στην Ασία η *B. elizabethae* έχει εντοπιστεί σε ψύλλους από τρωκτικά (Bown *et al.* 2004).

Οι ψύλλοι έχουν ενοχοποιηθεί για την μετάδοση της *B.henselae* στις γάτες (Parola *et al.* 2003; Stevenson *et al.* 2003). Επίσης, το βακτήριο της *B.henselae* έχει εντοπιστεί και σε ψύλλους τρωκτικών (Bown *et al.* 2004). Ο ψύλλος τρωκτικών *Ctenophthalmus nobilis* αποδείχθηκε ότι είναι ικανός μεταβιβαστής για τουλάχιστον δύο είδη Μπαρτονέλλας, τη *B. grahamii*, η οποία έχει συνδεθεί με οφθαλμικές λοιμώξεις στον άνθρωπο (νευρορετινίτιδα και αμφιβληστροειδίτιδα) (Iralu *et al.* 2006), και τη *B. taylorii* (Ying *et al.* 2002; Castle *et al.* 2004). Σε μελέτες στο Αφγανιστάν, στην Αίγυπτο (Chomel *et al.* 1996; Higgins *et al.* 1996; Foil *et al.* 1998) την Πορτογαλία έχουν (Kelly *et al.* 2004) έχουν ανιχνευτεί *Bartonella* sp σε ψύλλους

τρωκτικών (B.elizabethae, B.taylori). Στο Αφγανιστάν 40.5% των ψύλλων των τρωκτικών ήταν θετικοί για *Bartonella* sp και σε ψύλλους τρωκτικών έχουν βρεθεί τα είδη *B.quintana*, *B. koehlerae*, and *B. taylorii* (Engbaek and Lawson 2004) (Rolain *et al.* 2003b). Τέλος, αναφέρεται η απομόνωση της *B.henselae* type Houston I από ποντίκια του αγρού (*Sylvaticus apodemus*) (Gurfield *et al.* 2001; Parola *et al.* 2003; Rolain *et al.* 2003b; Kelly *et al.* 2004)

Ο ψύλλος της γάτας *Ctenocephalides felis* είναι ένα εκτοπαράσιτο οικόσιτων και άγριων ζώων, ο οποίος επίσης παρασιτεί και τρέφεται από τον άνθρωπο. Ένας μεγάλος αριθμός μελετών – οι περισσότερεςτην τελευταία 5ετία- εμπλέκουν το είδος αυτό σαν μεταβιβαστή νέων και αναδυόμενων λοιμωδών νόσων (Rolain *et al.* 2003b). Θεωρείται ότι παίζει ένα σημαντικό ρόλο στην cat-to-cat μετάδοση των *B.henselae*, B. clarridgeiae, and B. koehlerae (Bauer *et al.* 2006). Στη Νέα Ζηλανδία, ποσοστά 11%, και 7% των *Ctenocephalides felis* που απομονώθηκαν από γάτες, βρέθηκαν μολυσμένοι με *B.henselae* και *B. clarridgeiae* αντίστοιχα. (Blanco *et al.* 2006), ενώ στη Γαλλία από το ίδιο είδος ψύλλου (Ctenocephalides felis από γάτες) τα αντίστοιχα ποσοστά μόλυνσης ήταν 11,1% , και 67,9% για τη *B.henselae* και *B. clarridgeiae* (Gurfield *et al.* 2001; Rolain *et al.* 2003b) Στο Ισραήλ 7.6% των ψύλλων του είδους Ctenocephalides felis από γάτες ηταν θετικοί (Parola *et al.* 2003), ενώ στην Ισπανία σε ανάλογη μελέτη σε ψύλλους του είδους Ctenocephalides felis and Ctenocephalides canis που παρασιτούσαν σε γάτες τα ποσοστά μόλυνσης από *B. clarridgeiae* και *B.henselae* ήταν 6,8% και *3,4%* αντίστοιχα (Kelly *et al.* 2004).

1.2.5. ΓΕΩΓΡΑΦΙΚΗ ΚΑΤΑΝΟΜΗ

Οροεπιδημιολογικές και βακτηριολογικές μελέτες έχουν καταδείξει την παγκόσμια κατανομή της μόλυνσης με *B. henselae* στις κατοικίδιες γάτες. Ένα μεγάλο ποσοστό γατών σε πολλά μέρη του κόσμου, ιδιαίτερα στις περιοχές με θερμό και υγρό κλίμα, είναι ορολογικά θετικό για *B.henselae*. Ο επιπολασμός της βακτηριαιμίας με αιτιολογικό παράγοντα την *B.henselae* στις γάτες ποικίλει από 4% έως και 89% σε διάφορες έρευνες ανά τον κόσμο ενώ ο επιπολασμός αντισωμάτων για τη *B. henselae* ποικίλλει από 5% εώς 80% ανάλογα με τη γεωγραφική θέση και την κατάσταση της γάτας (κατοικίδιο ζώο ή αδέσποτο) (Bergmans *et al.* 1996; Drancourt *et al.* 1996; La Scola *et al.* 2002a).

Δύο γονότυποι/ορότυποι της *B. henselae* έχουν περιγραφτεί (Iredell *et al.* 2003). Έχουν αναφερθεί σημαντικές τοπικές γενετικές παραλλαγές στον αντίστοιχο επιπολασμό της *B.henselae* type I (Houston) και type II (Marseille) σε κατοικίδιες γάτες (πίνακες I–VI). Προς το παρόν ο γενότυπος Berlin-2 της *B.henselae* έχει περιοριστεί στην Ευρώπη ενώ οι άλλοι 2 γενότυποι μπορούν να απαντηθούν σε όλο τον κόσμο (Bergmans *et al.* 1997; Gurfield *et al.* 1997). Έχει επίσης αναφερθεί συ-λοίμωξη στις γάτες με αυτούς τους δύο γονοτύπους (Chomel *et al.* 1995; Bergmans *et al.* 1997; Heller *et al.* 1997; Sander and Frank 1997).

Η *Bartonella clarridgeiae* διανέμεται άνισα στους πληθυσμούς γατών ανά τον κόσμο, με επιπολασμό της τάξεως του 30% εώς 36% όλων των στελεχών Μπαρτονέλας σε κάποιες μελέτες (Γαλλία, Κάτω Χώρες ή Φιλλιπίνες) σε λιγότερο από 10% στις νοτιοανατολικές ΗΠΑ και Ιαπωνία ή Ταϊβάν μέχρι και την παντελή έλλειψη απομόνωσης κάποιου στελέχους σε διάφορες μελέτες στην Ευρώπη, Αυστραλία και Βόρεια Αμερική (Droz *et al.* 1999; Rolain *et al.* 2003a; Avidor *et al.* 2004). Στελέχη *Bartonella koehlerae* έχουν απομονωθεί μόνο από δύο γάτες στην Καλιφόρνια, μια γάτα στη Γαλλία και σε γάτα στο Ισραήλ (Chomel *et al.* 2004b). Επιπλέον, μπαρτονέλωση έχει αναφερθεί σε άγρια αιλουροειδή στο νέο κόσμο (Roux *et al.* 2000).

Στοιχεία των ερευνών σχετικά με τις γάτες συνοψίζονται στους πίνακες I, II, III για την Ευρώπη, πίνακας IV για την Ασία και την Ωκεανία, πίνακας V για την Αμερική και πίνακας VI για Αφρική και Μέση Ανατολή (βλ.παράρτημα).

Έρευνες σε πληθυσμό οικόσιτων και αδέσποτων γατιών έδειξαν ότι υπάρχουν διαφορές στον επιπολασμό του βακτηρίου, οι οποίες φαίνεται να εξαρτώνται από τις κλιματολογικές συνθήκες (Koehler and Tappero 1993; Koehler *et al.* 1997).

1.2.6. ΜΠΑΡΤΟΝΕΛΛΩΣΕΙΣ

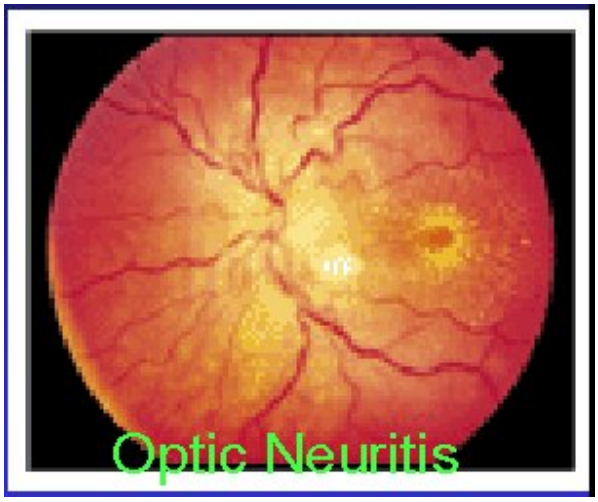
1.2.6.1. Μπαρτονελλώσεις στον άνθρωπο

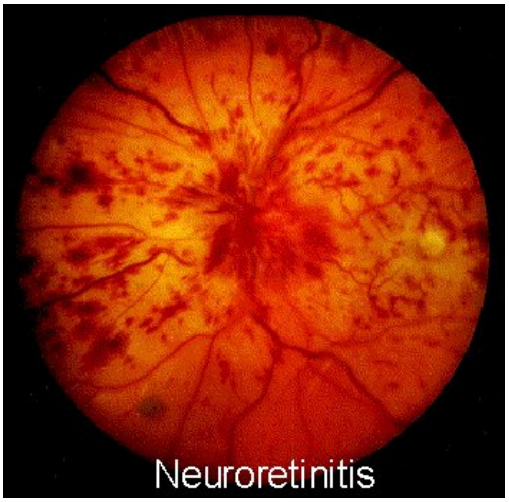
Μέχρι το 1993 μόνο 3 ασθένειες ήταν γνωστό ότι προκαλούνται από μπαρτονέλλα: η ασθένεια του Carrion, ο πυρετός των χαρακωμάτων και η νόσος εξ ονύχων γαλής (CSD)

Σήμερα έχει περιγραφεί ένα ευρύ φάσμα κλινικών εκδηλώσεων και νόσων [Πίνακας 5]. Εκτός από ένα ευρύ φάσμα νευρολογικών συμπτωμάτων, αρκετές είναι οι οφθαλμικές βλάβες που έχουν συνδεθεί επίσης με μόλυνση από μπαρτονέλλες, όπως επιπεφυκίτιδα, χοριοαμφιβληστροειδίτιδα, ραγοειδίτιδα, οπτική νευρίτιδα, θηλίτιδα, κοκκίωμα του επιπεφυκότα, αμφιβληστροειδική και οπτική νευρική νεοαγγειογένεση [Εικόνα 17]. Η χοριαμφιβληστροειδίτιδα εκδηλώνεται με οξεία ελάτττωση της όρασης μετά από οίδημα του οπτικού νεύρου και κηλιδώδη εξιδρώματα στο βυθό [Εικόνα 18]. Αξίζει να αναφερθεί οτι οι περισότερες από αυτές τις παρατηρήσεις έχουν βασιστεί στην παρουσία αντισωμάτων για Μπαρτονέλα και όχι στην απομόνωση του βακτηρίου ή σε θετικό PCR.

Έχουν αναφερθεί επίσης περιπτώσεις οστεομυελίτιδας (Carithers 1985; Smoller *et al.* 2001). κοκκιωματώδης ηπατίτιδα και νεκρωτική σπληνίτιδα, ρευματικές εκδηλώσεις (αρθραλγία, αρθρίτιδα) σε παιδιά και ενήλικες καθώς επίσης και οζώδες ερύθημα (Carithers 1985; Koehler and Tappero 1993; Hashkes *et al.* 1996; Hayem *et al.* 1996; Jacobs and Schutze 1998; Al-Matar *et al.* 2002; Dharnidharka *et al.* 2002)

Σε άτομα με ανοσοκαταστολή, η βακτηριακή αγγειομάτωση (ΒΑ) είναι μια απο τις πιό κοινές κλινικές εκδηλώσεις μόλυνσης με Μπαρτονέλλα [Εικόνα 19] (Caniza *et al.* 1995). Σε ασθενείς με μοσχεύματα, διάφορες κλινικές εκδηλώσεις ή παθολογικές βλάβες έχουν αναφερθεί, όπως πνευμονικά οζίδια (Bruckert *et al.* 1997) ή στερνικά αποστήματα (Humar and Salit 1999), οξεία απόρριψη οργάνου (Ahsan *et al.* 1998), βακτηριακή πελίωση (Juskevicius and Vnencak-Jones 2004) και, ξανά, βακτηριακή αγγειωμάτωση (Fournier *et al.* 2001a).





Εικόνα 17. Οπτική νευρίτιδα -οφθαλμική βλάβη από μπαρτονέλλες

Εικόνα 18. Χοριαμφιβληστροειδίτιδα - οφθαλμική βλάβη από μπαρτονέλλες

Εικόνα 19. Βακτηριακή αγγειομάτωση (ΒΑ),απο τις πιό κοινές κλινικές εκδηλώσεις μόλυνσης με Μπαρτονέλλα

1.2.6.1.1. Νόσος του Carrion

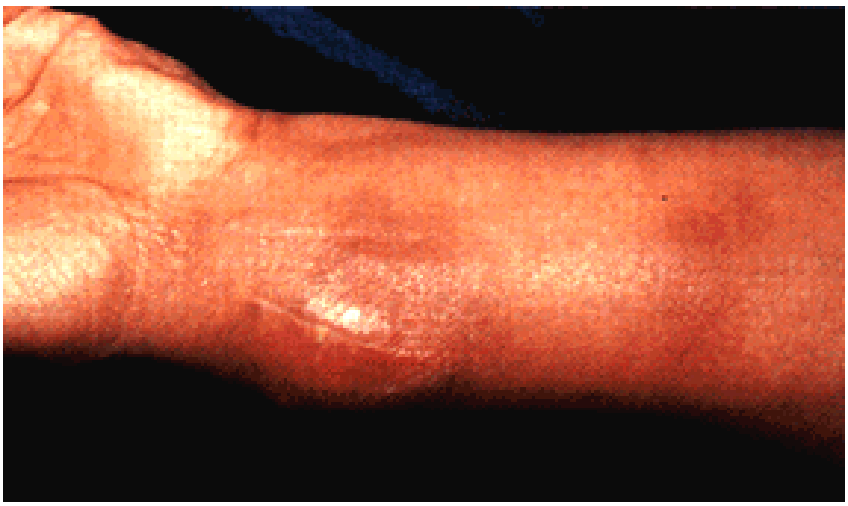
Η *B.bacilliformis* προκαλεί τη *νόσο του Carrion*. Το *οξύ στάδιο* της νόσου εκδηλώνεται με πυρετό (Foucault *et al.* 2006) και έντονη αιμολυτική αναιμία. Η χρόνια μορφή της νόσου, γνωστή σαν *verruga peruana* εκδηλώνεται 2 περίπου μήνες μετά την οξεία φάση (καλοήθεις δερματικοί όγκοι, αγγειακές υπερπλασίες) [Πίνακας 5]. Μεταβιβαστής η σκνίπα *Lutzomyia verrucarum*. Ενδημεί στην οροσειρά των Άνδεων όπου και ο βιότοπος της σκνίπας . Η νόσος εισβάλλει ύπουλα μετά από αφανή προσβολή υποκλινικής αναιμίας που εξελλίσεται με ανάπτυξη αγγειωματωδών όζων στο δέρμα και στους βλενογόννους. Οι όζοι αυτοί εξελκούνται και αιμορραγούν.

1.2.6.1.2. Πυρετός των χαρακωμάτων

Η *Bartonella* quintana, είναι ένα παθογόνο που έχει σαν μοναδικό ξενιστή τον άνθρωπο, και σαν μεταβιβαστή την ψείρα του ανθρώπινου σώματος (*Pediculus humanus*). Κατ΄αρχήν αναγνωρίστηκε και χαρακτηρίστηκε σαν ο αιτιολογικός παράγοντας του πυρετού των χαρακωμάτων (trench fever). Η νόσος χαρακτηρίζεται από υποτροπιάζοντα πενθήμερο πυρετό (ονομάσθηκε και πυρετός των 5 ημερών), με έντονους και επιμένοντες οστικούς πόνους, εξάνθημα και παρατεταμένη κακουχία. Οι λοιμώξεις που προκαλεί σήμερα ονομάζονται "σύγχρονες λοιμώξεις από *B.quintana*" σε αντιδιαστολή με τον "πυρετό των χαρακωμάτων". Η *B.quintana* σήμερα θεωρείται ένα αναδυόμενο παθογόνο και είναι υπεύθυνο για ένα ευρύ φάσμα από κλινικές εκφράσεις όπως χρόνια βακτηριαιμία, ενδοκαρδίτιδα, και βακτηριακή αγγειωμάτωση [Πίνακας 5]. Έχει επίσης συσχετιστεί με χρόνια λεμφαδενοπάθεια. (Regnery *et al.* 1992a). Σε ασθενείς με AIDS, προκαλεί, μαζί με την *B.henselae*, τη βακτηριακή αγγειωμάτωση [Εικόνα 19].

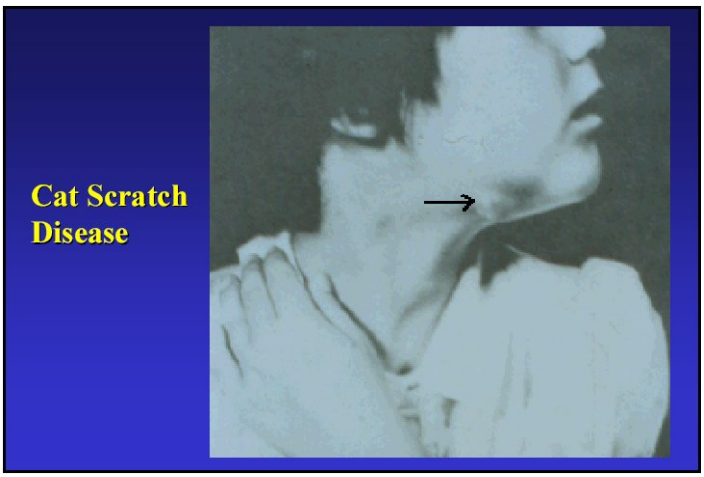
1.2.6.1.3. Νόσος εξ' ονύχων γαλής (ΝΕΟΓ)-Cat scratch disease (CSD)

Στους ανθρώπους η *B.henselae* αποτελεί τον αιτιολογικό παράγοντα της νόσου εξ'ονύχων γάλης (CSD) (Debre *et al.* 1950; Regnery *et al.* 1992b; Kordick *et al.* 1995; Lawson and Collins 1996; Kordick *et al.* 1997a; Chomel 2000) η οποία έχει ως αποτέλεσμα την δημιουργία φλεγμονής στους λεμφαδένες της περιοχής μόλυνσης (Koehler *et al.* 1997). Η νόσος παρουσιάζει έξαρση το φθινόπωρο και νωρίς τον χειμώνα, απαντάται σε όλες τις ηλικίες αλλά παρουσιάζει αυξημένη συχνότητα σε παιδιά και άτομα νεαρής ηλικίας (Debre *et al.* 1950; Carithers 1985; Chomel 2000; McGill *et al.* 2003). Σε ποσοστό 80% αφορά άτομα ηλικίας < 21 ετών, και είναι αρκετά συχνή κυρίως σε παιδιατρικές κλινικές.



Εικόνα 20. Οίδημα της περιοχής μόλυνσης μετά απο γρατζουνιά

.



Εικόνα 21. Πρήξιμο της περιοχής μόλυνσης μετά απο γρατζουνιά

Η CSD χαρακτηρίζεται κυρίως από καλοήθη περιφερειακή λεμφαδενοπάθεια (Carithers 1985), της οποίας προηγείται ερυθηματώδης βλατίδα, 7 με 12 μερών και χαμηλός πυρετός μετά από γρατζουνιά γάτας (στο 90% των περιπτώσεων) [Εικόνα 20 και 21]. Κακουχία**,** αδιαθεσία, δυσφορία, εξάντληση και πόνος έχουν επίσης συχνά αναφερθεί. Σε μερικές περιπτώσεις μπορούν να εμφανιστεί πονοκέφαλος, ανορεξία και σπληνομεγαλία.

Η περιφερειακή λεμφαδενοπάθεια εμφανίζεται σε μια έως τρείς εβδομάδες μετά από τον ενοφθαλμισμό και μπορεί να εμμείνει από λίγες εβδομάδες εώς και αρκετούς μήνες (Carithers 1985; Margileth 1993; Jacomo *et al.* 2002). Συχνότατα δεν ανευρίσκεται πρωτοπαθής δερματική αλλοίωση. Φλεγμονή στους λεμφαδένες αναφέρεται περιστασιακά σε 12% (Debre and Job 1954) μέχρι 48% των περιπτώσεων (Margileth 1993). Χρόνια λεμφαδενίτιδα διάρκειας 4-6 εβδομάδες, που μπορεί να επιμένει για πάνω από 12 μήνες έχει επίσης καταγραφεί.

Ποσοστά από 5% εώς 9% των περιπτώσεων της CSD μπορούν να αναπτύξουν άτυπες εκδηλώσεις (άτυπη CSD). *Π*ερίπου 10% των ασθενών παρουσιάζεται με το οφθαλμο-αδενικό *σύνδρομο Parinaud* (επιπεφυκίτις με διόγκωση των λεμφαδένων στην παρωτιδική περιοχή). Άτυπες εκδηλώσεις συμπεριλαμβάνουν εγκεφαλίτιδα, ενδοκαρδίτιδα, αιμολυτικής αναιμία, ηπατομεγαλία και σπληνομεγαλία, σπειραματονεφρίτιδα, πνευμονία, υποτροπιάζουσας βακτηραιμία, και οστεομυελίτιδας (Noah *et al.* 1995). Η εγκεφαλοπάθεια (CSDE) σαν επιπλοκή της CSD, συνδέεται ενδεχομένως με ανοσολογική αντίδραση στη λοίμωξη με *B. henselae* και είναι μια από τις πιό σοβαρές επιπλοκές της νόσου (Gerber *et al.* 2002). Ασθενείς με CSDE αναρώνουν συνήθως μέσα σε ένα έτος χωρίς οποιαδήποτε δευτερογενή συμπτώματα. Εντούτοις, έχει αναφερθεί μια θανατηφόρα περίπτωση μηνιγγίτιδας και εγκεφαλίτιδας σε παιδί ηλικίας τεσσάρων ετών (Jacobs and Schutze 1998; Tsukahara *et al.* 2000; Tsujino *et al.* 2004)

Η *B.henselae* αποτελεί, με την *B.quintana*, το αίτιο της βακτηριακής αγγειωμάτωσης (αγγειακή υπερπλασία με εμπλοκή διαφόρων οργάνων, όπως το δέρμα, οστά και εγκέφαλος) [Πίνακας 5] (Drancourt *et al.* 1998; La Scola and Raoult 1999).

Πίνακας 5 . Κλινική εμφάνιση των λοιμώξεων από *Bartonella* spp στον άνθρωπο

***Bartonella* species**	**Νόσος -συμπτώματα**
B.bacilliformis	Carrion's disease (Πυρετός Oroya ή verruga peruana)
B. clarridgeiae	Cat-scratch disease
B. elizabethae	Ενδοκαρδίτιδα, νευροαμφιβληστροειδίτιδα
B.henselae	Cat scratch disease (CSD) - Νόσος εξ' ονύχων γαλής (ΝΕΟΓ), Βακτηριακή αγγειωμάτωση, ηπατική πελίωση, κοκκιωματώδης ηπατίτιδα, μυοκαρδίτιδα, ενδοκαρδίτιδα, βακτηριαιμία, οφθαλμικές λοιμώξεις, (χοριοαμφιβληστροειδίτις, κλπ) παρατεταμένο εμπύρετο, οστεομυελίτις, αρθρίτις, αρθραλγία, εγκεφαλοπάθεια pseudotumoral lesions, nodules, erythema, cutaneous petechiae, uveitis, θρομβοκυτταροπενική πορφύρα, glomerulonephritis, perionyxis, periodontitis μυελίτιδα , ριζίτιδα και εγκεφαλική αταξία. σπληνίτιδα ,
B. grahamii	Οφθαλμικές λοιμώξεις Νευροαμφιβληστροειδίτιδα, bilateral retinal artery branch occlusions
B. koehlerae	ενδοκαρδίτιδα
B. vinsonii subsp. arupensis	Πυρετός, Βακτηριαιμία ,ενδοκαρδίτιδα Αρθραλγία, νευρολογικές επιπλοκές
***B. vinsonii* subsp berkhoffii**	ενδοκαρδίτιδα
B. washoensis	Πυρετός, Μυοκαρδίτιδα
B.quintana	πυρετός των χαρακωμάτων (trench fever), βακτηριαιμία, ενδοκαρδίτιδα, περικαρδίτιδα, βακτηριακή αγγειωμάτωση,

1.2.6.1.4. Ενδοκαρδίτιδα

Τέσσερα είδη *Bartonella*:η *B.quintana* , η B. henselae ,η B.elizabethae και η B. vinsonii προκαλούν ενδοκαρδίτιδα. Περισσότερες του 90% των περιπτώσεων αφορούν τις δύο πρώτες και είναι συχνότερες σε άρρενες ενήλικες και σπάνια σε παιδιά. Αποτελούν το 3% του συνόλου των ενδοκαρδίτιδων. Η ενδοκαρδίτιδα από μπαρτονέλες συνήθως είναι ανώδυνη, βραδείας εξέλιξης και αρνητική σε καλλιέργιες, έτσι, η διάγνωση καθυστερεί συχνά, με συνέπεια τη θνησιμότητα με ποσοστό υψηλότερο από αυτό των άλλων μορφών ενδοκαρδίτιδας (Spach *et al.* 1993). Η κλινική εικόνα είναι μη ειδική και εκδηλώνεται με πυρετό ,κακουχία , αδυναμία, απώλεια βάρους.

Οι Μπαρτονέλες περιγράφτηκαν αρχικά ως αιτία ενδοκαρδίτιδας σε ανθρώπους σε τρείς αναφορές το 1993, μία προκαλούμενη από *B. quintana* σε ανοσοκατασταλμένο άτομο (Daly *et al.* 1993), μία προκαλούμενη από *B. elizabethae* σε ανοσοϊκανό ασθενή (Hadfield *et al.* 1993) και μία προκαλούμενη από *B.* (*Rochalimaea*) *henselae* (Raoult *et al.* 1996; Fournier *et al.* 2001a; Raoult *et al.* 2003). Είδη Μπαρτονελλών, κυρίως *B. quintana* και *B. henselae*, είναι υπεύθυνες για περίπου 3% των περιπτώσεων ενδοκαρδίτιδας σε ανθρώπους, με περισσότερες από 100 περιπτώσεις αναφερθείσες στη διεθνή βιβλιογραφία από το 1993 (Raoult *et al.* 1996). Κυρίως προσβάλλεται η αορτική βαλβίδα, και σπανιότερα η αορτική μαζί με την τριγλώχινα ή η αορτική μαζί με την μιτροειδή. Έχει αναφερθεί και η προσβολή μόνο της τριγλώχινος. Στο 90% των περιπτωσεων συνυπάρχει βαλβιδική νόσος. Στις περισσότερες περιπτώσεις ενδοκαρδίτιδας σε ανθρώπους από Μπαρτονέλλα, οι βλάβες βρίσκονται συνήθως στην αορτική βαλβίδα (Fournier *et al.* 2002) και οι περισσότεροι ασθενείς έχουν υψηλούς τίτλους αντισωμάτων (Fournier *et al.* 2001a). Επιπλέον, οι περισσότερες περιπτώσεις ενδοκαρδίτιδας από *B. henselae* παράγουν στείρες καλλιέργιες αλλά θετικά PCR αποτελέσματα (Chomel *et al.* 1995; Chomel 2000).

1.2.6.2. Μπαρτονελλώσεις στις γάτες

Οι γάτες συνήθως είναι ασυμπτωματικοί φορείς της *B. henselae*. (Ueno *et al.* 1996). Με βάση ορολογικές μελέτες, οι φυσικά μολυσμένες γάτες είναι πιθανότερο να έχουν λεμφαδενίτιδα και ουλίτιδα, ειδικά ζώα τα οποία είναι ταυτόχρονα μολυσμένα με τον ιό της ανοσολογικής ανεπάρκειας των αιλουροειδών (Glaus *et al.* 1997). Η οροθετικότητα για *B.henselae* έχει συσχετιστεί με την παρουσία στοματίτιδας ή νόσου του ουροποιητικού (Lappin *et al.* 2000). Η *B.henselae* έχει επίσης εμπλακεί ως πιθανή αιτία πρόσθιας ραγοειδίτιδας στις γάτες (Chomel *et al.* 2003b). Μια επιβεβαιωμένη με PCR περίπτωση ενδοκαρδίτιδας από *B.henselae* αναφέρθηκε σε γάτα στην Καλιφόρνια (Guptill *et al.* 1997; Kordick *et al.* 1999; O'Reilly *et al.* 1999). Υπό πειραματικές συνθήκες οι μολυσμένες με *B.henselae* γάτες έχουν εμφανίσει διάφορα κλινικά συμπτώματα (Guptill 2003). Το συνηθέστερο σύπτωμα είναι ο πυρετός, ο οποίος συνήθως δεν διαρκεί για περισσότερο από μια εβδομάδα (Guptill 2003). Τοπική φλεγμονή (ερύθημα, οίδημα) επί του τόπου του ενοφθαλμισμού και τοπική ή γενικευμένη λυμφαδενοπάθεια έχει επίσης παρατηρηθεί. Άλλα συμπτώματα συμπεριλαμβάνουν λήθαργο και ανορεξία. Μερικές γάτες έχουν επίσης παρουσιάσει ήπια νευρολογικά συμπτώματα, όπως νυσταγμό, τρόμο, εστιακές μυοκλωνίες, και αλλαγές συμπεριφοράς (Guptill *et al.* 1998) [Πίνακας 6]. Αναπαραγωγικές διαταραχές (θνησιγένεια, στειρότητα ή εγκυμοσύνη μόνο μετά από επαναλαμβανόμενες πράξεις αναπαραγωγής) έχει αναφερθεί σε πειραματικά μολυσμένες γάτες (O'Reilly *et al.* 1999). Οι διαφορές στα κλινικά συμπτώματα που παρατηρούνται κάτω από πειραματικές συνθήκες αποδίδονται στην διαφορετική παθογένεια διαφορετικών στελεχων μπαρτονέλλας που έχουν χρησιμοποιηθεί στην πειραματική μόλυνση (Breitschwerdt *et al.* 1995; Kordick *et al.* 1996).

1.2.6.3. Μπαρτονελλώσεις στα σκυλιά

Η πρώτη απομόνωση μπαρτονέλλας από σκυλί πραγματοποιήθηκε σε μια περίπτωση ενδοκαρδίτιδας το 1993 (Breitschwerdt *et al.* 1995; Breitschwerdt *et al.* 1999). Από τότε, η *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffi* έχει προσδιοριστεί σαν

Πίνακας 6. Οροεπιπολασμός της *Bartonella henselae* σε ανθρώπινο πληθυσμό και διαφορετικούς πληθυσμούς από γάτες από διάφορες χώρες *

Οροεπιπολασμός IgG αντισωμάτων έναντι της *B. henselae* στις γάτες (%)		
Country	**Stray**	**Pet**
Sweden	NA	1
Japan	NA	8.8-15.1 (northern) 0-2 (central) 10.9-12.6 (southern)
United States	81	27.9
Thailand	27.6	NA
Italy	39.0	43.5
Jordan	NA	32.0
Οροεπιπολασμός IgG αντισωμάτων έναντι της *B. henselae* στον ανθρώπινο πληθυσμό (%)		
Country	**Healthy**	**Other**
Sweden	1	NA
Japan	4.5	11-15 (veterinarians)
United States	3.6-6	7 (veterinarians)
Thailand	5.5	NA
Italy	NA	8.5-61.6 (children)
Jordan	NA	NA

* NA, not available.

σημαντική αιτία ενδοκαρδίτιδας στα σκυλιά (Roux *et al.* 2000). Το ίδιο είδος προσδιορίστηκε επίσης σαν αίτιο σε μια περίπτωση ενδοκαρδίτιδας σε άνθρωπο (Breitschwerdt *et al.* 1999). Όπως και στους ανθρώπους, το φάσμα των κλινικών συμπτωμάτων από λοίμωξη με *Bartonella* στα σκυλιά ολοένα επεκτείνεται, και σήμερα είναι συνδεμένη με καρδιακές αρρυθμίες, ενδοκαρδίτιδα και μυοκαρδίτιδα (Pappalardo *et al.* 1997), καθώς επίσης κοκκιωματώδη λεμφαδενίτιδα και κοκκιωματώδη ρινίτιδα (MacDonald *et al.* 2004). Σε ανθρώπους και σκυλιά, οι περιπτώσεις ενδοκαρδίτιδας από Μπαρτονέλα περιλαμβάνουν συνήθως την αορτική βαλβίδα και χαρακτηρίζονται από ογκώδη βλαστικά τραύματα (MacDonald *et al.* 2004). Σε μια κτηνιατρική κλινική, οι μπαρτονελλώσεις εμπλέχτηκαν σχεδόν στο ένα τρίτο των περιπτώσεων ενδοκαρδίτιδας που εντοπίστηκαν κατά τη διάρκεια μιας διετούς περιόδου (Breitschwerdt *et al.* 2004). Βάση ορολογικών στοιχείων, η μόλυνση με *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii* μπορεί επίσης να προκαλέσει άνοσοεξαρτώμενη αιμολυτική αναιμία, ουδετεροφιλική ή κοκκιωματώδη μηνιγκοεγκεφαλίτιδα, ουδετεροφιλική πολυαρθρίτιδα, δερματική αγγεΐτιδα, και ραγοειδίτιδα στα σκυλιά (Henn *et al.* 2005). Μια περίπτωση κλινικής διάγνωσης που συνδέεται με οροθετικά σκυλιά για *Bartonella* spp. προτείνει σχέση της μπαρτονέλλωσης με χωλότητα, αρθρίτιδα, σπληνομεγαλία και ρινική απέκκριση/ρινορραγία (Kordick and Breitschwerdt 1998). Εντούτοις, η *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii* έχει επίσης απομονωθεί από κλινικά υγιή σκυλιά, τα οποία μπορούν να είναι μακροπρόθεσμοι φορείς του βακτηρίου (Chomel *et al.* 2001). Τα σκυλιά μπορεί να είναι μολυσμένα από αρκετά άλλα είδη Μπαρτονέλας, συμπεριλαμβανομένης της *B. clarridgeiae* η οποία έχει απομονωθεί από αίμα σκυλιού με ενδοκαρδίτιδα (Kitchell *et al.* 2000) και έχει ανιχνευθεί με PCR σε σκυλί με ηπατική λεμφοκυτταρική ηπατίτιδα (Kitchell *et al.* 2000). DNA από *B. henselae* έχει ανιχνευθεί σε σκυλί με ηπατική πελίωση (Gillespie *et al.* 2003) και πιό πρόσφατα σε σκυλί με κοκκιωματώδη ηπατίτιδα (Mexas *et al.* 2002). Ανιχνεύθηκε επίσης DNA από *B. henselae* σε αίμα από άρρωστο σκυλί (Chomel *et al.* 2003a). Τέλος, η *B. washoensis*, η οποία είναι ένα είδος με τρωκτικά για κύριο ξενιστή έχει απομονωθεί από σκυλί που έπασχε από μητροειδή ενδοκαρδίτιδα (Fournier *et al.* 2002; Jacomo *et al.* 2002) [Πίνακας 7].

Πίνακας 7. Κλινική εμφάνιση των λοιμώξεων από *Bartonella* spp στο σκύλο

***Bartonella* species**	**Νόσος / Συμπτώματα**
B. clarridgeiae	Ενδοκαρδίτιδα, ηπατίτιδα
B. elizabethae	Αναιμία, λήθαργος, απώλεια βάρους
B.henselae	κοκκιωματώδης ηπατίτιδα , ηπατική πελίωση
B. grahamii	Δεν έχει διαγνωστεί σε σκυλιά
B. koehlerae	Δεν έχει διαγνωστεί σε σκυλιά
B. vinsonii subsp. arupensis	Δεν έχει διαγνωστεί σε σκυλιά
B. vinsonii subsp. berkhoffii	Ενδοκαρδίτιδα, μυοκαρδίτιδα, αρρυθμία, ιριδοκυκλίτιδα, χοριοειδίτιδα, limping, σπληνομεγαλία, πολυαρθρίτιδα, epistaxis
B. washoensis	Ενδοκαρδίτιδα
B.quintana	Ενδοκαρδίτιδα

1.2.7. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ

Στους ανθρώπους, η κλινική διάγνωση της νόσου εξ΄ονύχων γάλης (CSD) βασίζεται στην ανίχνευση διογκωμένων λεμφαδένων και ενδεχομένως την παρουσία μικρής κύστης ή κοκκιώματος στην περιοχή ενοφθαλμισμού. Εντούτοις, η κλινική διάγνωση από τις άτυπες μορφές της CSD και άλλων συνδρόμων που συνδέονται με μόλυνση από τη *B.henselae* ή άλλα είδη Μπαρτονέλας δεν είναι εύκολη και απαιτεί εργαστηρικά διαγνωστικά μέσα

Η διάγνωση των μπαρτονελλών βασίζεται σε ορολογικό έλεγχο, με μέθοδο αναφοράς τον έμμεσο ανοσοφθορισμό, καλλιέργεια, και μεθόδους μοριακής βιολογίας [Πίνακας 8]. Ο χαρακτηρισμός προσφάτως του γενώματος στελεχών όπως η *B.bacilliformis*, *Bartonella* Quintana (strain Toulouse), *B.henselae* (strain Houston-1) και B. tribocorum επέτρεψε την εφαρμογή σύγχρονων τεχνικών διάγνωσης και τυποποίησης.

Πίνακας 8. Εργαστηριακή διάγνωση Μπαρτονελώσεων

Μόλυνση	**Είδος Μπαρτονέλας**	**Διαθέσιμες τεχνικές Διάγνωσης**
Πυρετός χαρακωμάτων	*B.quintana*	Αιμοκαλλιέργεια, Ορολογικός έλεγχος
Πυρετός Oroya	*B.bacilliformis*	Αιμοκαλλιέργεια, επίχρισμα αίματος
Verruga peruana	*B.bacilliformis*	Βιοψία & καλλιέργεια
Νόσος εξ΄ονύχων γάλης	*B.henselae*	Βιοψία, Ορολογικός έλεγχος & PCR
Βακτηριακή αγγειωμάτωση	*B.quintana* *B.henselae*	Βιοψία, καλλιέργεια & PCR
Ηπατική πελίωση	*B.henselae*	Βιοψία, καλλιέργεια & PCR
Βακτηριαιμία σε άστεγους	*B.quintana*	Αιμοκαλλιέργεια
Ενδοκαρδίτιδα	*B.quintana* *B.henselae* B. elizabethae	Ορολογικός έλεγχος, Αιμοκαλλιέργεια, PCR

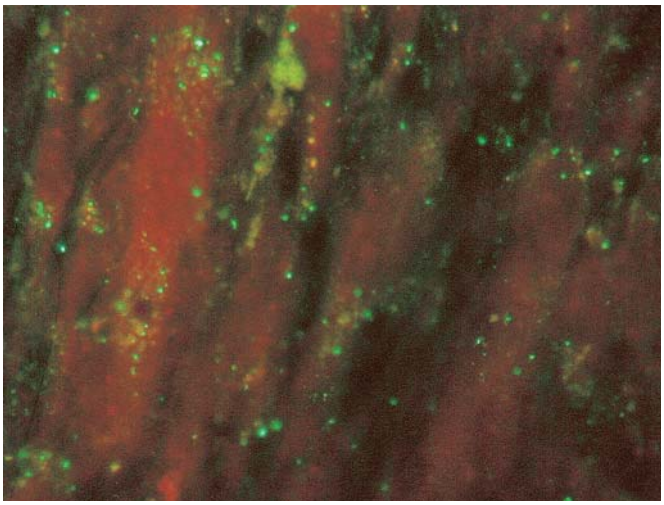
1.2.7.1. **Απομόνωση βακτηρίου με καλλιέργια**

Μια θετική καλλιέργια είναι το πιο αξιόπιστο αποτέλεσμα για την οριστική διάγνωση οξείας Μπαρτονέλλωσης (Kordick *et al.* 1999). Η απομόνωση βακτηρίων σε ανθρώπους με νόσο εξ΄ονύχων γάλης ή σκυλιά με μπαρτονέλωση είναι σπάνια επιτυχής. Στις γάτες, είναι απαραίτητες οι πολλαπλές καλλιέργειες αίματος λόγω της υποτροπιάζουσας φύσης της βακτηριαιμίας (La Scola and Raoult 1999). Η διαδικασία της απομόνωσης Μπαρτονέλας από δείγματα αίματος εκτελείται αρχικά με τη λήψη αίματος σε πλαστικούς σωλήνες που περιέχουν EDTA. Η χρήση των πλαστικών σωληνών αντί των κοινών υάλινων σωληνών αίματος έχει το πλεονέκτημα να αποτρέπει τη θραύση τους όταν υποβάλλονται σε χαμηλή θερμοκρασία ψύξης και την αποφυγή κινδύνου επιμόλυνσης των δειγμάτων κατά τη διάρκεια της μεταφοράς από τον υάλινο σε πλαστικό σωλήνα πριν από το πάγωμα. Το αίμα ενοφθαλμίζεται σε άγαρ με αίμα κουνελιού ή αλόγου, συνήθως μετά από ψύξη για να προκληθεί λύση των ερυθροκυττάρων, και επωάζεται για τουλάχιστον τέσσερις εβδομάδες στους 35°C σε ατμόσφαιρα με 5% διοξείδιο του άνθρακα. Άλλες ευρέως χρησιμοποιημένες μεθόδοι για την απομόνωση Μπαρτονελών συμπεριλαμβάνουν την αιμοκαλλιέργια σε υγρό ενδιάμεσο υλικό και τις κυτταροκαλλιέργιες (Regnery *et al.* 1992b; Koehler and Tappero 1993; Jacomo *et al.* 2002; MacDonald *et al.* 2004). Προσδιορισμός του απομονωθέντος στελέχους εκτελείται χρησιμοποιώντας μοριακές τεχνικές, όπως PCR ή την μερική ανίχνευση αλληλουχίας επιλεγμένων γονιδίων.

1.2.7.2. Ανίχνευση μπαρτονελλών ανοσοφθορισμό

Στους ανθρώπους ο ανοσοφθορισμός (κυρίως έμμεσος ανοσοφθορισμός-IFA) είναι η μέθοδος αναφοράς για τη διάγνωση της νόσου εξ΄ονύχων γάλης [Εικόνα 22] (Fournier *et al.* 2002; Jacomo *et al.* 2002). Σε ιστούς και κύτταρα χρησιμοποιείται περισσότερο ο άμεσος ανοσοφθορισμός. Δείγμα με τίτλους IgG αντισωμάτων μεγαλύτερους ή ίσους με αραίωση 1:64 θεωρείται ως θετικό για μπαρτονέλωση όταν ο ασθενής έχει εξεταστεί τουλάχιστον δύο έως τρεις εβδομάδες μετά από μια πιθανή μόλυνση. Τίτλοι IgG αντισωμάτων μεγαλύτεροι από 1:800 σχετίζονται με (ή και

αρκετές φορές προβλέπουν) ενδοκαρδίτιδα σε ανθρώπους και ζώα (Maurin and Raoult 1996; Raoult and Roux 1999). Μεταβλητότητα στους τίτλους αντισωμάτων μπορούν να εμφανιστούν όταν διαφορετικές μέθοδοι προετοιμασίας αντιγόνου χρησιμοποιούνται για την εξέταση. Επιπλέον, έχουν αναφερθεί διασταυρούμενες αντιδράσεις με *Coxiella burnetii* και *Chlamydia pneumoniae* (Guptill 2003).



Εικόνα 22. Ανίχνευση μπαρτονέλλας με άμεσο ανοσοφθορισμό.

1.2.7.3. Μέθοδοι μοριακής βιολογίας

Οι μπαρτονέλλες μπορούν να ανιχνευθούν από το αίμα και τους ιστούς με τη χρήση της PCR. Έναντι της καλλιέργιας, η εξαγωγή του DNA από δείγματα ιστού και έπειτα η ανίχνευση με PCR είναι επιτυχέστερη ως μέθοδος διάγνωσης μπαρτονέλλωσης σε ανθρώπους και σκυλιά (Fenollar and Raoult 2004). Διάφοροι ιστοί μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανίχνευση του βακτηρίου με τη μέθοδο της PCR όπως λεμφαδένας, καρδιακή βαλβίδα, δέρμα, και συκώτι. Αν και οι φρέσκοι ή παγωμένοι ιστοί είναι καταλληλότεροι, συντηρημένοι ιστοί (formalin-fixed), ή εγκλεισμένοι σε παραφίνη ιστοί μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν. Η χρήση εναρκτών για την ενίσχυση του 16S rRNA γονιδίου δεν είναι κατάλληλη μέθοδος για την ανίχνευση μπαρτονέλας στο επίπεδο του είδους επειδή το συγκεκριμένο γονίδιο εμφανίζει ομοιότητα > 97,8% σε όλα τα είδη μπαρτονέλλας (MacDonald *et al.* 2004). Νέοι στόχοι χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση και διαχωρισμό ειδών Μπαρτονέλλας με PCR.

1.2.8. ΘΕΡΑΠΕΙΑ

1.2.8.1. Ανθρωποι

Το καλύτερο θεραπευτικό σχήμα για την αντιμετώπιση των μπαρτονελλώσεων δεν έχει καθοριστεί με σαφήνεια ενώ έχουν χρησιμοποιηθεί στη θεραπεία λοιμώξεων από *Bartonella*: ερυθρομυκίνη, μακρολίδες, δοξυκυκλίνη, ριφαμπικίνη, κεφαλοσπορίνη, αζιθρομικίνη, χλοραμφενικόλη και κινολόνες.

Οι Μπαρτονέλλες είναι ευαίσθητες σε πολλά αντιβιοτικά συμπεριλαμβανόμενης της πενικιλίνης, κεφαλοσπορίνης, αμινογλυκοσίδης, χλωραμφενικόλης, τετρακυκλίνης, μακρολιδών, ριφαμπίνης, φλουοροκινολονών, και κοτριμοξαζόλης (Maurin *et al.* 1995).

Εν τούτοις, οι MICs (ελάχιστες ανασταλτικές συγκεντρώσεις) των αντιβιοτικών σε διάφορα είδη μπαρτονελλών, δεν σχετίζονται με την *in vivo* αποτελεσματικότητα τους σε ασθενείς για αρκετά αντιβιοτικά (Ives *et al.* 2000; Ives *et al.* 2001). Τα περισσότερα αντιβιοτικά έχουν μόνο βακτηριοστατική δράση (Gray *et al.* 2004). Η έλλειψη βακτηριοκτόνου επίδρασης των αντιβιοτικών ενάντια στις Μπαρτονέλες και οι διαφορετικές θέσεις που καταλαμβάνουν τα βακτήρια στον ανθρώπινο ξενιστή, π.χ. η απομάκρυνση από τα ερυθροκύτταρα, μπορεί να εξηγήσει τέτοιες αποκλίσεις μεταξύ των *in vitro* και κλινικών στοιχείων. Η πενικιλίνη για παράδειγμα, δεν έχει καμία *in vivo* αποτελεσματικότητα, παρά την πολύ χαμηλή ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (Ives *et al.* 1997) παρατηρηθήσα *in vitro* (Rolain *et al.* 2003c). Σε μοντέλο καλλιεργιών ερυθροκυττάρων, διαπιστώθηκε ότι τα περισσότερα από τα δοκιμασμένα αντιβιοτικά (δοξυκυκλίνη, φλουοροκινολόνες, και βήτα-λακτάμες) δεν είχαν βακτηριοκτόνο δράση ενάντια στις Μπαρτονέλες (Musso *et al.* 1995). Έχει αναφερθεί οτι μόνο η οικογένεια των αμινογλυκοσιδών έχουν βακτηριοκτόνο δράση *in vitro* ενάντια σε μπαρτονέλες που έχουν καλλιεργηθεί είτε σε υγρό θρεπτικό υλικό (Rolain *et al.* 2000) είτε σε ενδοθηλιακά κύτταρα (Schulein *et al.* 2001; Rolain *et al.* 2003c).

Με βάση τα παραπάνω, για σοβαρές μπαρτονελώσεις είναι κρίσιμο να χρησιμοποιηθούν δύο αντιβιοτικά, κάθε ένα από τα οποία να έχει καλή *in vivo* αποτελεσματικότητα. Αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό εάν η γενταμυκίνη είναι ένα

από τα φάρμακα στη θεραπευτική αγωγή, επειδή έχει αποδειχθεί οτι οι Μπαρτονέλες που βρίσκονται μέσα στα ερυθροκύτταρα προστατεύονται από την γενταμυκίνη (Lappin and Black 1999; Ketring *et al.* 2004). Κατά συνέπεια, η προσθήκη ενός ακόμη αντιβιοτικού με καλή *in vivo* δραστηριότητα ενάντια στις Μπαρτονέλες είναι κρίσιμη, επειδή ο συνδυασμός των δυο αντιβιοτικών μπορεί να εξαλείψει τα βακτηρίδια στις διαφορετικές θέσεις στον ξενιστή.

1.2.8.2. Γάτες

Επειδή η διάγνωση μπαρτονέλωσης στις γάτες είναι δύσκολη και δεν έχει ακόμη τυποποιηθεί, δεν υπάρχει βέλτιστη αντιμικροβιακή θεραπεία. Ένα μεγάλο μέρος των πληροφοριών σχετικά με την θεραπεία της μπαρτονέλωσης στις γάτες έχει προκύψει από μελέτες για ανθρώπους. Ενώ πολλά από τα φάρμακα που χρησιμοποιούνται για να θεραπεύσουν τους ανθρώπους από τη νόσο εξ΄ονύχων γάλης εμφανίζουν πολύ καλή δυνατότητα εισροής στα κύτταρα, όλα εξαρτώνται απο το βαθμό πολλαπλασιασμού των βακτηρίων. Σε ατομικές δηλώσεις περιστατικών από γάτες, έχουν αναφερθεί θεραπείες με τη χορήγηση δοξυκυκλίνης ή αζιθρομυκίνης (Culic *et al.* 2002; Lee *et al.* 2004). Και τα δύο αντιβιοτικά έχουν ευρύ αντιβακτηριακό φάσμα και επίσης ρυθμίζουν το άνοσοποιητικό σύστημα, επομένως οι εμφανείς θεραπευτικές ενδείξεις είναι πιθανόν να προέρχονται από την αντι-φλεγμονώδη δράση των συγκεκριμένων φαρμάκων (Melendez *et al.* 2000). Παραταύτα, η έκταση των αντιφλεγμονωδών αποτελεσμάτων αυτών στις γάτες είναι άγνωστη.

Γενικά προτείνεται η συνετή χρήση αντιμικροβιακών παραγόντων πριν από την επιλογή του αντιβιοτικού και τα φάρμακα που χρησιμοποιούνται συνήθως για τους ανθρώπους (δηλ., φλουοροκινολόνες και αζιθρομυκίνη), δεν πρέπει να χορηγούνται για στερεότυπες μπαρτονελώσεις στις γάτες εάν υπάρχει μια εναλλακτική επιλογή (www.avma.org/cienact/jtua/default.asp). Η λήψη δοξυκυκλίνης (10 mg/kg, 1 με 2 φορές την ημέρα για μια εβδομάδα) ή αμοξικιλίνη-κλαβουλανικό (22 mg/kg, 1 φορά την ημέρα για 7 ημέρες) είναι κατάλληλη σαν πρώτη επιλογή για γάτες θετικές για μπαρτονέλωση για τις οποίες δεν έχει γίνει οριστική διάγνωση. Εάν

υπάρξει ικανοποιητική αντίδραση, η θεραπεία πρέπει να συνεχιστεί. Εάν τα συμπτώματα παραμένουν μετά από 7 ημέρες και μια περαιτέρω λεπτομερέστερη αναζήτηση της αιτιολογίας δεν αποκομίσει μια σίγουρη διάγνωση, συνιστάται αλλαγή του αντιβιοτικού σε αζιθρομυκίνη (10 mg/kg, καθημερινά για μια εβδομάδα και ανά 48 ώρες στη συνέχεια) ή φλουοροκινολόνη. Η βέλτιστη διάρκεια της θεραπείας δεν έχει καθοριστεί για οποιοδήποτε φάρμακο, εντούτοις, επειδή οι οργανισμοί είναι ενδοκυττάριοι είναι συνετή η συνέχιση της θεραπείας για ένα ελάχιστο διάστημα 2 εβδομάδων και τουλάχιστον 1 εβδομάδα μετά από την απουσία των συμπτωμάτων. Επειδή οι γάτες με εμφανή κλινική εικόνα μπαρτονέλωσης είναι πιθανώς βακτηραιμιακές, χρειάζεται προσοχή για να αποφευχθεί τυχόν δάγκωμα ή γρατσούνισμα κατά τη διαρκεία χορήγησης των φαρμάκων. Πρέπει επίσης να παίρνονται προφυλάξεις κατά τη χορήγηση της δοξυκυκλίνης ούτως ώστε να ελαχιστοποιηθεί ο κίνδυνος ερεθισμού και στένωσης του οισοφάγου της γάτας (Regnery *et al.* 1996; Kordick and Breitschwerdt 1997). Οι προαναφερόμενες αντιβιοτικές θεραπείες που χορηγούνται προς το παρόν για την θεραπεία της μπαρτονέλωσης από *B. henselae* μπορούν να μειώσουν το επίπεδο βακτηραιμίας στις γάτες αλλά όχι όμως και να εξαλείψουν την μόλυνση. Συνεπώς, δεν είναι σύνηθες να χρησιμοποιούνται αντιμικροβιακοί παράγοντες για την θεραπεία ή πρόληψη *των* μπαρτονελώσεων στις γάτες (Regnery *et al.* 1996).

Έχουν πραγματοποιηθεί πειράματα με γάτες για να αξιολογηθεί η αποτελεσματικότητα της αντιμικροβιακής θεραπείας για τη *B.henselae.* Οι Regnery (Greene *et al.* 1996), Greene (Kordick *et al.* 1997b) και οι συνεργάτες τους αξιολόγησαν την αποτελεσματικότητα αντιβιοτικών κατά τη διάρκεια οξείας μόλυνσης σε γάτες που ενοφθαλμίστηκαν με *B.henselae* καλλιεργημένη στο εργαστήριο, ενώ ο Kordick και οι συνεργάτες του (Regnery *et al.* 1996) μελέτησαν φυσικά μολυσμένες γάτες με χρόνιες μολύνσεις. Ο Regnery καλλιεργώντας το αίμα από τις πειραματικά μολυσμένες γάτες ανά διαστήματα κατέληξε ότι μόνο η τετρακυκλίνη και η ερυθρομυκίνη μείωσε σημαντικά τον αριθμό βακτηρίων στην κυκλοφορία του αίματος. Εντούτοις, δεν υπήρξε καμία σημαντική διαφορά μεταξύ των τεσσάρων αντιβιοτικών που χρησιμοποιήθηκαν όσον αφορά την κατάληξη της βακτηραιμίας (Kordick *et al.* 1997b). Στη μελέτη από τον Kordick (Greene *et al.* 1996), διάφορα αντιβιοτικά, συμπεριλαμβανόμενων της δοξυκυκλίνης και της αμοξικιλίνης, εμφανίστηκαν να είναι αποτελεσματικά στη μείωση του πληθυσμού

των βακτηρίων στο αίμα (Kordick *et al.* 1997b). Εντούτοις, παρατηρήθηκε ξανά βακτηραιμία αφότου διακόπηκε η θεραπεία, προτείνοντας ότι τα αντιβιοτικά δεν εξάλειψαν την μόλυνση. Ο Kordick (Foucault *et al.* 2002) ανέφερε οτι η βακτηραιμία σε φυσικά, χρόνια μολυσμένες γάτες εξαλείφθηκε επιτυχώς σε μόνο 9 από 14 γάτες στις οποίες χορηγήθηκε ενροφλοξασίνη και 2 από τις 8 που χορηγήθηκαν δοξυκυκλίνη. Οι μελέτες αυτές είναι δύσκολο να συγκριθούν επειδή το στέλεχος που χρησιμοποιήθηκε ως ενοφθάλμισμα για την πειραματική μόλυνση ήταν καλλιεργημένο σε άγαρ, και η παθογένεια αυτών των βακτηρίων να είναι πιθανώς διαφορετική από αυτή *των B. henselae* στις φυσικά μολυσμένες γάτες. Επιπλέον, η μια μελέτη χρησιμοποιούσε γάτες σε οξεία λοίμωξη, ενώ η άλλη τις φυσικά, χρόνια μολυσμένες γάτες. Συνεπώς, οι οξείες πειραματικές μολύνσεις μπορεί να είναι πιό ευαίσθητες στα αντιβιοτικά από τις χρόνιες μολύνσεις στις φυσικά μολυσμένες γάτες. Παρόμοια κατάσταση μπορεί να ισχύει στην περίπτωση των ανθρώπων που μολύνονται με *B. quintana* (Breitschwerdt *et al.* 2004).

1.2.8.3. Σκυλιά

Όσο αφορά τα σκυλιά, δεν έχει εκτελεσθεί καμία έρευνα που καθορίζει την αποτελεσματικότητα των αντιβιοτικών για θεραπεία της μόλυνσης από Μπαρτονέλα. Είναι πιθανό αντιβιοτικά όπως η δοξυκυκλίνη (10 mg/kg την ημέρα) ή τετρακυκλίνη να μπορούν να μειώσουν το επίπεδο βακτηραιμίας κατά τη διάρκεια μιας χρόνιας λοίμωξης, αλλά πρέπει να χορηγούνται για παρατεταμένα χρονικά διαστήματα (4-6 εβδομάδες). Οι φλουοροκινολόνες από μόνες τους ή σε συνδυασμό με αμοξικιλίνη έχουν επίσης θετική θεραπευτική αντίδραση σε σκυλιά (Chomel *et al.* 2004a), μιας και επαναλαμβανόμενα υψηλοί τίτλοι αντισωμάτων σε *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii* έγιναν αρνητικοί μετά από την εν λόγω θεραπεία. Εντούτοις, η αντιβιοτική θεραπεία είναι πιθανόν να είναι αναποτελεσματική όταν τα τραύματα ενδοκαρδίτιδας έχουν ήδη καλά εδραιωθεί.

Ολοκληρώνοντας, σε οποιαδήποτε περίπτωση γίνεται προσπάθεια θεραπείας αυτή θα πρέπει να είναι παρατεταμένη και να συνδυάζεται με την εξόντωση των ψύλλων σε όλα τα ζώα που βρίσκονται σε επαφή με το υπό θεραπεία ζώο ούτως ώστε να αποφευχθεί μια νέα μόλυνση.

1.2.9. ΠΡΟΦΥΛΑΞΗ - ΠΡΟΛΗΨΗ

Οι κατοικίδιες γάτες αντιπροσωπεύουν τον κύριο ξενιστή για την *B. henselae.* Η επιλογή της κατάλληλης γάτας για κατοικίδιο ζώο είναι σημαντική για να αποφευχθεί ο κίνδυνος μπαρτονέλωσης. Στις περισσότερες περιπτώσεις, οι οροαρνητικές γάτες είναι πιθανότερο να μην είναι βακτηραιμιακές και συνεπώς ασφαλής για ιδιοκτησία (Koehler *et al.* 1994; Chomel *et al.* 1995). Αντιθέτως, νεαρά γατάκια, ειδικά αδέσποτα και με ψύλλους, είναι πολύ πιθανό να είναι βακτηραιμιακά (Chomel 2000). Επομένως, πιθανοί διοκτήτες γατών, ειδικά εάν είναι ανοσολογικά ανεπαρκείς, πρέπει να επιδιώξουν να αποκτήσουν μια γάτα μεγαλωμένη σε ένα "καθαρό", ελεύθερο από ψύλλους περιβάλλον. Σε περίπτωση που δεν ορίζεται επαρκώς η προέλευση της γάτας, συστήνεται ορολογική ανάλυση. Μόνο οροαρνητικές γάτες πρέπει να είναι υιοθετούνται όταν υπάρχει πιθανότητα άτομα με ανοσοκαταστολή να εκτεθούν στην κατοικίδια γάτα. Ο έλεγχος για ψύλλους και η εξόντωση τους είναι επίσης ένα σημαντικό μέτρο για να προληφθεί η μόλυνση γατιών, η εξάπλωση της μόλυνσης από γάτα σε γάτα και ενδεχομένως η εξάπλωση από τις γάτες στους ανθρώπους (Yamamoto *et al.* 1998). Συνολικά, αποτελεσματικά μέσα για την αποφυγή μπαρτονέλωσης από *B. henselae* είναι κοινή λογική, υγιεινή, και, ενδεχομένως, τροποποίηση της συμπεριφοράς των ίδιων των ιδιοκτητών. Πλύσιμο των χεριών έπειτα από κάθε επαφή με το ζώο και απολύμανση κοψίματος ή πληγής από γρατσουνιά ή δάγκωμα, τακτικό κόψιμο των ονύχων της γάτας και η αποφυγή έντονου παιχνιδιού με το ζώο. Εξετάζεται η πιθανότητα δημιουργίας εμβολίου για τις γάτες που θα έχει ως αποτέλεσμα την πρόληψη της εξάπλωσης της μόλυνσης στις γάτες και συνεπώς την μείωση της πιθανότητας μόλυνσης στον άνθρωπο. Εντούτοις, η ευρεία ποικιλομορφία μεταξύ των στελεχών Μπαρτονέλας ακόμη και του ίδιου γενότυπου είναι το κυριότερο εμπόδιο στην δημιουργία εμβολίου για τις γάτες. Έχει αποδειχθεί η έλλειψη διασταυρώμενης προστασίας μεταξύ των *B. henselae* Houston I και *B. henselae* Marseille (Yamamoto *et al.* 2003). Εντούτοις, μια περισσότερο πρόσφατη μελέτη των ίδιων ερευνητών (Pappalardo *et al.* 1997; Breitschwerdt *et al.* 1998; Chang *et al.* 2001) κατέδειξε προστατευτική επίδραση χρησιμοποιώντας *B. henselae* Houston I σαν εμβόλιο ενάντια σε μόλυνση από *B. henselae* Marseille.

Οι μπαρτονελλώσεις σε σκυλιά είναι επίσης πιθανό να είναι φορέομεταδιδόμενες με τους κρότωνες να είναι οι κυριότεροι υποψήφιοι φορείς για τη μετάδοση της *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii* (Solano-Gallego *et al.* 2004). Επομένως, η πρόληψη της παρασιτικής μόλυνσης των κροτώνων πρέπει να είναι ένα από τα κύρια μέτρα πρόληψης. Χρήση απωθητικών ουσιών κατά των κροτώνων και πλύσιμο του σκυλιού μετά από περίπατο σε περιοχή υψηλού κινδύνου πρέπει να γίνεται συστηματικά για να αποτρέψει όχι μόνο μπαρτονελώσεις, αλλά και άλλες μολύνσεις μεταδιδόμενες από τους κρότωνες. Τα μέτρα πρόληψης κατά των ψύλλων είναι επίσης σημαντικά, μιας και τα σκυλιά μπορούν να μολυνθούν από *B. henselae* (Καφετζής 1994), ενδεχομένως όταν εκτίθονται σε ψύλλους γατών.

Β.ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη της επιδημιολογικής αλυσίδας και της οικογεωγραφίας της *Rickettsia typhi* (αιτιολογικού παράγοντα του ενδημικού τύφου) και των μπαρτονελλών στην Κύπρο.

Οι ρικέτσιες του ΕΤ αναζητήθηκαν σε φυσικούς ξενιστές που θεωρούνται βασικοί παράγοντες του κύκλου μετάδοσης: σε τρωκτικά που θεωρούνται τα κύρια υπόδοχα της *R.typhi* και σε αρθρόποδα που θεωρούνται οι κύριοι μεταβιβαστές (ψύλλοι).

Οι μπαρτονέλλες αναζητήθηκαν σε θηλαστικά-ξενιστές (τρωκτικά-γάτες) και σε αρθρόποδα μεταβιβαστές (ψύλλοι).

2. ΣΥΝΟΠΤΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση, και τυποποίηση των βακτηρίων που μελετήθηκαν ήταν ορολογικές μέθοδοι, καθώς και μέθοδοι μοριακής βιολογίας. Οι μέθοδοι μοριακής βιολογίας που χρησιμοποιήθηκαν συμβάλλουν στην καλύτερη διάγνωση των νόσων αυτών σε ανθρώπους και ζώα, αλλά κυρίως επιτρέπουν τη διερεύνηση των κρίκων που υπεισέρχονται στην επιδημιολογική αλυσίδα τους, πράγμα ιδιαίτερα σημαντικό αφού δίνει πληροφορίες για την επιδημιολογία, τον τρόπο μετάδοσης των παθογόνων μικροοργανισμών και επομένως συμβάλλει στον απώτερο στόχο, τον έλεγχο των παθογόνων παραγόντων.

Χρησιμοποιήθηκε μεθοδολογία μηχανογραφημένης χαρτογράφησης σε επίπεδο χώρας και μικρής περιοχής.

Η μελέτη αποτελείται από δύο μέρη:

2.1. ΜΕΛΕΤΗ ΣΕ ΘΗΛΑΣΤΙΚΑ-ΞΕΝΙΣΤΕΣ

Έγινε σύλληψη πιθανών υποδόχων από τα οποία έγινε αιμοληψία και συλλογή αρθροπόδων-μεταβιβαστών που παρασιτούσαν σ' αυτά. Η μελέτη του βαθμού μόλυνσης υποδόχων και των εκτοπαρασίτων τους έγινε με ορολογικές μεθόδους και με τεχνικές μοριακής βιολογίας.

Το υλικό της μελέτης αποτέλεσαν 625 τρωκτικά και 72 γάτες , καθώς και τα επιδημιολογικά δελτία που συμπληρώθηκαν για κάθε ζώο.

2.1.1. Οροεπιδημιολογική μελέτη σε ζώα (τρωκτικά και γάτες)

Η οροεπιδημιολογική μελέτη είχε σαν στόχο να προσδιοριστεί ο επιπολασμός των υπό μελέτη παθογόνων στα θηλαστικά-ξενιστές και να εντοπιστούν παράγοντες κινδύνου για τη μετάδοση, καθώς και να εντοπιστούν περιοχές υψηλού κινδύνου (με τη βοήθεια Προγράμματος Μηχανογραφημένης Χαρτογράφησης).

Διεξήχθη ορολογικός έλεγχος σε δείγματα ορού προερχόμενα από τα παραπάνω θηλαστικά- ξενιστές (τρωκτικά, γάτες). Ελέγχθηκαν 496 δείγματα αίματος τρωκτικών, και 72 δείγματα αίματος από γάτες. Ο ορολογικός έλεγχος έγινε με τη μέθοδο του έμμεσου ανοσοφθορισμού για την ανίχνευση αντισωμάτων έναντι της *R.typhi*, και της *B.henselae*.

2.1.2. Γονοτυπική ανίχνευση και ταυτοποίηση των υπό μελέτη παθογόνων σε δείγματα αίματος από σπονδυλωτούς ξενιστές (τρωκτικά, γάτες)

Ελέγχθηκαν 146 δείγματα αίματος από τρωκτικά και γάτες, και 32 δείγματα ιστών από τρωκτικά με τη μέθοδο PCR-RFLP και PCR-Sequencing για την άμεση ανίχνευση και την ταυτοποίηση στελεχών *Rickettsia* sp. και *Bartonella* sp.

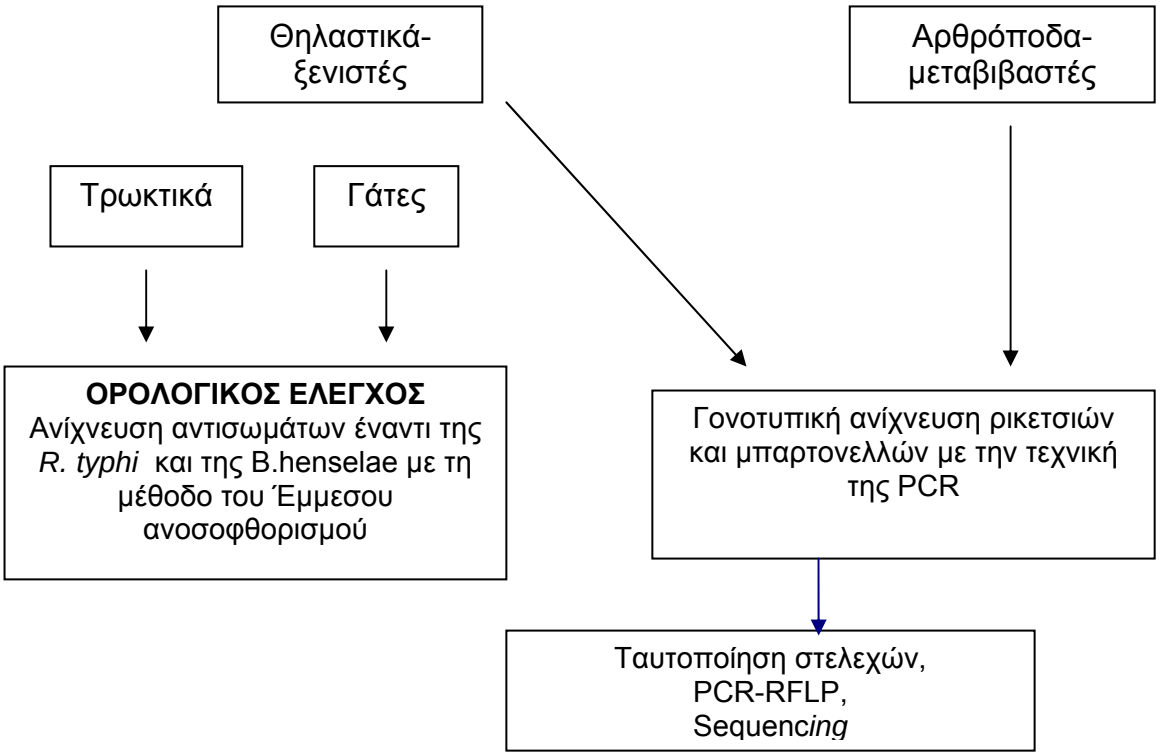
2.2. ΜΕΛΕΤΗ ΣΤΑ ΑΡΘΡΟΠΟΔΑ

2.2.1. Γονοτυπική ανίχνευση και ταυτοποίηση *Rickettsia* sp και *Bartonella* sp στα αρθρόποδα-μεταβιβαστές

Από τα συλληφθέντα ζώα, αναζητήθηκαν, συλλέχθηκαν, καταγράφηκαν και τυποποιήθηκαν εκτοπαράσιτα που παρασιτούσαν σ' αυτά. Στα αρθρόποδα εφαρμόστηκαν οι τεχνικές PCR, PCR-RFLP και DNA sequencing analysis για την άμεση ανίχνευση του μικροοργανισμού, και την ταυτοποίηση στελεχών *Rickettsia* sp και *Bartonella* sp.

Υλικό της μελέτης αποτέλεσαν συνολικά 584 δείγματα ψύλλων που παρασιτούσαν τα παραπάνω θηλαστικά (127 παρασιτούσαν γάτες και 457 παρασιτούσαν τρωκτικά).

Η παρακάτω εικόνα [Εικόνα 21] δείχνει τη μεθοδολογία που ακολουθήθηκε:



Εικόνα 23. Μεθοδολογία που ακολουθήθηκε

Στη συνέχεια περιγράφονται οι μέθοδοι αναλυτικά :

2.3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.3.1. Δειγματοληψίες

2.3.1.1. Τρωκτικά

Στήθηκαν παγίδες και έγινε σύλληψη τρωκτικών, ώστε να μελετηθεί η διασπορά των ειδών των τρωκτικών και των παθογόνων που μεταφέρουν, και να εντοπισθούν οι ενδημικές περιοχές για κάθε παθογόνο και των περιοχών υψηλού κινδύνου για τον άνθρωπο. Σε μια χρονική περίοδο 24 μηνών, έγινε σύλληψη 625 τρωκτικών από υποστατικά όλων των ειδών από 51 περιοχές της ελεύθερης Κύπρου. Τρωκτικά συνελήφθηκαν από κατοικημένες περιοχές, γεωργικές περιοχές καθώς και από κτηνοτροφικές μονάδες (υποστατικά αγελάδων, αιγοπροβάτων, χοίρων και πουλερικών), από υποστατικά όλων των ειδών ζώων για συγκριτική μελέτη.

Για την παγίδευση χρησιμοποιήθηκε αυτοσχέδια παγίδα που αποτελείτο από ξύλινη βάση (30Χ10 εκ) στην οποία ήταν στερεωμένο συρμάτινο πλέγμα σε ημικυλινδρικό σχήμα ύψους 10 εκ. Η είσοδος ήταν ξύλινη και κινητή για την παγίδευση του τρωκτικού. Η τοποθέτηση των παγίδων γινόταν σε σημεία όπου κυκλοφορούσαν τα τρωκτικά (μονοπάτια), δίπλα από τοίχους ή κοντά στις τρύπες τους σε σκιερά μέρη και κατά προτίμηση κατά ζεύγη. Χρησιμοποιούνταν πάντοτε παγίδες καθαρές και απολυμασμένες. Η τοποθέτηση των παγίδων γινόταν το απόγευμα και επιθεωρούνται το επόμενο πρωί. Παρέμεναν στο ίδιο σημείο για 5-6 μέρες και η σύλληψη άρχιζε συνήθως μετά τη δεύτερη μέρα.

Δοκιμάσθηκαν διάφορα δολώματα για προσέλευση και σύλληψη των ποντικών. Στους ανοικτούς χώρους πιο ελκυστικό ήταν το καπνιστό σαλάμι ενώ σε κλειστούς χώρους (κτηνοτροφικές μονάδες) ο συνδυασμός σαλάμι με χαρουπάλευρο ή ζωοτροφή από την ίδια μονάδα ήταν πιο αποτελεσματικός. Σε περιβάλλον όπου υπάρχει άφθονη τροφή, όπως στις κτηνοτροφικές μονάδες, οι αρουραίοι φαίνεται ότι προτιμούν το είδος της τροφής που επικρατεί στο περιβάλλον τους και έχουν συνηθίσει να τρέφονται με αυτή. Αλλαγή διατροφής φαίνεται ότι δεν είναι επιθυμητή σε αυτούς ή την αποφεύγουν σε πρώτο στάδιο. Όταν υπάρχει έλλειψη τροφής φαίνεται ότι δεν είναι τόσο εκλεκτικοί.

Τα τρωκτικά μεταφέρονταν ζωντανά στις Κτηνιατρικές Υπηρεσίες στο Εργαστήριο Νεκροψίας-Παθολογίας. Με την άφιξη των τρωκτικών στο εργαστήριο και αφού παίρνονταν όλα τα ενδεικνυόμενα μέτρα για την προστασία των ερευνητών (ένδυση με προστατευτικές ποδιές μιας χρήσης, μάσκες, γάντια μιας χρήσης), τα δείγματα ταξινομούνταν και καταγράφονταν. Σε κάθε ζώο διδόταν ένας κωδικός ο οποίος συσχετιζόταν με τον κωδικό όλων των δειγμάτων που λαμβάνονταν για έλεγχο από το ζώο. Η πλαστική σακούλα, η οποία περιείχε την παγίδα με το ζωντανό τρωκτικό, ετοποθετείτο σε θάλαμο ασφαλείας. Ακολουθούσε αναισθητοποίηση του ζώου η οποία γινόταν με την χρήση χλωροφορμίου.

Στη συνέχεια καταγράφηκαν τα χαρακτηριστικά των τρωκτικών : είδος, ηλικία, φύλο, μέγεθος, κατάσταση ανάπτυξης και υγείας. Έγιναν μετρήσεις της ουράς και του σώματος και με βάση τις μετρήσεις αυτές καθοριζόταν το είδος. Επίσης προσδιοριζόταν το φύλο, το βάρος και συμπληρώθηκε δελτίο με τα στοιχεία του ζώου.

Έγινε έλεγχος σε κάθε ζώο για την παρουσία εκτοπαρασίτων (ψύλλων, κροτώνων) τα οποία και συλλέγονταν με ειδική λαβίδα, τοποθετούνταν σε cryo-tubes και φυλάγονταν στους -80°C. Ακολούθως μετά από αντισηψία της περιοχής του θώρακα με την χρήση οινοπνεύματος, γινόταν η συλλογή του αίματος με ενδοκαρδιακή αφαίμαξη με την βοήθεια αποστειρωμένης σύριγγας 5ml και βελόνας 18G και το αίμα μοιράζετο σε tube με αντιπηκτικό EDTA και σε tube χωρίς αντιπηκτικό. Το αίμα με αντιπηκτικό φυλαγόταν στους -80°C. Το αίμα χωρίς αντιπηπτικό εφυγοκεντρείτο στις 3000 στροφές για 10 λεπτά και ο ορός μεταφερόταν σε αποστειρωμένο φιαλίδιο των 2ml και φυλαγόταν στους -80°C. Ακολουθούσε νεκροψία και λήψη οργάνων του ζώου αφού είχε προηγηθεί αντισηψία του δέρματος με την χρήση ιωδιούχου αντισηπτικού. Τα όργανα αυτά τοποθετούνταν σε αποστειρωμένα cryo-tubes και φυλάγονταν στους -80°C.

Κατά τη διάρκεια της παγίδευσης των τρωκτικών, τα οποία δυνητικά ήταν φορείς επικίνδυνων μολυσματικών ζωονόσων, λαμβάνονταν όλα τα απαραίτητα μέτρα ασφαλείας, σύμφωνα με τους κανονισμούς του CDC (Center for Disease Control). Κατά τη διάρκεια της νεκροψίας δεν χρησιμοποιήθηκαν αιχμηρά εργαλεία και ο καλός καθαρισμός των εργαλείων και ολόκληρης της επιφάνειας εργασίας ήταν απαραίτητος για την ασφάλεια των εργαζομένων. Για τον ίδιο σκοπό, τα δείγματα φυλάχτηκαν σε πλαστικά σωληνάρια με βιδωτό καπάκι, και πάρθηκαν όλα τα

απαραίτητα μέτρα για τη μείωση του κινδύνου ατυχημάτων σύμφωνα με το εγχειρίδιο του CDC.

Τα βιολογικά δείγματα διατηρήθηκαν στους -80°C μέχρι την επεξεργασία για την ανάλυσή τους. Η μεταφορά και των δειγμάτων έγινε σε ξηρό πάγο. Τα δείγματα μελετήθηκαν για την ανίχνευση και απομόνωση των υπό διερεύνηση παθογόνων παραγόντων, με ορολογικές μεθόδους και με τη χρήση μεθόδων μοριακής βιολογίας για την γονοτυπική ανίχνευση και ταυτοποίησή τους.

Σε κάποιες περιπτώσεις υπήρξε δυσκολία στη λήψη ικανής ποσότητας ορού ειδικά σε μικρού βάρους τρωκτικά. Αναζητώντας λύση στη διεθνή βιβλιογραφία εντοπίσαμε τη μέθοδο δειγματοληψίας ορού σε ειδικά φίλτρα που εφαρμόζεται για τον κυτταρομεγαλοϊό, αλλά και για την ελονοσία (στην Αφρική όπου δεν είναι εύκολη η διατήρηση και συντήρηση των ορών). Έτσι δόθηκε αυτή η λύση και σε ένα μεγάλο μέρος των δειγμάτων η λήψη του ορού γινόταν σε ειδικό φίλτρο. Η μέθοδος αυτή αποδείχτηκε ιδιαίτερα αποτελεσματική και χρήσιμη, και προτείνεται σε περιπτώσεις δειγματοληψιών στο ύπαιθρο, που εμφανίζουν δυσκολίες (πχ από γίνονται σε άγρια ζώα ή πτηνά). Οι οροί ή τα φίλτρα έφταναν αριθμημένα έως ότου ελεγχθούν για την παρουσία αντισωμάτων έναντι των παραπάνω παθογόνων. Στην περίπτωση του φίλτρου, η διαδικασία είχε ως εξής: Το φίλτρο ετοποθετείτο σε σωληνάριο με PBS και τεμαχιζόταν. Μετά από φυγοκέντρηση ελαμβάνετο ο ορός.

2.3.1.2. Γάτες

Κατά τη διάρκεια 16 μηνών (Μάρτης 2004 – Ιούλιος 2005), ελήφθησαν δείγματα αίματος από 72 γάτες (τυχαίο δείγμα). Απ' αυτές, 29 ήταν οικόσιτες γάτες (pets) που επισκέφθηκαν κτηνιατρικά ιατρεία, 12 ήταν αδέσποτες γάτες, ενώ 31 ζώα προέρχονταν από φάρμες με συγχρωτισμό με άλλα ζώα της φάρμας. Για κάθε ζώο συμπληρώθηκε δελτίο με τα παρακάτω στοιχεία: φύλο, ηλικία, περιοχή προέλευσης, κατάσταση υγείας, παρουσία (αριθμός) ή όχι εκτοπαρασίτων και συχνή επαφή με άλλα ζώα.

Από κάθε ζώο έγινε λήψη 2-2.5 mL αίματος σε συνθήκες ασηψίας από την σφαγήτιδα (external jugular vein) αφού ελαμβάνετο η άδεια και η συμφωνία των

ιδιοκτητών τους. Περίπου 1 milliliter αίματος χρησιμοποιήθηκε για τον ορολογικό έλεγχο, ενώ το υπόλοιπο χρησιμοποιήθηκε για γονοτυπική ανίχνευση.

2.3.1.3. Εκτοπαράσιτα

Τα τρωκτικά ελέγχονταν εξωτερικά για την ύπαρξη εκτοπαρασίτων και όταν αυτά ανευρίσκονταν, γινόταν συλλογή και καταγραφή του αριθμού τους ανα ζώο. Τα εκτοπαράσιτα που συλλέγονταν από κάθε ζώο τοποθετούνταν χωριστά σε πλαστικά σωληνάρια με τον κωδικό του ζώου και μεταφέρονταν στο Εργαστήριο Κλινικής Βακτηριολογίας Παρασιτολογίας Ζωονόσων και Γεωγραφικής Ιατρικής σε ξηρό πάγο ή σε αιθανόλη. Εκεί γινόταν η λεπτομερής καταγραφή του αριθμού των εκτοπαρασίτων, η ταξινόμηση-ταυτοποίηση των εκτοπαρασίτων με βάση ταξινομικές κλείδες και καταγραφόταν το είδος και ο κωδικός του ζώου στο οποίο παρασιτούσε.

Στη συνέχεια γινόταν ο έλεγχος τους για ανίχνευση και ταυτοποίηση ρικετσιών και μπαρτονελλών.

Ο κάθε ψύλλος εμβαπτιζόταν σε 0,5 ml θρεπτικού υλικού κάτω από στείρες συνθήκες και στη συνέχεια γινόταν σύνθλιψη του ψύλλου και ομογενοποίηση. Στη συνέχεια, γινόταν εξαγωγή DNA που χρησιμοποιήθηκε για γονοτυπική ανίχνευση με τη μέθοδο της PCR για την ανίχνευση ρικετσιών και μπαρτονέλλας.

2.3.2. Εργαστηριακός Έλεγχος

2.3.2.1. Συντήρηση δειγμάτων

Μετά τη συλλογή οι οροί διατηρήθηκαν στους -20° C, μέχρι να ελεγχθούν. Οι οροί ελέγχθηκαν για ανίχνευση αντισωμάτων με έμμεσο ανοσοφθορισμό έναντι της *R.typhi* και της *Bartonella*. Ο ορολογικός έλεγχος των δειγμάτων για όλα τα ανωτέρω παθογόνα έγινε με τη μέθοδο του έμμεσου ανοσοφθορισμού (προσδιορισμός IgG αντισωμάτων).

2.3.2.1.1. Πρωτόκολο

-Λήψη 5ml αίματος

-Συλλογή σε σωλήνες χωρίς αντιπηκτικό για τον ανοσοφθορισμό και με αντιπηκτικό για τη γονοτυπική ανίχνευση

-Φύλαξη στους –20^{0}C.

2.3.2.2. Έμμεσος Ανοσοφθορισμός (Regnery *et al.* 1991)

Η τεχνική αυτή βασίζεται στην αντίδραση αντιγόνου-αντισώματος. Τα μόρια του αντισώματος συνδέονται χημικά με τις χρωστικές ουσίες χωρίς να καταστρέφεται η ανοσολογική τους ειδικότητα. Όταν τα σεσημασμένα με τη βοήθεια φλουοροσκείνης μόρια των αντισωμάτων, έλθουν σε επαφή με ομόλογα αντιγόνα στα κύτταρα, τότε τα σεσημασμένα αυτά μόρια προσκολλούνται επί των αντιγονικών θέσεων. Κάτω από το μικροσκόπιο φθορισμού τα προσκολληθέντα μόρια εκπέμπουν φθορίζον φως το οποίο εξαρτάται από την φθορίζουσα ουσία η οποία χρησιμοποιείται για τη σήμανση του αντισώματος. Η τεχνική αυτή εφαρμόστηκε για τον έλεγχο ορών από τρωκτικά και γάτες.

2.3.2.2.1. Υλικά

1. -Αντιγόνο *R.typhi* (BioMerieux, France), *Bartonella* henselae (BIOSNA)
2. -IgG αντι- rat και αντι-cat αντισώματα συζευγμένα με φλουοροσείνη
3. -Γλυκερόλη
4. -Αιθανόλη 70%
5. -Ακετόνη
6. -Διάλυμα Phosphate Buffer Saline (PBS 1X)

2.3.2.2.2. Πρωτόκολο

i. Προετοιμάζονται διαδοχικές αραιώσεις των ορών με PBS.
ii. 20μl κάθε αραίωσης τοποθετούνται στις υποδοχές των αντικειμενοφόρων πλακών.
iii. Η πλάκα επωάζεται για 30 λεπτά στους 37^{0}C με υγρασία.
iv. Ακολουθούν δύο δεκάλεπτες πλύσεις με PBS και μια με νερό.
v. Ξήρανση.

vi. Τα φθορίζοντα αντισώματα αραιώνονται (1/300) με τη βοήθεια μίγματος Blue Evans και PBS.

vii. 20μl κάθε αραίωσης τοποθετούνται στις υποδοχές των αντικειμενοφόρων πλακών.

viii. Η πλάκα επωάζεται για 30 λεπτά στους 37^0C με υγρασία.

ix. Ακολουθούν δύο δεκάλεπτες πλύσεις με PBS και μια με νερό.

x. Ξήρανση

xi. Προστίθενται μερικές σταγόνες γλυκερόλης στις πλάκες και επικαλύπτονται με καλυπτρίδα, αποφεύγοντας τη δημιουργία φυσαλίδων.

xii. Παρατήρηση της πλάκας σε μικροσκόπιο ανοσοφθορισμού.

xiii. Η *R.typhi* και η *Bartonella* henselae φθορίζουν πράσινες.

2.3.2.3. Εξαγωγή Γενετικού υλικού (DNA Extraction)

Τα εκτοπαράσιτα εμβαπτίζονταν για 5 λεπτά σε διάλυμα 70% αιθανόλη/0.2% iodine, και ξεπλύθηκαν 3 φορές με αποσταγμένο νερό. Το κάθε εκτοπαράσιτο συνθλίφθηκε σε ξεχωριστό Eppendorf tube πριν την εξαγωγή του γενετικού υλικού.

Η εξαγωγή του DNA από αίμα γίνεται με τη χρήση του QIAamp DNA Blood Mini kit (QIAGEN, Hilden, Germany). Η εξαγωγή του DNA από τα εκτοπαράσιτα ή ιστούς γίνεται με τη χρήση του QIAamp Tissue Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) σύμφωνα με το πρωτόκολλο της εταιρείας.

2.3.2.4. Έλεγχος με τη μέθοδο Αντίδραση Αλυσιδωτής Πολυμεράσης (PCR)

Είναι εργαστηριακή μέθοδος σύνθεσης νουκλεικών οξέων κατά την οποία αντιγράφεται ένα συγκεκριμένο τμήμα του DNA. Η μέθοδος περιλαμβάνει δύο ολιγονουκλεοτιδικούς εναρκτές οι οποίοι προσδένονται στα άκρα του τμήματος του

DNA που θα αντιγραφεί και από επαναλαμβανόμενους κύκλους πολλαπλασιασμού του DNA. Ο κάθε κύκλος περιλαμβάνει τα ακολουθα στάδια:

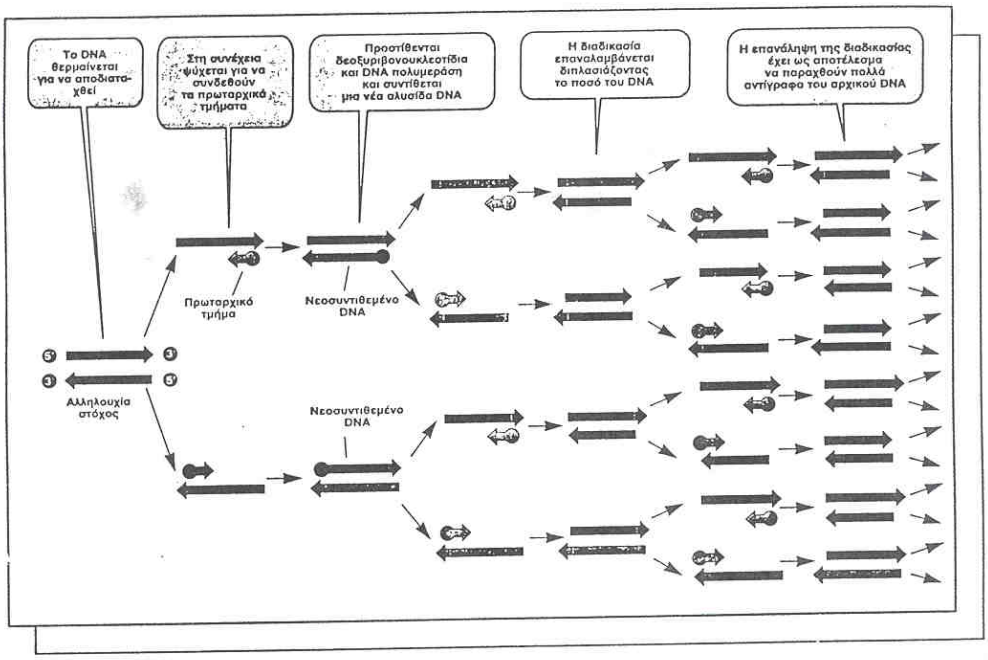
1) Θερμική μετουσίωση του DNA, η οποία επιτρέπει την αποδιάταξη του δίκλωνου μορίου του DNA

2) Προσαρμογή των εναρκτών με την αλληλουχία-στόχο του DNA σε χαμηλή θερμοκρασία

3) Επιμήκυνση των εναρκτών με την επίδραση της Taq πολυμεράσης και σύνθεση των συμπληρωματικών αλυσίδων του DNA με προσαρμογή των συμπληρωματικών βάσεων.

Στο τέλος κάθε κύκλου η ποσότητα του έχει πολλαπλασιαστεί με τον παράγοντα 2 : μετά από ν κύκλους έχει πολλαπλασιαστεί κατά 2^{ν}, δηλαδή πάνω από 10^9 μετά από 30-35 κύκλους, ένας αριθμός που χρησιμοποιείται συχνά [Εικόνα 24].

Η μέθοδος της PCR χρησιμοποιήθηκε για την άμεση ανίχνευση *Rickettsia* sp , *Bartonella* sp. στο αίμα και /ή στους ιστούς των θηλαστικών-ξενιστών (τρωκτικά,



Εικόνα 24. Σχηματική απεικόνιση της τεχνικής PCR. Το δίκλωνο DNA που έχει το τμήμα που θέλουμε να πολλαπλασιάσουμε τοποθετείται υπό μορφή διαλύματος στον δοκιμαστικό σωλήνα μαζί με τα ολιγονουκλεοτίδια, ελεύθερα δεοξυριβονουκλεοτίδια, DNA πολυμεράση και ιχνοστοιχεία που κάνουν την πολυμεράση πιο αποδοτική.

γάτες) καθώς επίσης και στα αρθρόποδα (ψύλλοι). Για τον γενωμικό πολλαπλασιασμό χρησιμοποιήθηκαν εναρκτές ειδικοί για κάθε παθογόνο παράγοντα.

Για το γενωμικό πολλαπλασιασμό ρικετσιακού DNA ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία: Ο έλεγχος των δειγμάτων έγινε με τη χρήση των παρακάτω εναρκτών

- 1° ζεύγος εναρκτών: RpCS.877p (GGGGGCCTGCTCACGGCGG) και RpCS.1258n., (ATTGCAAAAAGTACAGTGAAC) οι οποίοι κωδικοποιούν μια αλληλουχία 381 ζευγαριών βάσεων του γενώματος της κιτρικής συνθετάσης (gltA gene) της *R.prowazekii*, και ανιχνεύουν κάθε είδος ρικέτσιας (Anderson *et al.* 1987; Anderson 1990; Webb *et al.* 1990).

Στα δείγματα που βρέθηκαν θετικά με τον πρώτο πολλαπλασιασμό, έγινε στη συνέχεια ανίχνευση ρικετσιών με ένα δεύτερο ζευγάρι εναρκτών

- 2° ζεύγος εναρκτών : (εναρκτής 1, GCTCTTGCAACTTCTATGTT, και εναρκτής 2, CATTGTTCGTCAGGTTGGCG), οι οποίοι πολλαπλασιάζουν μια αλληλουχία 434 ζευγαριών βάσεων του γενώματος του 17-kDa αντιγόνου της *R. rickettsii*. (Anderson *et al.* 1987; Anderson and Tzianabos 1989; Adams *et al.* 1990; Webb *et al.* 1990).

Με τους παραπάνω εναρκτές πολλαπλασιάζεται ένα τμήμα του DNA των : *R. rickettsii, R.conorii, R.prowazekii, R.typhi*,των οποίων η αλληλουχία βάσεων παρουσιάζει σημαντική ομοιότητα (Roux *et al.* 2000). Για επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων των θετικών PCR, χρησιμοποιήθηκε ένα τρίτο ζεύγος εναρκτών.

- 3° ζεύγος εναρκτών: 120-M59' (5'-CCGCAGGRTTGGTAACTGC-3') and 120–807' (5'-CCTTTTAGATTACCRCCTAA-3') που πολλαπλασιάζουν ειδικά μια αλληλουχία (833-bp fragment) του γονιδίου (ompB) που κωδικοποιεί την OmpB μεμβρανική πρωτεΐνη κάποιων ειδών ρικέτσιας (Norman *et al.* 1995).

Για το γενωμικό πολλαπλασιασμό *Bartonella* sp DNA χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω ζεύγη εναρκτών:

- 1° ζεύγος εναρκτών: BhCS.781p and BhCS.1137n, που πολλαπλασιάζουν ειδικά ένα τμήμα 339-bp του *glt*A γονιδίου σε *Bartonella* species (Foucault *et al.* 2005).
- 2° ζεύγος εναρκτών : URBARTO.1 URBARTO.2 (its gene) που πολλαπλασιάζουν την intergenic spacer (ITS) region ανάμεσα στα 16S και 23S rRNA γονίδια (Parola *et al.* 2003).
- 3° ζεύγος εναρκτών: HSPF1d και BbHS1630.n που πολλαπλασιάζουν ειδικά μια αλληλουχία του γονιδίου groEL, και
- 4° ζεύγος εναρκτών: PAPn1 και PAPn2 που πολλαπλασιάζουν ειδικά τμήμα του γονιδίου που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη pap 31 (31-kDa major protein).

Σε όλους τους πολλαπλασιασμούς εκτός των δειγμάτων, συστηματικά χρησιμοποιείται ένας αρνητικός και ένας θετικός μάρτυρας. Σε κάθε περίπτωση, η επιτυχία του γενωμικού πολλαπλασιασμού, επιβεβαιώθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης. Ελήφθησαν όλα τα απαραίτητα μέτρα προς αποφυγή επιμολύνσεων της PCR.

Οι αλληλουχίες των εναρκτών που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη φαίνονται στον πίνακα 9.

Πίνακας 9. Αλληλουχία των εναρκτών που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη**.**

Εναρκτές	Αλληλουχία (ζευγάρια βάσεων)	
***Bartonella* sp**		
HSPF1d - BbHS1630.n	5′-GAACTNGAAGATAAGTTNGAA-3′ 5′-AATCCATTCCGCCCATTC-3′	Heatshock protein–encoding gene (groEL) All *Bartonella* sp
PAPn1- PAPn2	5′-TTCTAGGAGTTGAAACCGAT-3′ 5′-GAAACACCACCAGCAACATA-3′	pap31 (31-kDa major protein) *B.henselae* και *B.quintana*
URBARTO.1- URBARTO.2	5'-CTTCGTTTCTCTTTCTTCAA-3' 5'-CTTCTCTTCACAATTTCAAT-3'	16S-23S ribosomal DNA ITS gene
***Rickettsia* sp**		
RpCS.877p - RpCS.1258n	5'- GGGGGCCTGCTCACGGCGG-3' 5'-ATTGCAAAAAGTACAGTGAAC-3'	GltA gene(citrate synthase)
120-M59- 120–807	5'-CCGCAGGRTTGGTAACTGC-3' 5'-CCTTTTAGATTACCRCCTAA-3'	rOmpB (*Rickettsia*l outer membrane protein B) gene
	5'-GCTCTTGCAACTTCTATGTT-3' 5'-CATTGTTCGTCAGGTTGGCG-3'	17-kDa αντιγόνο-gene

2.3.2.4.1. Υλικά

1. θάλαμος νηματικής ροής
2. συσκευή PCR θερμοκυκλωτή (Perkin Elmer)
3. στείρα μικροσωληνάρια
4. θήκη μικροσωληναρίων
5. ρυθμιζόμενες μικροπιπέτες αποκλειστικής χρήσης για PCR
6. ρύγχη μικροπιπετών
7. Taq πολυμεράση (5000U/ml, USB)
8. Mg-free ρυθμιστικό διάλυμα (10x) για την Taq πολυμεράση
9. $MgCl_2$
10. νουκλεοτίδια με τα ανάλογα ρυθμιστικά διαλύματα (dNTPs)
11. ολιγονουκλεοτιδικοί εναρκτές
12. αρνητικό control
13. θετικό control
14. υπό εξέταση δείγματα (ψύλλοι - αίμα υποδόχων)

Διατήρηση των υλικών 7-14 στους -20^{0}C

15. στείρο απεσταγμένο νερό

2.3.2.4.2. Πρωτόκολο

Ολοι οι χειρισμοί γίνονται σε θάλαμο νηματικής ροής με υλικά και αντιδραστήρια αποκλειστικής χρήσης, ώστε να μειωθεί ο κίνδυνος μόλυνσης από εξωγενές DNA.

1. Τοποθέτηση των μικροσωληναρίων στη θήκη και σήμανση τους.
2. Προετοιμασία του μείγματος αντίδρασης:
   1μM από κάθε Primer, 100μM από κάθε dATP, dCTP, dGTP, dTTP,
   1,3 mM MgCl2 και 0,05 μονάδες Taq DNA πολυμεράση.
3. Οι σωλήνες τοποθετούνται στη συσκευή του RCR.
4. Οι συνθήκες του ενισχυτικού πολλαπλασιασμού εξαρτάται από την αλληλουχία των νουκλεοτιδίων που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί. Για το γονίδιο της κιτρικής συνθετάσης (εναρκτές RpCS 877p και RpCS 1258n) εφαρμόστηκε πρόγραμμα 30 κύκλων.

Κάθε κύκλος περιελάμβανε 3 στάδια	
Στάδιο 1 : Θερμική μετουσίωση :	95^{0}C για 20 δευτερόλεπτα
Στάδιο 2 : Προσαρμογή των εναρκτών:	48^{0}C για 30 δευτερόλεπτα
Στάδιο 3 : Επέκταση :	60^{0}C για 2 λεπτά

Για τον ενισχυτικό πολ/σμό της αλληλουχίας νουκλεοτιδίων του γονιδίου που κωδικοποιεί την 17kDa πρωτεΐνη εφαρμόστηκε πρόγραμμα 35 κύκλων.

Κάθε κύκλος περιελάμβανε 3 στάδια	
Στάδιο 1 : Θερμική μετουσίωση :	94^0C για 30 δευτερόλεπτα
Στάδιο 2 : Προσαρμογή των εναρκτών:	57^0C για 2 λεπτά
Στάδιο 3 : Επιμήκυνση:	70^0C για 2 λεπτά

5. Στο τέλος του γενωμικού πολ/σμού, τα προιόντα διατηρούνται στους 4^oC μέχρι να επιβεβαιωθεί η επιτυχία του πολ/σμού με την ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης.

2.3.2.5. Ηλεκτροφόρηση DNA – Εξαγωγη DNA από Πηκτή Αγαρόζης

Το μέγεθος του πολλαπλασιασθέντος τμήματος ανιχνεύεται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1,5% και χρωματίζεται με βρωμιούχο αιθίδιο. Σε όλους τους πολλαπλασιασμούς, εκτός των δειγμάτων, συστηματικά χρησιμοποιείται αρνητικός μάρτυρας και θετικός μάρτυρας. Τα προϊόντα καθαρίστηκαν χρησιμοποιώντας το kit καθαρισμού QIAquick (Qiagen) και ακολουθόντας το πρωτόκολο της εταιρείας πριν από την ανάλυση για την ταυτοποίηση αλληλουχιών.

2.3.2.5.1. Υλικά

- Φούρνος μικροκυμάτων
- Ζυγός
- Πιπέτες
- Πηγή φωτός UV
- Φωτογραφική συσκευή
- Αγαρόζη ηλεκτροφόρησης
- Βρωμιούχο αιθίδιο
- Διάλυμα χρωστικής (loading buffer) 6x: κυανό της βρωμοφαινόλης 0,25% κυανό του ξυλενίου 0,25% γλυκερίνη 30% νερό qsp
- Ρυθμιστικό διάλυμα TAE 50X: 242 gr Tris-Base, 57,1 ml glacial acetic acid, 100 ml 0,5 M EDTA (pH8) νερό qsp 1lt.
- Διάλυμα ηλεκτροφόρησης TAE 1X και βρωμιούχο αιθίδιο 0,5μg/ml
- Δείκτες μοριακού βάρους DNA (molecular weight marker)
- ΦΧ174/Hinf I ή ΦΧ174/Hae III.

2.3.2.5.2. Πρωτοκολο

1. Προετοιμάζεται το διάλυμα αγαρόζης 2% σε ΤΑΕ 1Χ (η αγαρόζη διαλυτοποιείται με βρασμό)
2. Προστίθεται βρωμιούχο αιθίδιο 0,5μg/ml και το διάλυμα αγαρόζης τοποθετείται στο εκμαγείο της συσκευής ηλεκτροφόρησης όπου αφήνεται να πήξει.
3. Το πήκτωμα τοποθετείται στην συσκευή ηλεκτροφόρησης, στην οποία έχει προστεθεί το διάλυμα ηλεκτροφόρησης και αφαιρείται προσεκτικά η χτένα.
4. Τοποθετούνται 10μl του προιόντος της PCR σε 2 μl χρωστικής και στη συνέχεια μεταφέρονται στα πηγάδια της πηκτής.
5. Μετά από μία ώρα τρεξίματος στα 100 volts, η πηκτή τοποθετείται σε πηγή υπεριώδους ακτινοβολίας (Regnery *et al.* 1991). Φωτογραφίζεται για την παρατήρηση των αποτελεσμάτων.

Ο αρνητικός μάρτυρας πρέπει να είναι κενός. Ο θετικός μάρτυρας πρέπει να περιέχει την χαρακτηριστική μπάντα των εναρκτών που χρησιμοποιήθηκαν. Κάθε επιτυχημένος πολ/σμός εμφανίζει όμοια μπάντα μ' αυτήν του θετικού μάρτυρα.

2.3.2.6. Ταυτοποίηση των υπό μελέτη παθογόνων με τη μέθοδο PCR-RFLP [Restriction fragment length polymorphism] (Anderson and Tzianabos 1989; Tzianabos *et al.* 1989)

Στα προϊόντα PCR από το θετικό μάρτυρα (στέλεχος αναφοράς *R.typhi*-Wilmington strain) αντίστοιχα για κάθε πολλαπλασιασμό γινόταν επίδραση με τα ίδια περιοριστικά ένζυμα [Εικόνα 25]. Μετά την ηλεκτροφόρηση σε πηκτή ακρυλαμίδης γίνεται η σύγκριση των κατατομών των τμημάτων του DNA μ' εκείνη των στελεχών αναφοράς. Θετικό PCR με 17-kDa συνεπάγεται ότι ανήκει στο γένος *Rickettsia* (Serratrice *et al.* 2003) (Uhlen *et al.* 1989).

2.3.2.6.1. Υλικά

- Περιοριστικά ένζυμα με τα αντίστοιχα ρυθμιστικά διαλύματα (BioLabs, New England, MA, USA).
- Υδατόλουτρο
  Όλοι οι χειρισμοί γίνονται μέσα σε πάγο.

2.3.2.6.2. Πρωτοκολο

1. Προετοιμασία του διαλύματος αντίδρασης:

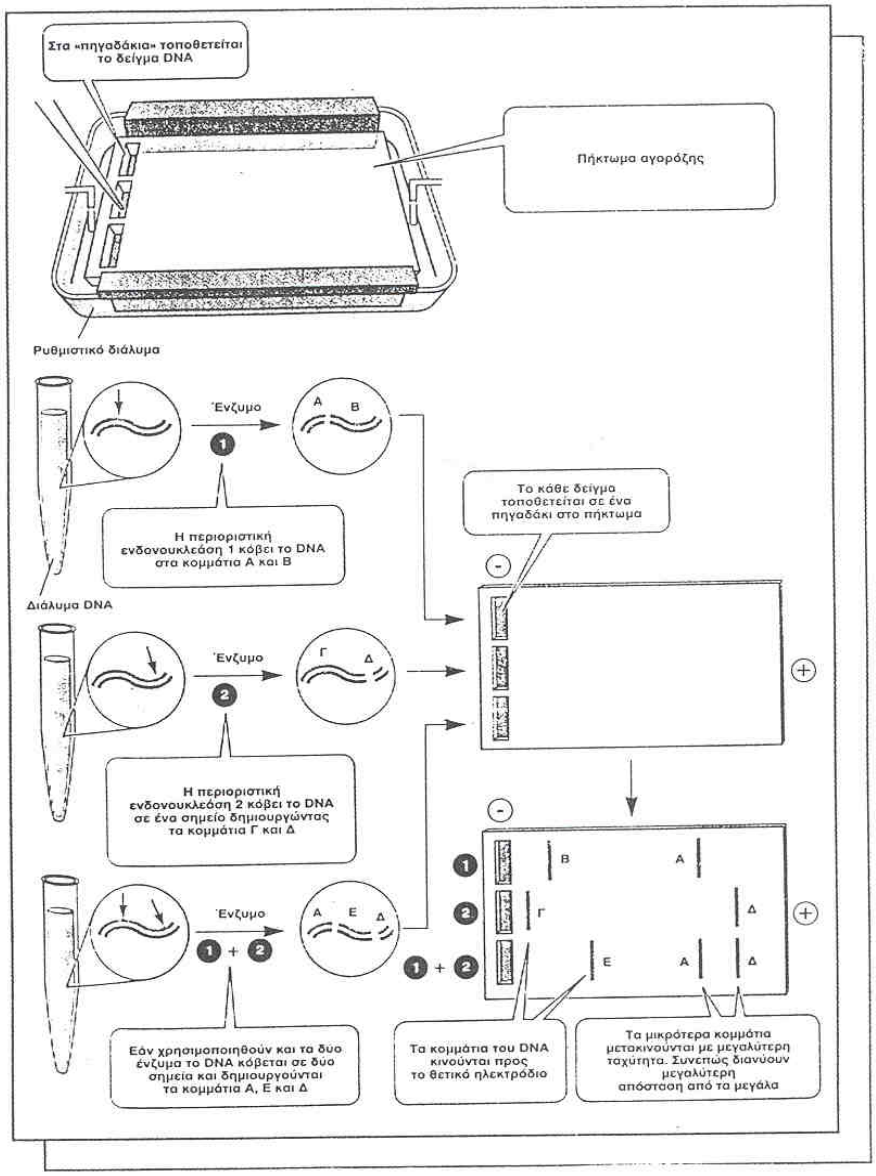
   περιοριστικό ένζυμο 1,0 μl

   αντίστοιχο ρυθμιστικό διάλυμα 2,7 μl

   δείγμα 23,3 μl
2. Το διάλυμα αντίδρασης επωάζεται για 2 ώρες στην κατάλληλη για κάθε ένζυμο θερμοκρασία
3. Τα δείγματα διατηρούνται στους 4^0C, μέχρι την ηλεκτροφόρηση τους με στόχο τη σύγκριση των προφιλ κατατομής των κλασμάτων του DNA.

2.3.2.7. Ταυτοποίηση των υπό μελέτη παθογόνων με τη μέθοδο *PCR- Sequencing analysis*.

Ο προσδιορισμός της αλληλουχίας (sequencing) του DNA είναι η απόλυτη μέθοδος αναγνώρισης των διαφορών που παρουσιάζονται μεταξύ των στελεχών ενός μικροοργανισμού, και της σύμφωνα με αυτές ταξινόμησής τους. Για το σκοπό αυτό, γίνεται ο προσδιορισμός της αλληλουχίας των βάσεων DNA – προιόντος του PCR σε συσκευή προσδιορισμού αλληλουχιών (sequencer). Με τον τρόπο αυτό, γίνεται δυνατή η ακριβής τυποποίηση και ταυτοποίηση των στελεχών και η επακόλουθη ταξινόμησή τους. Τα προϊόντα του PCR που έδωσαν θετικό αποτέλεσμα αφαιρέθηκαν και καθαρίστηκαν απο την πηκτή με την χρήση του QIAquick Spin PCR purification kit (Qiagen, Valencia, CA) όπως περιγράφει το πρωτόκολο της εταιρείας. Τα προϊόντα ελέχθηκαν απο το μηχάνημα automated sequencer ABI 3100



Εικόνα 25. Σχηματική απεικόνιση της τεχνικής RFLP.

Genetic Analyzer της Applied Biosystems και τα αποτελέσματα εξετάστηκαν με την χρήση της βάσης δεδομένων GenBank το εργαλείο βιοπληροφορικής BLAST program (version 2.0, National Center for Biotechnology Information, URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)

2.3.3. Στατιστική ανάλυση

Πιθανοί συσχετισμοί μεταξύ δυαδικών (συνδιασμός επιδημιολογικών και γεωγραφικών παραγόντων) και ονομαστικών μεταβλητών ελέχθηκαν με την χρήση του chi-squared test, ή του Fisher's exact test όπου οι αναμενόμενες συχνότητες ήταν μικρές. Οι αποκλίσεις απο τον μέσο όρο ελέχθηκαν με την χρήση του νον-parametric Mann-Whitney test. Το επίπεδο συμαντικότητας ήταν το 1%, αρα όλες οι τιμές οπου p-values<0.01, θεωρήθηκαν στατιστικά συμαντικές. Ακολούθως έγινε multivariable unconditional logistic regression analysis για τον καθορισμό πιθανών δεικτών οροθετικότητας για καθε ενα απο τα παθογόνα και η κάθε περιοχή χαρακτηρίστηκε υψηλού (f>0.25), χαμηλού (0<f</0.25) ή μηδενικού κινδύνου (f=0). Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε σταδιακή διαδικασία με p-in = p-out = 0.05 για τους προγνώστες που βρέθηκαν να είναι στατιστικά σημαντικοί απο την μονοπαραγοντική ανάλυση. Για την όλη ανάλυση χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πακέτο SPSS v14.0.

2.3.4. Μηχανογραφημένη Χαρτογράφηση

Για τη χαρτογράφηση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε σύστημα γεωγραφικής ανάλυσης. Έγινε εισαγωγή του χάρτη της Κύπρου σε Η/Υ. Η ελεύθερη Κύπρος στο χάρτη χωρίστηκε σε διοικητικές επαρχίες και περιέλαβε όλα τα χωριά της Κύπρου. Οι περιοχές προέλευσης των τρωκτικών, μαζί με όλα τα σχετικά επιδημιολογικά στοιχεία της περιοχής, τοποθετήθηκαν σε βάση δεδομένων που συνδέθηκε με χάρτες στο πρόγραμμα GIS για περαιτέρω ανάλυση. Με τη βοήθεια του προγράμματος αυτού έγινε συσχετισμός των αποτελεσμάτων της έρευνας με επιδημιολογικούς και γεωγραφικούς παράγοντες και αξιολόγηση των αποτελεσμάτων του έργου για προσδιορισμό του μεγέθους του κινδύνου, για την ανθρώπινη και ζωική υγεία, από κάθε παράγοντα.

Πιο συγκεκριμένα:

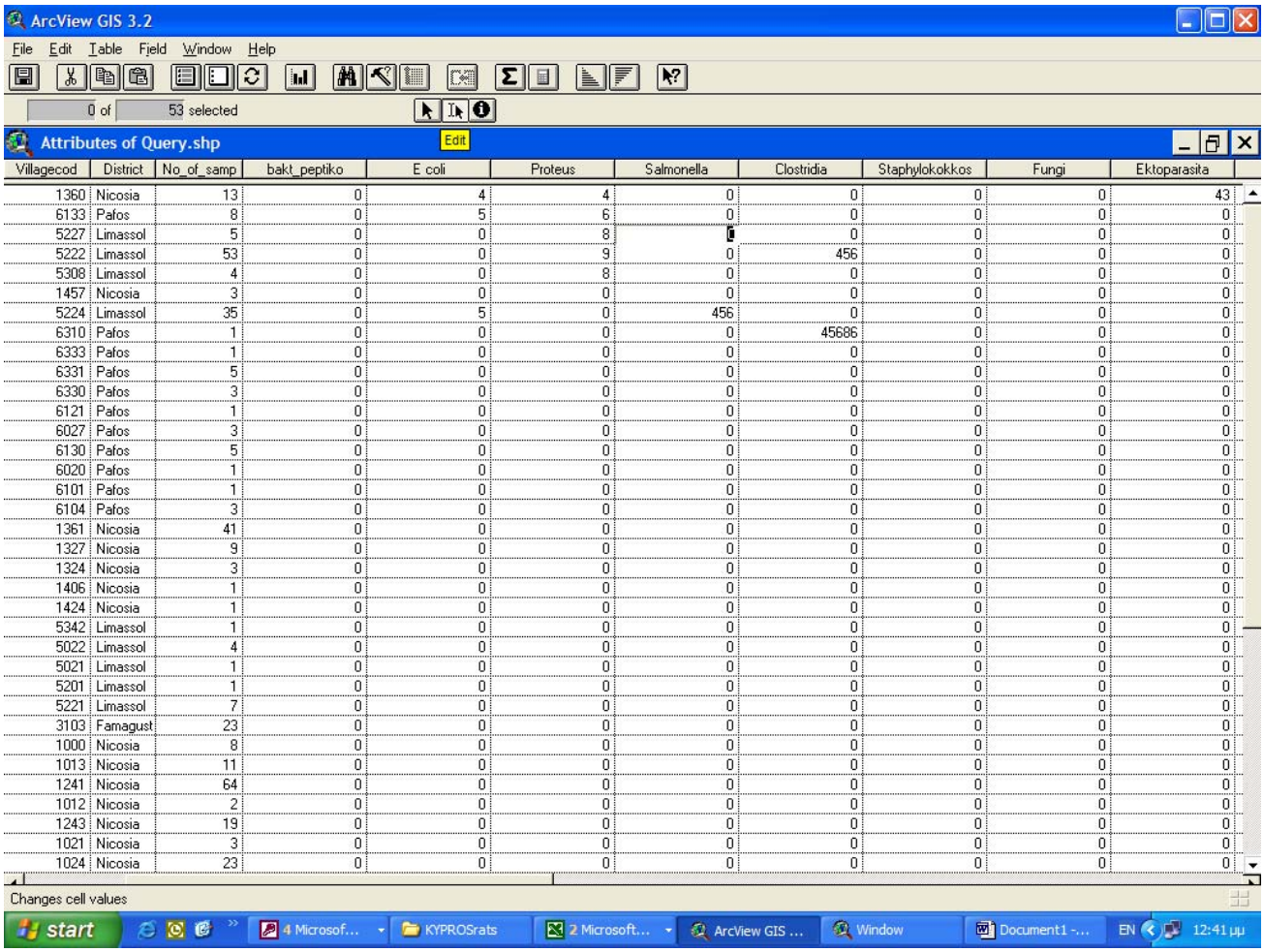
Δημιουργήθηκαν και συμπληρώθηκαν μηχανογραφημένων ερωτηματολόγια to record information on each animal and all data were stored electronically on e-

cards using the ACCESS program. Δημιουργήθηκε βάση δεδομένων για καταχώρηση των αποτελεσμάτων του εργαστηριακού ελέγχου

2.3.5. Καταχώρηση και ανάλυση των αποτελεσμάτων - Δημιουργία βάσης δεδομένων

Για κάθε ζώο κατά τη δειγματοληψία συμπληρώθηκε δελτίο με στοιχεία για την ημερομηνία συλλήψης, το είδος του ζώου, το φύλο του, την ηλικία του, την περιοχή σύλλήψης, η κατάσταση υγείας του ζώου αν παρουσιάζει συμπτώματα, αν παρασιτείται από εκτοπαράσιτα, ποιος ο αριθμός των εκτοπαρασίτων που του αφαιρέθηκαν. Αυτές οι πληροφορίες για κάθε τρωκτικό που συνελήφθη καταχωρήθηκαν σε βάση δεδομένων. Στην ίδια βάση καταχωρήθηκαν τα αποτελέσματα του εργαστηριακού ελέγχου.

Για κάθε ζώο δημιουργήθηκε ηλεκτρονική κάρτα με όλες τις πληροφορίες που αφορούν το ζώο, με τις εξετάσεις και τα αποτελέσματα που πραγματοποιήθηκαν για κάθε ζώο και τυχόν παρατηρήσεις που αφορούν το ζώο αυτό. Η εισαγωγή των στοιχείων γινόταν όπως αυτά συλλέγονταν και με την ολοκλήρωση κάθε εξέτασης. Το στατιστικό πρόγραμμα και αυτό του Συστήματος GIS αναπτύσσεται σε Microsoft Access σε σύνδεση με το ArcView V8.1 [Πίνακας 10].



ArcView GIS 3.2

File Edit Table Field Window Help

0 of 53 selected

Attributes of Query.shp

Edit

Villagecod	District	No_of_samp	bakt_peptiko	E coli	Proteus	Salmonella	Clostridia	Staphylokokkos	Fungi	Ektoparasita
1360	Nicosia	13	0	4	4	0	0	0	0	43
6133	Pafos	8	0	5	6	0	0	0	0	0
5227	Limassol	5	0	0	8	0	0	0	0	0
5222	Limassol	53	0	0	9	0	456	0	0	0
5308	Limassol	4	0	0	8	0	0	0	0	0
1457	Nicosia	3	0	0	0	0	0	0	0	0
5224	Limassol	35	0	5	0	456	0	0	0	0
6310	Pafos	1	0	0	0	0	45686	0	0	0
6333	Pafos	1	0	0	0	0	0	0	0	0
6331	Pafos	5	0	0	0	0	0	0	0	0
6330	Pafos	3	0	0	0	0	0	0	0	0
6121	Pafos	1	0	0	0	0	0	0	0	0
6027	Pafos	3	0	0	0	0	0	0	0	0
6130	Pafos	5	0	0	0	0	0	0	0	0
6020	Pafos	1	0	0	0	0	0	0	0	0
6101	Pafos	1	0	0	0	0	0	0	0	0
6104	Pafos	3	0	0	0	0	0	0	0	0
1361	Nicosia	41	0	0	0	0	0	0	0	0
1327	Nicosia	9	0	0	0	0	0	0	0	0
1324	Nicosia	3	0	0	0	0	0	0	0	0
1406	Nicosia	1	0	0	0	0	0	0	0	0
1424	Nicosia	1	0	0	0	0	0	0	0	0
5342	Limassol	1	0	0	0	0	0	0	0	0
5022	Limassol	4	0	0	0	0	0	0	0	0
5021	Limassol	1	0	0	0	0	0	0	0	0
5201	Limassol	1	0	0	0	0	0	0	0	0
5221	Limassol	7	0	0	0	0	0	0	0	0
3103	Famagust	23	0	0	0	0	0	0	0	0
1000	Nicosia	8	0	0	0	0	0	0	0	0
1013	Nicosia	11	0	0	0	0	0	0	0	0
1241	Nicosia	64	0	0	0	0	0	0	0	0
1012	Nicosia	2	0	0	0	0	0	0	0	0
1243	Nicosia	19	0	0	0	0	0	0	0	0
1021	Nicosia	3	0	0	0	0	0	0	0	0
1024	Nicosia	23	0	0	0	0	0	0	0	0

Changes cell values

start 4 Microsof... KYPROSrats 2 Microsoft... ArcView GIS ... Window Document1 -... EN 12:41 μμ

ΠΙΝΑΚΑΣ 10. Οι περιοχές προέλευσης των τρωκτικών, μαζί με όλα τα σχετικά επιδημιολογικά στοιχεία της περιοχής, τοποθετήθηκαν σε βάση δεδομένων που συνδέθηκε χάρτες στο πρόγραμμα GIS για περαιτέρω ανάλυση

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. ΜΕΛΕΤΗ ΣΕ ΘΗΛΑΣΤΙΚΑ-ΞΕΝΙΣΤΕΣ

3.1.1. Οροεπιδημιολογική μελέτη

Σε μια χρονική περίοδο 24 μηνών, έγινε σύλληψη 625 τρωκτικών. 496 δείγματα αίματος από τα παραπάνω ζώα ελέγχθηκαν για την ανίχνευση αντισωμάτων έναντι της *R.typhi*, και 494 ελέγχθηκαν για την ανίχνευση αντισωμάτων έναντι της της *B.henselae*. Ο ορολογικός έλεγχος έγινε με τη μέθοδο του έμμεσου ανοσοφθορισμού Μελετήθηκε η διασπορά των ειδών των τρωκτικών και των παθογόνων που μεταφέρουν, και εντοπίστηκαν οι ενδημικές περιοχές για κάθε παθογόνο και των περιοχών υψηλού κινδύνου για τον άνθρωπο. Τα αποτελέσματα της έρευνας έχουν ως εξής:

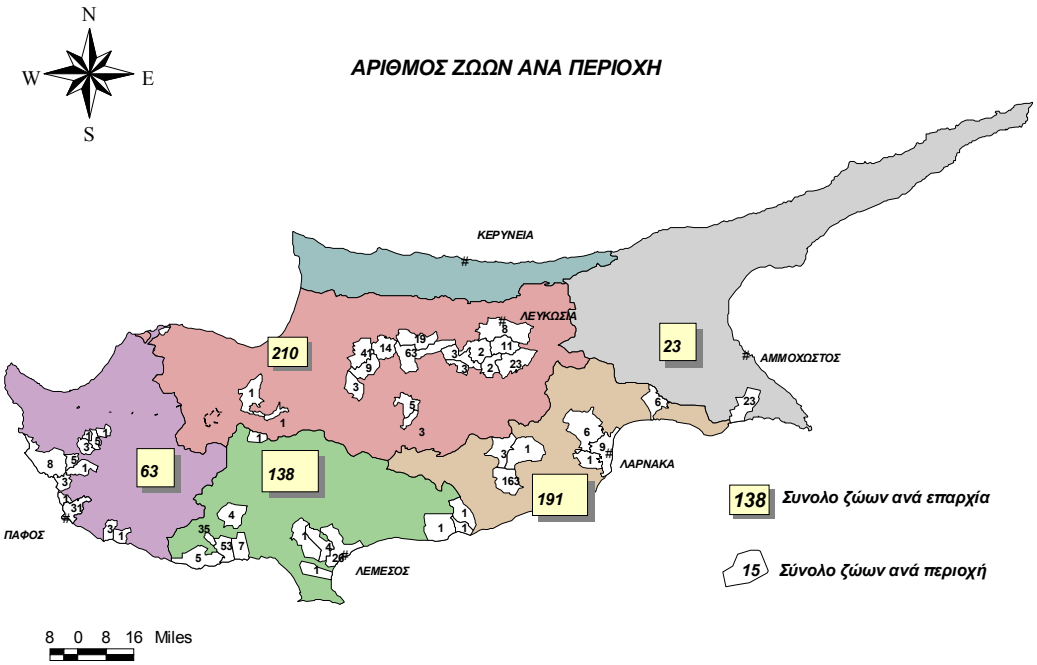
3.1.1.1. Αποτελέσματα στα τρωκτικά

Η δειγματοληψία περιέλαβε 51 περιοχές κατανεμημένες και στις 5 επαρχίες της ελεύθερης Κύπρου. Η γεωγραφική κατανομή τους ανά περιοχή δειγματοληψίας φαίνεται στο χάρτη 1. Στον πίνακα 11 (επεξήγηση κωδικών του χάρτη) φαίνεται αναλυτικά ο αριθμός των τρωκτικών και οι περιοχές στις οποίες έγινε η παγίδευση τους (Περιοχές δειγματοληψίας).

Πίνακας 11 : Περιοχές δειγματοληψίας

ΚΩΔΙΚΟΣ ΕΤΙΚΕΤΑΣ ΧΑΡΤΗ	ΟΝΟΜΑ	ΚΩΔΙΚΟΣ ΠΕΡΙΟΧΗΣ	ΕΠΑΡΧΙΑ	ΣΥΝΟΛΟ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ
1	Ακάκι	1360	Λευκωσία	13
2	Πέγια	6133	Πάφος	8
3	Πισσούρι	5227	Λεμεσός	5
4	Αυδήμου	5222	Λεμεσός	53
5	Πάχνα	5308	Λεμεσός	4
7	Αγιος Θωμάς	5224	Λεμεσός	35
8	Σίμου	6310	Πάφος	1
9	Μηλιού	6333	Πάφος	1
10	Γιόλου	6331	Πάφος	5
11	Θελέτρα	6330	Πάφος	3
12	Κίλη	6121	Πάφος	1
13	Κισσόνεργα	6027	Πάφος	3
14	Ακούρσος	6130	Πάφος	5
15	Χλώρακας	6020	Πάφος	1
16	Μανδριά	6101	Πάφος	1
17	Τίμη	6104	Πάφος	3
18	Περιστερώνα	1361	Λευκωσία	41
19	Ορούντα	1327	Λευκωσία	9
20	Αγία Μαρίνα	1324	Λευκωσία	3
21	Γαλάτα	1406	Λευκωσία	1
22	Καλοπαναγιώτης	1424	Λευκωσία	1
23	Πρόδρομος	5342	Λεμεσός	1
24	Πολεμίδια	5022	Λεμεσός	4
25	Ύψωνας	5021	Λεμεσός	1
26	Ασώματος	5201	Λεμεσός	1
27	Παραμάλι	5221	Λεμεσός	7
28	Σωτήρα	3103	Αμμόχωστος	23
29	Λευκωσία	1000	Λευκωσία	8
30	Αγλαντζιά	1013	Λευκωσία	11
31	Παλιομέτοχο	1241	Λευκωσία	63
32	Στρόβολος	1012	Λευκωσία	2
33	Κοκκινοτριμιθιά	1243	Λευκωσία	19
34	Λακατάμια	1021	Λευκωσία	3
35	Γέρι	1024	Λευκωσία	23
36	Λάτσια	1023	Λευκωσία	2
37	Κάτω Πύργος	1457	Λευκωσία	3
38	Κλήρου	1209	Λευκωσία	5
39	Πύργα -Σταυροβούνι	4214	Λάρνακα	1
40	Κόρνος	4215	Λάρνακα	3
41	Κοφίνου	4309	Λάρνακα	163
42	Καλαβάσος	4302	Λάρνακα	1
43	Πεντάκομο	5126	Λεμεσός	1
44	Μαρί	4301	Λάρνακα	1
45	Φικάρδου	1205	Λευκωσία	3
46	Ξυλοτύμβου	4105	Λάρνακα	6
47	Λάρνακα	4000	Λάρνακα	9

48	Αραδίππου	4010	Λάρνακα	6
49	Δρομολαξιά	4012	Λάρνακα	1
50	Λεμεσός	5000	Λεμεσός	26
51	Πάφος	6000	Πάφος	31



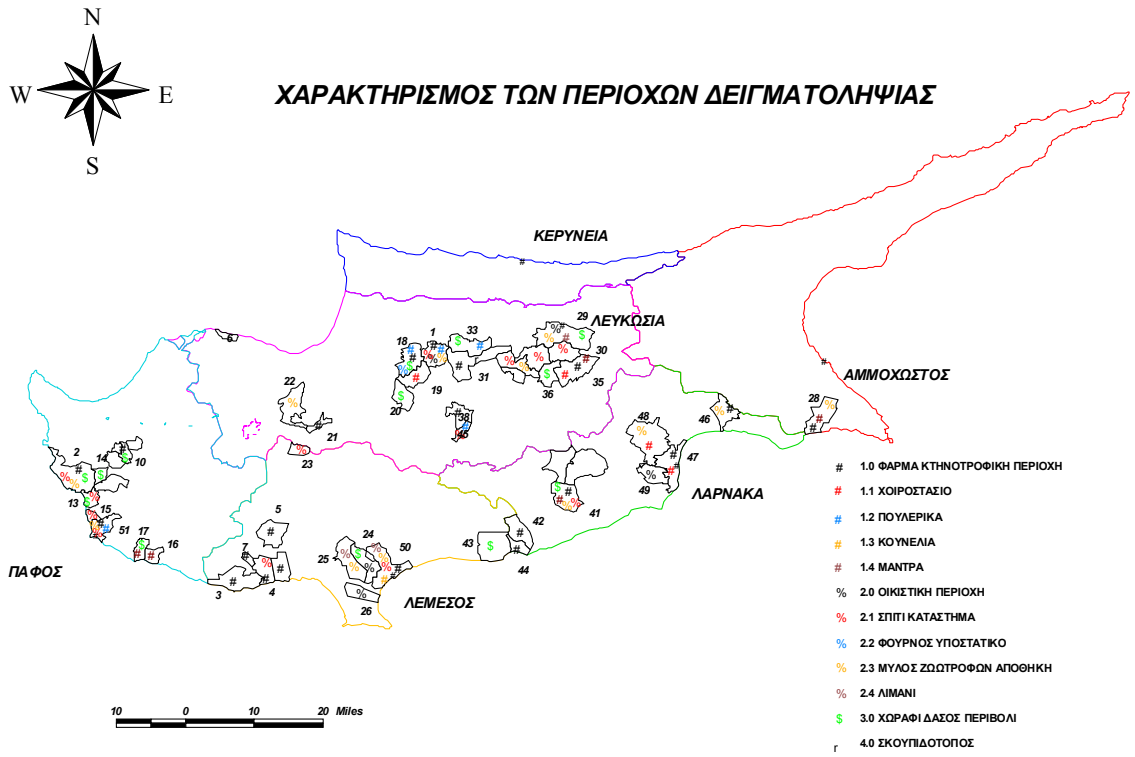
ΧΑΡΤΗΣ 1: Αριθμός ζώων ανα περιοχή.

3.1.1.2. Γεωγραφική κατανομή των τρωκτικών ανά επαρχία

Οι περιοχές προέλευσης ομαδοποιήθηκαν και κωδικοποιήθηκαν σε 4 ομάδες ως εξής: σε τρωκτικά που προέρχονταν από κτηνοτροφική περιοχή (1), από οικιστική περιοχή (2), χωράφι ή περιβόλι (3) και από σκουπιδότοπο (4). Στον πίνακα 12 φαίνεται ο χαρακτηρισμός των περιοχών ανάλογα με τη χρήση γης. Στον χάρτη 2 φαίνονται οι περιοχές δειγματοληψίας και η κατανομή των δειγμάτων ανάλογα με τη γεωγραφική περιοχή, τη χρήσης γης και την κατηγορία υποστατικού.

Πίνακας 12

1.0 Φάρμα, κτηνοτροφική περιοχή	1.1 χοιροστάσιο	1.2 πουλερικά	1.3 κουνέλια	1.4 μάντρα
2.0 οικιστική περιοχή	2.1 οικία, κατάστημα	2.2 φούρνος, υποστατικό	2.3 μύλος ζωοτροφών, αποθήκη	2.4 Λιμάνι
3.0 χωράφι	3.1 ξέδασος	3.2 περιβόλι		
4.0 σκουπιδότοπος				

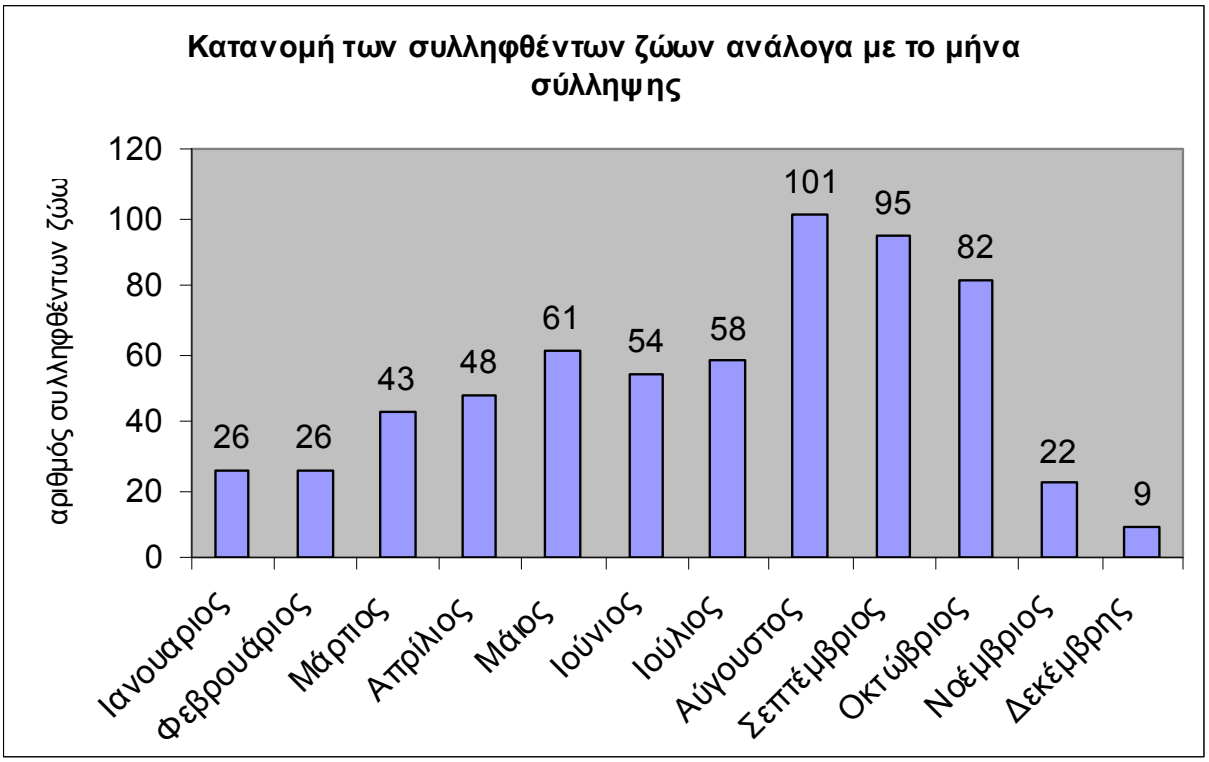


ΧΑΡΤΗΣ 2

Κατανομή των τρωκτικών ανάλογα με τη γεωγραφική περιοχή και τη χρήση γης

Η κατάσταση των ζώων ήταν στα περισσότερα καλή (πίνακας 13) γεγονός που σημαίνει ότι τα παθογόνα που εντοπίστηκαν ελάχιστα επηρεάζουν τη βιωσιμότητα τους (ασυμπτωματικοί φορείς).

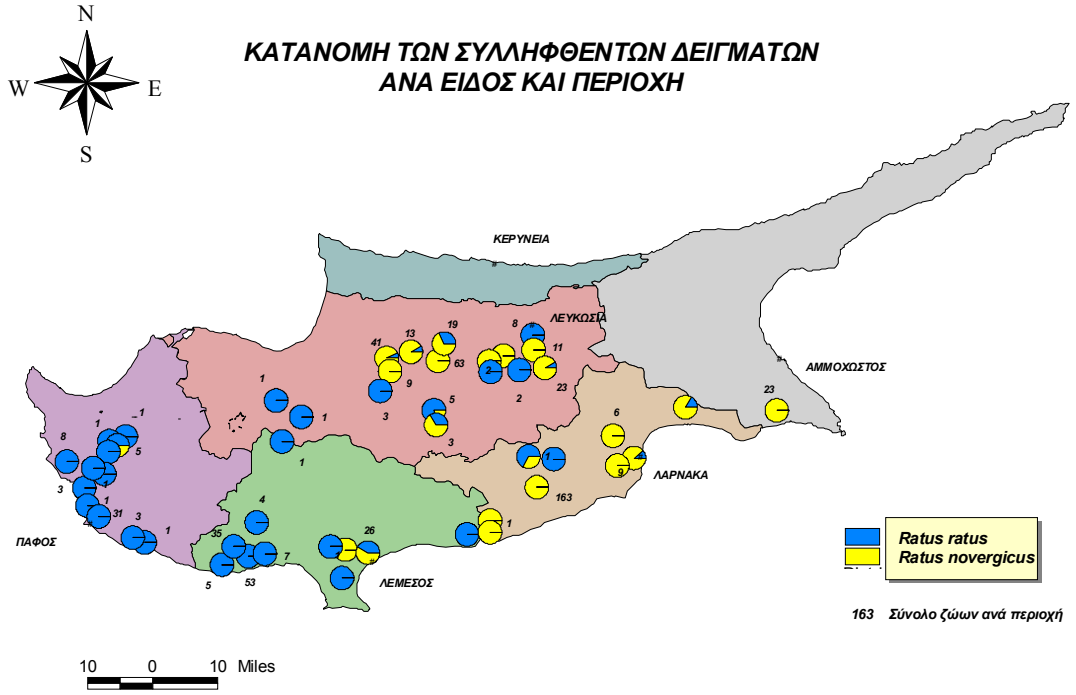
Παρατηρήθηκαν αυξομειώσεις των πληθυσμών των τρωκτικών ανάλογα με την εποχή (μήνας) και το έτος. Εντονότερη παρουσία τρωκτικών παρατηρήθηκε κατά τους θερινούς μήνες (Εικόνα 26). Η σύλληψη μεγαλύτερου αριθμού ζώων έγινε τους μήνες Αύγουστο (101 ζώα), Σεπτέμβρη (95 ζώα) και Οκτώβρη (82 ζώα). Το έτος 2003 παρατηρήθηκαν αυξημένοι πληθυσμοί των τρωκτικών σε σχέση με την προηγούμενη περίοδο.



Εικόνα 26.

Καταγράφηκαν τα εξής είδη τρωκτικών, *Rattus rattus frugivorous, Rattus norvegicous, Mus musculus* . Από τα 625 τρωκτικά, τα 399 ήταν Rattus norvegicus, τα 223 Rattus rattus, και 3 Mus musculus. Παρατηρήθηκαν διαφορές στην

γεωγραφική κατανομή των δυο ειδών *Rattus rattus και Rattus* norvegicus ανά επαρχία, *με το είδος* Rattus rattus να επικρατεί στην επαρχία της Πάφου. Ο αριθμός των συλληφθέντων τρωκτικών ανάλογα με το είδος φαίνεται στον πίνακα 13. Η γεωγραφική κατανομή τους ανάλογα με το είδος φαίνεται στο χάρτη 3. Στον πίνακα 12 φαίνονται συνοπτικά τα χαρακτηριστικά των 622 τρωκτικών (*R. rattus* και *R. norvegicus*). Έχουν εξαιρεθεί τα 3 τρωκτικά του είδους *Mus musculus*



ΧΑΡΤΗΣ 3

Γεωγραφική κατανομή των τρωκτικών ανά επαρχία ανάλογα με το είδος

ΠΙΝΑΚΑΣ 13 : Χαρακτηριστικά των 622 συλληφθέντων τρωκτικών

Χαρακτηριστικό[1]	Αριθμός, n	Ποσοστό, %
Είδος		
Rattus rattus	220	35.4%
Rattus norvegicus	402	64.6%
Φύλο		
Male	293	47.6%
Περιοχή		
Λευκωσία	207	33.3%
Αμμόχωστος	22	3.5%
Λάρνακα	190	30.5%
Λεμεσός	140	22.5%
Πάφος	63	10.1%
Χρήση γης		
1,0	416	66.9%
2,0	8	1.3%
3,0	97	15.6%
4,0	38	6.1%
5,0	63	10.1%
Έτος δειγματοληψίας		
2001	12	1.9%
2002	209	33.7%
2003	399	64.4%
Εποχή		
Άνοιξη	151	24.3%
Καλοκαίρι	212	34.1%
Φθινόπωρο	197	31.7%
Χειμώνας	60	9.6%
Κατάσταση υγείας		
Κακή	11	1.8%
Μέτρια	94	15.1%
Καλή	253	40.7%
Πολύ καλή	234	37.6%
Άριστη	30	4.8%
Παρουσία εκτοπαρασίτων		
	252	40.5%
Κάθε είδους (ticks and fleas)		
Xenopsylla cheopis	189	30.4%
Ctenocephalides felis	75	12.1%
Leptopsylla segnis	17	2.7%
Ctenocephalides canis	2	0.3%
Nosophylla	4	0.6%
Ticks	3	0.5%
	Median (Q5, Q95)	**Mean (Serratrice *et al.* 2003)**
Body weight (g)	218 (39, 462)	242 (145)

[1]The following variables had missing values: sex 7 missing (1.1%), month, year & season sampled 2 (0.3%).

3.1.1.3. Αποτελέσματα ορολογικού ελέγχου στα τρωκτικά

Από τα 496 δείγματα αίματος που ελέγχθηκαν για την ανίχνευση αντισωμάτων έναντι της *R.typhi*, τα 241 (48.6%) εμφάνισαν IgG αντισώματα, σε τίτλους >= 1/60 (τίτλος αντισωμάτων >= 1/60 θεωρήθηκε ως cut-off point). Οι τίτλοι των IgG αντισωμάτων στα οροθετικά ζώα κυμάνθηκαν από 1/60 έως 1/3840. Από τα 494 δείγματα αίματος που ελέγχθηκαν για την ανίχνευση αντισωμάτων έναντι της *B.henselae*, τα 52 (10.5%) εμφάνισαν IgG αντισώματα, σε τίτλους >= 1/60 (τίτλος αντισωμάτων >= 1/60 θεωρήθηκε ως cut-off point). Οι τίτλοι των IgG αντισωμάτων στα οροθετικά ζώα κυμάνθηκαν από 1/60 έως 960.

ΠΙΝΑΚΑΣ 14 : Οροεπιπολασμός της *R.typhi* και της *B.henselae* στα τρωκτικά .

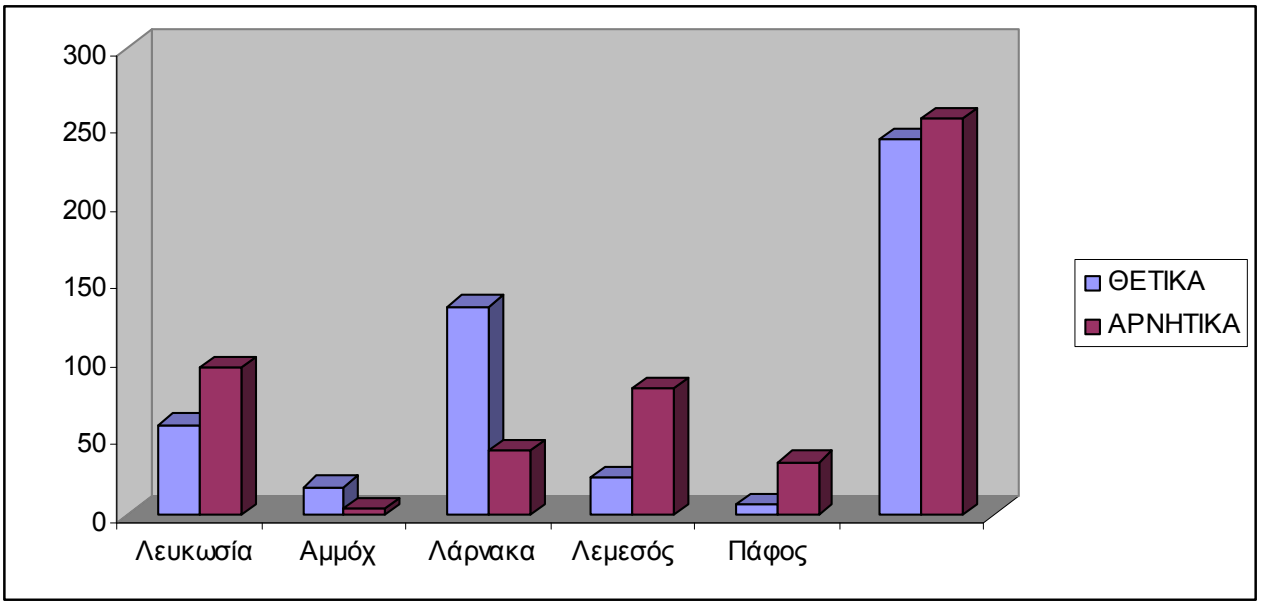
Παθογόνο[1]	**Αριθμός, n**	**Ποσοστό, %**
Bartonella henselae		
Αρνητικά	442	89.5%
Θετικά	52	10.5%
Rickettsia typhi		
Αρνητικά	255	51.4
Θετικά	241	48.6

[1]Frequencies of missing values are as follows: Barto 128 (20.6%), Rick 126 (20.3%), SFG 122 (19.6%).

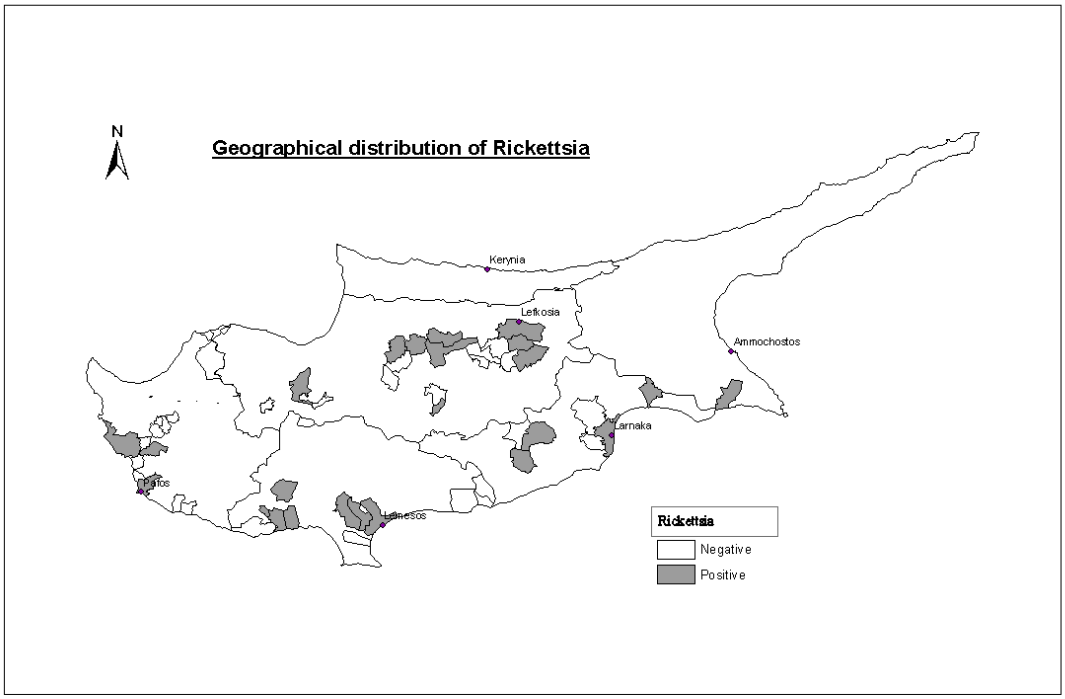
3.1.1.3.1. *Rickettsia typhi*

Παρατηρήθηκε διασπορά των οροθετικών για *R.typhi* ζώων σε όλες τις επαρχίες. Τα υψηλότερα ποσοστά παρατηρήθηκαν στις επαρχίες Λάρνακας και Αμμοχώστου ενώ το χαμηλότερο στην επαρχία Πάφου (Πίνακας 14) Τα

αποτελέσματα ανά επαρχία φαίνονται στον Πίνακα.15 , το Χάρτη 4 και στο Σχήμα 27.



Εικόνα 27. Κατανομή των οροθετικών για *R.typhi* αρουραίων ανά επαρχία



Χάρτης 4: Γεωγραφική διασπορά των οροθετικών για *R.typhi* τρωκτικών ανά επαρχία

Η οροθετικότητα δεν βρέθηκε να σχετίζεται με το φύλο του τρωκτικού. ($p>0.05$). Παρατηρήθηκε άμμεση συσχέτιση της οροθετικότητας για τη *R.typhi* και του είδους του τρωκτικού (chi-squared statistic=66.5 on 1 df, $p<0.0001$) με περισσότερα οροθετικά ζώα του είδους *Rattus norvegicus* (209 observed, 167 expected). Παρατηρήθηκε επίσης άμμεση συσχέτιση της οροθετικότητας για τη *R.typhi* με την περιοχή δειγματοληψίας (chi-squared statistic=115.7 on 4 df, $p<0.0001$), με περισσότερα οροθετικά ζώα στην επαρχία της Λάρνακας (134 observed, 85 expected) και λιγότερα στην περιοχή της Λεμεσού (24 observed, 51 expected). Παρατηρήθηκε συσχέτιση της οροθετικότητας με την εποχή σύλληψης με περισσότερα θετικά ζώα το φθινόπωρο (104 observed, 88 expected) και λιγότερα το χειμώνα και την άνοιξη (5 observed in winter, 17 expected, and 37 observed in spring, 47 expected) (chi-squared statistic=26.6 on 3 df, $p<0.0001$). Το έτος της σύλληψης του τρωκτικού επίσης συσχετίστηκε με την οροθετικότητα. Τα περισσότερα οροθετικά ζώα ήταν τρωκτικά που συνελήφθηκαν το 2003 (192 observed, 164 expected), chi-squared statistic 29.0 on 1 df, $p<0.0001$.

Τα οροθετικά τρωκτικά είχαν μεγαλύτερο βάρος (on average) ($p<0.0001$). Υπήρχε μια στατιστικά σημαντική διαφορά στην οροθετικότητα για τη *R.typhi* μεταξύ των ζώων που παρασιτούνταν από εκτοπαράσιτα σε σύγκριση μ' αυτά στα οποία δεν βρέθηκαν εκτοπαράσιτα. Η παρουσία εκτοπαρασίτων συσχετίστηκε με την οροθετικότητα ($p<0.0001$), και πιο συγκεκριμένα με την παρουσία του ψύλλου *X. cheopis* ($p<0.0001$). Αντίθετα, δεν βρέθηκε συσχέτιση της οροθετικότητας και της παρουσίας των δυο άλλων ειδών ψύλλων (*Ctenocephalides felis και Leptopsylla segnis*) .

Με την χρήση της μεθόδου logistic regression (αρχικά θεωρόντας τις μεταβλητές *species, region, land use, Year, season, health status, Xch & weight*) οι παράγοντες *region* ($p<0.0001$), παρουσία *Xch* ($p=0.001$), *season* ($p=0.022$) και *year sampled* ($p=0.029$) βρέθηκε οτι επιρεάζουν το βαθμό ανομοιότητας των θετικών για ρικέτσια, ενώ θεωρούνταν ενιαίο. Η θετικότητα για *Xch* αυξησε τον βαθμό ανομοιότητας για τα θετικά της ρικέτσιας κατα 2.2 φορές (95% CI 1.4 έως 3.5).

Πίνακας 15. Συσχέτιση των χαρακτηριστικών των τρωκτικών με την οροθετικότητα για τη *R.typhi*

Χαρακτηριστικά[1]		***R.typhi***		**p-value**
		ΘΕΤΙΚΑ, n (%)	**ΑΡΝΗΤΙΚΑ, n (%)**	
Είδος τρωκτικού				
Rattus rattus		32 (13.3%)	120 (47.1%)	<0.0001
Rattus norvegicus		209 (86.7%)	135 (52.9%)	
Φύλο				0.162
	Αρσενικά	127 (53.1%)	118 (46.8%)	
Περιοχή				<0.0001
	Λευκωσία	58 (24.1%)	95 (37.3%)	
	Αμμόχωστος	18 (7.5%)	4 (1.6%)	
	Λάρνακα	134 (55.6%)	41 (16.1%)	
	Λεμεσός	24 (10.0%)	81 (31.8%)	
	Πάφος	7 (2.9%)	34 (13.3%)	
Χρήση γης				0.006
	1.0	173 (71.8%)	163 (63.9%)	
	2.0	3 (1.2%)	3 (1.2%)	
	3.0	24 (10%)	48 (18.8%)	
	4.0	5 (2.1%)	15 (5.9%)	
	5.0	36 (14.9%)	26 (10.2%)	
Έτος δειγματοληψίας				
	2001-2	49 (20.3%)	109 (42.9%)	<0.0001
	2003	192 (79.7%)	145 (57.1%)	
Εποχή				<0.0001
	Άνοιξη	37 (15.4%)	60 (23.6%)	
	Καλοκαίρι	95 (39.4%)	89 (35.0%)	
	Φθινόπωρο	104 (43.2%)	76 (29.9%)	
	Χειμώνας	5 (2.1%)	29 (11.4%)	
Κατάσταση υγείας				<0.0001
Κακή		1 (0.4%)	6 (2.4%)	
Μέτρια		18 (7.5%)	50 (19.6%)	
Καλή		84 (34.9%)	117 (45.9%)	
Πολύ καλή		126 (52.3%)	72 (28.2%)	
Άριστη		12 (5.0%)	10 (3.9%)	
Παρουσία εκτοπαρασίτων				
Κάθε είδους		132 (54.4%)	86 (33.7%)	<0.0001
Xenopsylla cheopis		119 (49.4%)	48 (18.8%)	<0.0001
Ctenocephalides felis		29 (12.0%)	34 (13.3%)	0.664
Leptopsylla segnis		7 (2.9%)	7 (2.7%)	0.915
		Mean (Serratrice *et al.* 2003) Median	**Mean (Serratrice *et al.* 2003) Median**	
Βάρος σώματος (g)		314 (134.2) 351	202 (135.1) 167	<0.0001

3.1.1.3.2. *Bartonella henselae*

Τα αποτελέσματα ανά επαρχία φαίνονται στον Πίνακα.16 , και στην Εικόνα 28. Τα υψηλότερα ποσοστά παρατηρήθηκαν στις επαρχίες Αμμοχώστου και Λεμεσού ενώ το χαμηλότερο στην επαρχία Πάφου Η γεωγραφική διασπορά των οροθετικών για *Bartonella henselae* τρωκτικών φαίνεται στο Χάρτη 5

Χάρτης 5: Γεωγραφική διασπορά των οροθετικών για *Bartonella henselae* τρωκτικών ανά επαρχία

Εικόνα 28. Οροθετικά τρωκτικά για μπαρτονέλλα

Η συσχέτιση των χαρακτηριστικών των τρωκτικών με την οροθετικότητα για τη *Bartonella henselae* φαίνεται στον πίνακα 6.

Η οροθετικότητα για την *Bartonella henselae* δεν βρέθηκε να σχετίζεται με το φύλο του τρωκτικού, ($p>0.05$), με το είδος του ($p=0.10$), ή με το βάρος του ($p=0.14$). Δεν υπήρξε επίσης στατιστικά σημαντική διαφορά ανάλογα με την εποχή ($p=0.07$) και το έτος δειγματοληψίας ($p=0.65$).

Αντίθετα η οροθετικότητα για την *Bartonella* henselae βρέθηκε να σχετίζεται με την περιοχή δειγματοληψίας, με περισσότερα οροθετικά ζώα στην περιοχή της Λεμεσού και λιγότερα στη Λευκωσία ($p=0.009$). Παρατηρήθηκε έντονη συσχέτιση της οροθετικότητας με την παρουσία εκτοπαρασίτων ($p<0.0001$), και πιο συγκεκριμένα με την παρουσία του ψύλλου Ctenocephalides felis *(*$p<0.0001$). Αντίθετα δεν βρέθηκε συσχέτιση της οροθετικότητας και της παρουσίας των δυο άλλων ειδών ψύλλων *X. cheopis* και *Leptopsylla segnis*.

Με την μέθοδο logistic regression (θεωρόντας την ύπαρξη *Cfel* και την περιοχή σαν πιθανούς δείκτες), μόνο η *Cfel* βρέθηκε να επιρεάζει σημαντικά το βαθμό ανομοιότητας για τα θετικά της μπαρτονέλλας. Με θετικό *Cfel* υπήρξε αύξηση στα θετικά κατα 5.8 φορές (95% CI 3.1 έως 11.0)

Πίνακας 16. Συσχέτιση των χαρακτηριστικών των τρωκτικών με την οροθετικότητα για τη *Bartonella*

Χαρακτηριστικό		***Bartonella*** **Θετικοί οροί n (%)**	**Αρνητικοί οροί n (%)**	**p-value**
Είδος τρωκτικού				
Rattus rattus		21 (40.4%)	131 (29.6%)	0.110
Rattus norvegicus		31 (59.6%)	311 (70.4%)	
Φύλο				
	Male	20 (39.2%)	225 (51.2%)	0.100
Περιοχή				
	Λευκωσία	7 (13.5%)	144 (32.6%)	0.009
	Αμμόχωστος	4 (7.7%)	18 (4.1%)	
	Λάρνακα	21 (40.4%)	154 (34.8%)	
	Λεμεσός	18 (34.6%)	87 (19.7%)	
	Πάφος	2 (3.8%)	39 (8.8%)	
Χρήση γης				0.030
	1.0	44 (84.6%)	291 (65.8%)	
	2.0	0	6 (1.4%)	
	3.0	6 (11.5%)	65 (14.7%)	
	4.0	2 (3.8%)	18 (4.1%)	
	5.0	0	62 (14.0%)	
Έτος δειγματοληψίας				
	2001-2	15 (28.8%)	141 (32.0%)	0.647
	2003	37 (71.2%)	300 (68.0%)	
Εποχή				
	Άνοιξη	10 (19.2%)	85 (19.3%)	0.068
	Καλοκαίρι	27 (51.9%)	157 (35.6%)	
	Φθινόπωρο	11 (21.2%)	169 (38.3%)	
	Χειμώνας	4 (7.7%)	30 (6.8%)	
Κατάσταση υγείας				
Κακή		0	7 (1.6%)	0.569
Μέτρια		5 (9.6%)	63 (14.3%)	
Καλή		24 (46.2%)	176 (39.8%)	
Πολύ καλή		22 (42.3%)	175 (39.6%)	
Άριστη		1 (1.9%)	21 (4.8%)	
Παρουσία εκτοπαρασίτων				
Κάθε είδους		38 (73.1%)	179 (40.5%)	<0.0001
Xenopsylla cheopis		23 (44.2%)	144 (32.6%)	0.093
Ctenocephalides felis		20 (38.5%)	43 (9.7%)	<0.0001
Leptopsylla segnis		2 (3.8%)	12 (2.7%)	0.650[2]
		Mean (Serratrice *et al.*) Median	**Mean (Houpikian and Raoult 2001) Median**	
Βάρος σώματος (g)		224 (139.5) 185	260 (146.0) 276	0.141

3.1.1.4. Αποτελέσματα στις γάτες

Από 72 γάτες ελήφθησαν δείγματα ορού και ελέγχθηκαν με τη μέθοδο του έμμεσου ανοσοφθορισμού για την ανίχνευση αντισωμάτων έναντι της *R.typhi*, και της *B.henselae*. Η σύνθεση του δείγματος έχει ως εξής: 29/72 (%) ήταν ζώα συντροφιάς (pet cats) 12/72 (%) ήταν αδέσποτες γάτες (stray cats), και 31/72 προέρχονταν από φάρμες σε αγροτοκτηνοτροφικές περιοχές. 55,6% (40/72) ήταν θηλυκού γένους και 44,4% (32/72) ήταν αρσενικού γένους. 20/72 γάτες (27,7%) είχε ηλικία <= 1 έτους. Από τις 72 γάτες που ελέγχθηκαν, 38 (52,7%) έφεραν πάνω τους εκτοπαράσιτα (28 κρότωνες και 127ψύλλους). Ένα υψηλό ποσοστό (76.5%) από τις γάτες είχαν επαφή με άλλα ζώα. (67% μόνο με άλλες γάτες, 12% με σκύλους, και 21% και με τα δυο).

3.1.1.5. Αποτελέσματα ορολογικού ελέγχου στις γάτες

3.1.1.5.1. *B.henselae*

30 από τις 72 γάτες (41, 6%), εμφάνισαν IgG αντισώματα έναντι της *B.henselae* σε τίτλους >= 1/64 (τίτλος αντισωμάτων >= 1/64 θεωρήθηκε ως cut-off point). Οι τίτλοι των IgG αντισωμάτων στα οροθετικά ζώα κυμάνθηκαν από 1/64 έως 1024. Αυξημένη οροθετικότητα παρατηρήθηκε στα θηλυκά ζώα (17/40: 42,5%) σε σύγκριση με τα αρσενικά (13/32: 40,6%), χωρίς όμως η διαφορά να είναι στατιστικά σημαντική.

Από τις 20 γάτες ηλικίας < 1 έτους, 7 (35%) εμφάνισαν IgG αντισώματα έναντι της *B.henselae*, ενώ σε μεγαλύτερης ηλικίας γάτες το ποσοστό ήταν υπερβαίνοντας το 44% (23/52: 44,23%).

Οι αδέσποτες γάτες και γάτες που προέρχονταν από φάρμες εμφάνισαν υψηλότερα ποσοστά οροθετικότητας (58,3% και 48,38 αντίστοιχα) σε σύγκριση με τις γάτες συντροφιάς (27,5%). Οι δυο πρώτες ομάδες επίσης εμφάνισαν υψηλούς τίτλους αντισωμάτων. Το παραπάνω ήταν αναμενόμενο, αφού γάτες αυτών των ομάδων έρχονται πιο συχνά σε επαφή με άλλα ζώα και κατά συνέπεια είναι περισσότερο επιρρεπείς στην έκθεση σε εκτοπαράσιτα που παρασιτούν είτε άλλες γάτες είτε άλλου είδους ζώα, άρα και στη μόλυνση με το παθογόνο.

20 από τις 30 γάτες (66,6%) που εμφάνισαν IgG αντισώματα έναντι της *B.henselae* σε τίτλους >= 1/64 παρασιτούνταν από εκτοπαράσιτα, κυρίως ψύλλους ενώ 18 από τις 42 ορο-αρνητικές γάτες (42,8%) έφεραν πάνω τους εκτοπαράσιτα. (η διαφορά δεν ήταν στατιστικά σημαντική). Από τις 38 γάτες που παρασιτούνταν από εκτοπαράσιτα 14 (36,8%) ήταν οροαρνητικές ενώ 24 (χ%)ήταν οροθετικές.

Τα παραπάνω φαίνονται αναλυτικά στους πίνακες 17 και 18

ΠΙΝΑΚΑΣ 17 : Οροεπιπολασμός της *B.henselae* στις γάτες, ανάλογα με το φύλο, την ηλικία, την περιοχή προέλευσης και τον παρασιτισμό από ψύλλους

		B.henselae		
	Σύνολο (n)	**Negative**	**Positive No**	**Positive (%)**
	72	42	30	41, 6%
Χαρακτηριστικά				
Φύλο/ ηλικία				
Θηλυκό	40	23	17	42,5%
<1 έτους	12	8	4	33%
>1έτους	28	15	13	46,4%
Αρσενικό	32	19	13	40,6%
<1 έτους	8	5	3	37,5%
>1έτους	24	14	10	41,6%
Προέλευση				
pet	29	21	8	27,5%
stray	12	5	7	58,3%
farms	31	16	15	48,38
Ψύλλοι				
Ναι	38	14	24	
όχι	34	20	14	

3.1.1.5.2. *R.typhi*

31 από τις 72 γάτες (%), εμφάνισαν IgG αντισώματα έναντι της *R.typhi* σε τίτλους >= 1/60 (τίτλος αντισωμάτων >= 1/60 θεωρήθηκε ως cut-off point). Οι τίτλοι των IgG αντισωμάτων στα οροθετικά ζώα κυμάνθηκαν από 1/64 έως 1/512. Αυξημένη οροθετικότητα παρατηρήθηκε στις γάτες που παρασιτούνταν από ψύλλους, καθώς επίσης και σε γάτες που προέρχονταν από φάρμες και ήταν σε επαφή με άλλα ζώα (πίνακας 18)

ΠΙΝΑΚΑΣ 18 : Οροεπιπολασμός της *R.typhi* στις γάτες, ανάλογα με το φύλο, την περιοχή προέλευσης και τον παρασιτισμό από ψύλλους

		R.typhi		
	Σύνολο (n)	**Negative**	**Positive No**	**Positive (%)**
	72	41	31	
Χαρακτηριστικά				
Φύλο				
Θηλυκό	40	24	16	
Αρσενικό	32	17	15	
Προέλευση				
pet	29		2	
stray	12		10	
farms	31		19	
Ψύλλοι				
Ναι	38		27	
όχι	34		4	

Οι τίτλοι των IgG αντισωμάτων έναντι της *B.henselae* και της ***R.typhi*** όπως προέκυψαν από την εφαρμογή του έμμεσου ανοσοφθορισμού, φαίνονται στον πίνακα 19.

Πίνακας 19 . Κατανομή των τίτλων των IgG αντισωμάτων έναντι της *B.henselae* και της *R.typhi* σε δείγματα ορού από 72 γάτες

Τίτλοι IgG αντισωμάτων	***B.henselae* No (%)**	***R.typhi* No (%)**
0	18 (24,7%)	20
32	24	17
64	12	16
128	8	11
256	4	2
512	4	1
1024	2	0

3.1.1.6. Γονοτυπική ανίχνευση και ταυτοποίηση *Rickettsia* sp και *Bartonella* sp στα θηλαστικά-ξενιστές

Δείγματα αίματος και ιστών από σπονδυλωτούς ξενιστές (τρωκτικά, γάτες) ελέγχθηκαν με την μέθοδο της PCR, για τη γονοτυπική ανίχνευση των υπό μελέτη παθογόνων. Ελέγχθηκαν 146 δείγματα αίματος από τρωκτικά (82 δείγματα) και γάτες (64 δείγματα), και 32 δείγματα ιστών από τρωκτικά. Η ταυτοποίηση έγινε με την εφαρμογή των μεθόδων PCR-RFLP PCR-sequencing analysis.
Τα αποτελέσματα έχουν ως εξής:

3.1.1.6.1. Τρωκτικά

32 δείγματα ιστών (καρδιά) και 82 δείγματα αίματος που προέρχονταν από τρωκτικά ελέγχθηκαν με τη μέθοδο της PCR για τη γονοτυπική ανίχνευση ρικετσιακού DNA και *Bartonella sp* DNA. Δεν ανιχνεύτηκε ρικετσιακό ούτε *Bartonella sp* DNA στα δείγματα αίματος. Σε 7 δείγματα ιστών τρωκτικών ανιχνεύτηκε ρικετσιακό DNA. Το προφίλ που ελήφθη μετά από την εφαρμογή της RFLP στο προιόν της PCR (434-bp) με τη χρήση ειδικών εναρκτών για το γονίδιο που κωδικοποιεί την 17-kDa πρωτεΐνη, ήταν χαρακτηριστικό για τη *R.typhi*. Η

ταυτότητα της *R.typhi* επιβεβαιώθηκε και μετά από εφαρμογή της μεθόδου sequencing analysis (100% ομοιότητα με *Rickettsia typhi* 17-Kd gene amplicon DQ 166936) .

Σε 6 δείγματα ανιχνεύτηκε *Bartonella sp* DNA .

Η τυποποίηση βασίστηκε στον προσδιορισμό της αλληλουχίας των βάσεων (sequencing analysis) των DNA προιόντων της PCR μετά από γενωμικό πολ/σμό με τη χρήση ειδικών εναρκτών για τα γονίδια ITS (Heller *et al.* 1998; Ellis *et al.* 1999) καθώς και των *gltA*, *groEL*, και τη σύγκριση τους με αλληλουχίες αποθηκευμένες στη GenBank.

Ακολουθώντας την παραπάνω μεθοδολογία πήραμε τα παρακάτω αποτελέσματα:

Σε 2 δείγματα αίματος (σε 1 *Rattus norvegicus και 1 Rattus rattus)* ανιχνεύτηκε *Bartonella tribocorum* (>99% ομοιότητα στην αλληλουχία των βάσεων με GenBank sequence no. AF312505). Το παραπάνω στέλεχος μπαρτονέλλας έχει απομονωθεί από αρουραίους στις ΗΠΑ (Ellis *et al.* 1999).

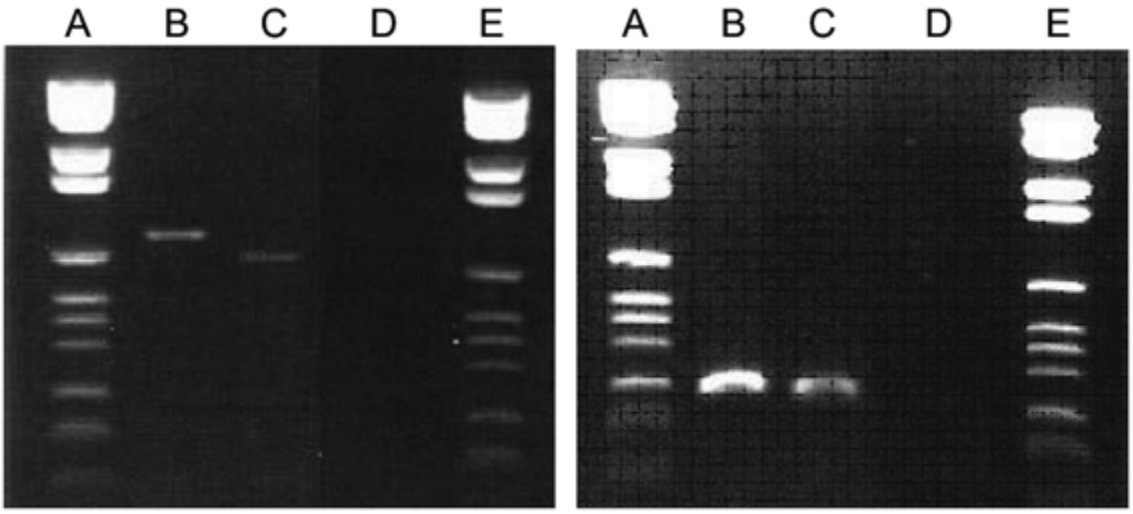
Σε 3 δείγματα από καρδιακό ιστό προερχόμενα από 3 *Rattus norvegicus* ανιχνεύτηκε *Bartonella elizabethae.* Η ανάλυση της αλληλουχίας των βάσεων του προιόντος της PCR (337 bp τμήματος του DNA) με το γονίδιο *glt*A gene έδειξε ότι εμφανίζει ομοιότητα 93% με στέλεχος της *Bartonella elizabethae,* που είχε απομονωθεί στις ΗΠΑ από ασθενή με ενδοκαρδίτιδα (Gundi *et al.* 2004). Τέλος, σε 1 δείγμα καρδιακού ιστού από *Rattus norvegicus* ανιχνεύτηκε *Bartonella rattimassiliensis* sp. Nov (98% και 97,1% ομοιότητα με τις αποθηκευμένες στη GenBank αλληλουχίες no AY515121 και AY515122). Το στέλεχος αυτό έχει απομονωθεί στη Γαλλία από τρωκτικά του γένους *Rattus* (Serratrice *et al.* 2003)

3.1.1.6.2. Γάτες

64 δείγματα αίματος προερχόμενα από γάτες ελέγχθηκαν με τη μέθοδο της PCR με τη χρήση ειδικών εναρκτών με στόχο την περιοχή 16S-23S rRNA - (γονίδιο ITS). Σε 10 (15,6 %) δείγματα ανιχνεύτηκε *Bartonella* sp DNA. Η ανάλυση της

αλληλουχίας των βάσεων του 172- basepair προιόντος της PCR οδήγησε στην τυποποίηση της *B.henselae* σε όλα τα θετικά δείγματα.

Προκειμένου να επιβεβαιωθεί το παραπάνω συμπέρασμα, έγινε επίσης ένας δεύτερος γενωμικός πολλαπλασιασμός τμήματος του γονιδίου που κωδικοποιεί την *pap*31 πρωτεΐνη, με τη χρήση του ζεύγους ειδικών εναρκτών PAPn1-PAPn2 [Εικόνα 29]. Όλα τα θετικά δείγματα κατά τον πρώτο γενωμικό πολλαπλασιασμό ήταν θετικά επίσης και με τη χρήση των ειδικών εναρκτών PAPn1-PAPn2, δίνοντας ένα PCR προιόν 257-bp. Η ανάλυση της αλληλουχίας των βάσεων του παραπάνω τμήματος του DNA έδειξε 100% ομοιότητα με τη *B.henselae* (GenBank accession number AF001274).



Εικόνα 29 . Agarose gel stained with ethidium bromide showing the amplicons intergenic spacer (left panel) and *pap31* (right panel) σε 2 γάτες. Lanes A and E, DNA size ladder; lane B, γάτα 1; lane C, γάτα 2; lane D, negative control.

Από τις 10 γάτες με θετικό PCR για τη *B.henselae οι* 3 ήταν ηλικίας <1 έτους ενώ οι 7 ηλικίας > 1 έτους. Τα 6 ζώα ήταν θηλυκά ενώ τα 4 αρσενικά. Τα περισσότερα ζώα με θετικό PCR έφεραν εκτοπαράσιτα, κυρίως ψύλλους, ενώ 8/10 από τις γάτες θετικό PCR εμφάνισαν IgG αντισώματα έναντι της *B.henselae* σε τίτλους > =1:64. (πινακας 20), με τους τίτλους των IgG αντισωμάτων να κυμαίνονται

από 1:128 έως1:256. Απ' τους παράγοντες όπως ηλικία, φύλο, προέλευση του ζώου, παρασιτισμός και παρουσία αντισωμάτων, μόνο ο παράγοντας παρουσία αντισωμάτων έναντι της *B.henselae* και ο παρασιτισμός του ζώου από ψύλλους έδειξαν να σχετίζονται με την βακτηριαιμία (θετικό PCR). Οι διαφορές ήταν στατιστικά σημαντικές ($P < 0.0001$). Στον πίνακα 10 φαίνονται τα χαρακτηριστικά των ζώων (ηλικία, φύλο, παρασιτισμός) που ήταν θετικά με τη μέθοδο της PCR και οι τίτλοι αντισωμάτων όπως προσδιορίστηκαν στον ορολογικό έλεγχο με τη μέθοδο του ανοσοφθορισμού.

Δεν ανιχνεύτηκε ρικετσιακό DNA στις γάτες.

Πίνακας 20 Χαρακτηριστικά των γατών με *Bartonella* henselae θετικό PCR και σύγκριση με τα τα αποτελέσματα του ορολογικού ελέγχου

Χαρακτηριστικά των γατών με *Bartonella* henselae θετικό PCR					
Κωδικός ζώου	**Ηλικία**	**Φύλο**	**Παρασιτισμός Ψύλλοι**	**Τίτλοι αντισωμάτων**	
1	<1	θηλυκό	ΝΑΙ	1:128	STRAY
2	>1	θηλυκό	ΟΧΙ	1/64	PET
3	>1	θηλυκό	ΝΑΙ	1/512	FARM
4	<1	θηλυκό	ΟΧΙ	1/128	YARD
5	>1	θηλυκό	ΝΑΙ	1/512	FARM
6	>1	θηλυκό	ΝΑΙ	<1:64	YARD
7	>1	αρσενικό	ΟΧΙ	<1:64	PET
8	<1	αρσενικό	ΝΑΙ	1/256	STRAY
9	>1	αρσενικό	ΝΑΙ	1/128	PET
10	<1	αρσενικό	ΝΑΙ	1/128	FARM

3.2 ΜΕΛΕΤΗ ΣΤΑ ΑΡΘΡΟΠΟΔΑ

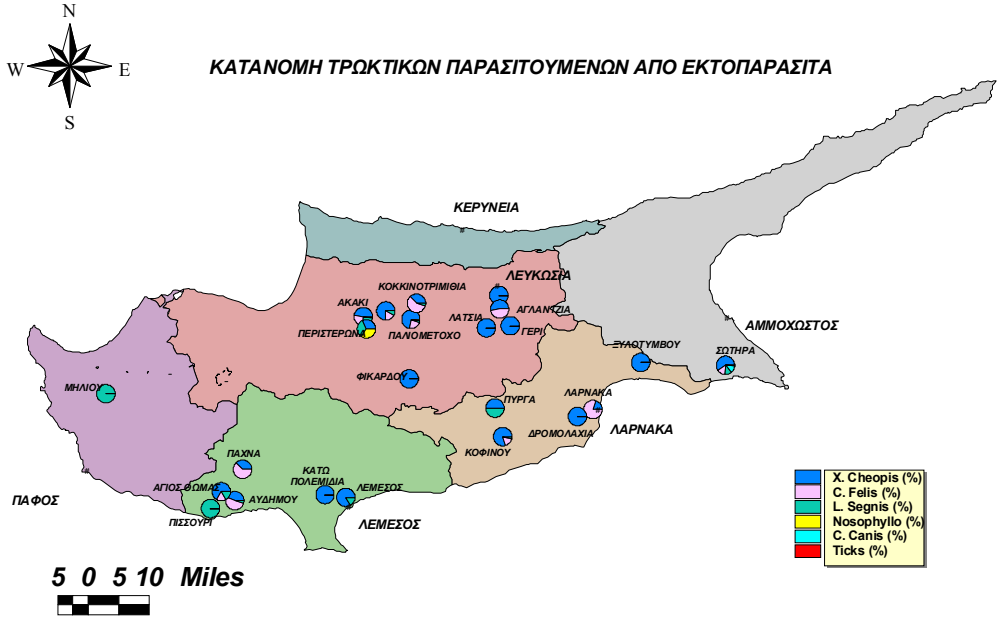
3.2.1. Επιδημιολογική μελέτη

Εκτοπαράσιτα, που παρασιτούσαν τα τρωκτικά και τις γάτες κατά τη διάρκεια της αιμοληψίας συλλέχθηκαν και ελέγχθηκαν με τη μέθοδο της PCR για την ανίχνευση και απομόνωση των υπό διερεύνηση παθογόνων παραγόντων (ρικέτσιες και μπαρτονέλλες)

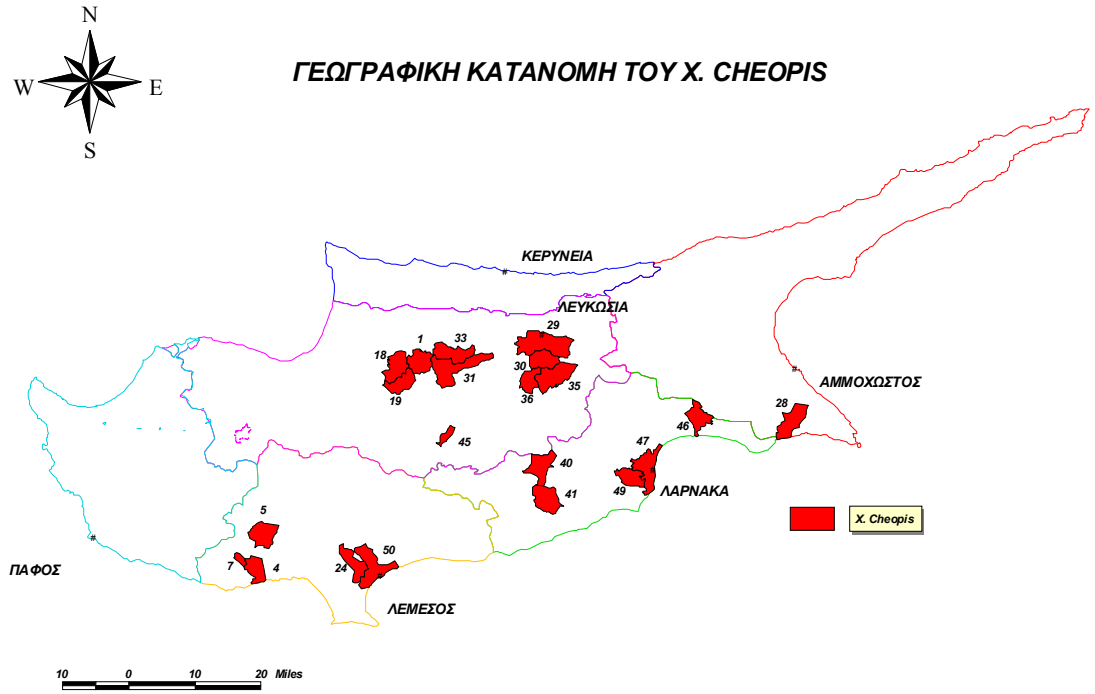
3.2.1.1. Εκτοπαράσιτα των τρωκτικών

Τα 254 από τα 625 τρωκτικά παρασιτούνταν από εκτοπαράσιτα. Εντοπίστηκαν, συλλέχτηκαν και ταξινομήθηκαν 1038 εκτοπαράσιτα, τα οποία εκτός από 3 κρότωνες ήταν όλα ψύλλοι. Οι 3 κρότωνες ανήκαν στο είδος *Rhipicephalus turanicus*. Οι ψύλλοι που συλλέχτηκαν και ταυτοποιήθηκαν ανήκουν στα εξής 5 είδη: *Xenopsylla cheopis* (70,34%), *Ctenocephalides felis* (24,22%), *Ctenocephalides canis* (0,48 %), *Leptopsylla segnis* (4,36 %), *Nosophylla fasciatus* (0,67%). Ο αριθμός των εκτοπαρασίτων ανά ζώο κυμάνθηκε από 1-25 (μέσο παρασιτικό φορτίο 4 ψύλλοι/τρωκτικό). Στον χάρτη 6 φαίνεται η γεωγραφική διασπορά των τρωκτικών που παρασιτούνταν από εκτοπαράσιτα, ενώ στους χάρτες 7 και 8 φαίνεται η γεωγραφική διασπορά των τρωκτικών που παρασιτούνταν από *Xenopsylla cheopis* (χάρτης 7) ή από *Ctenocephalides felis* (χάρτης 8).

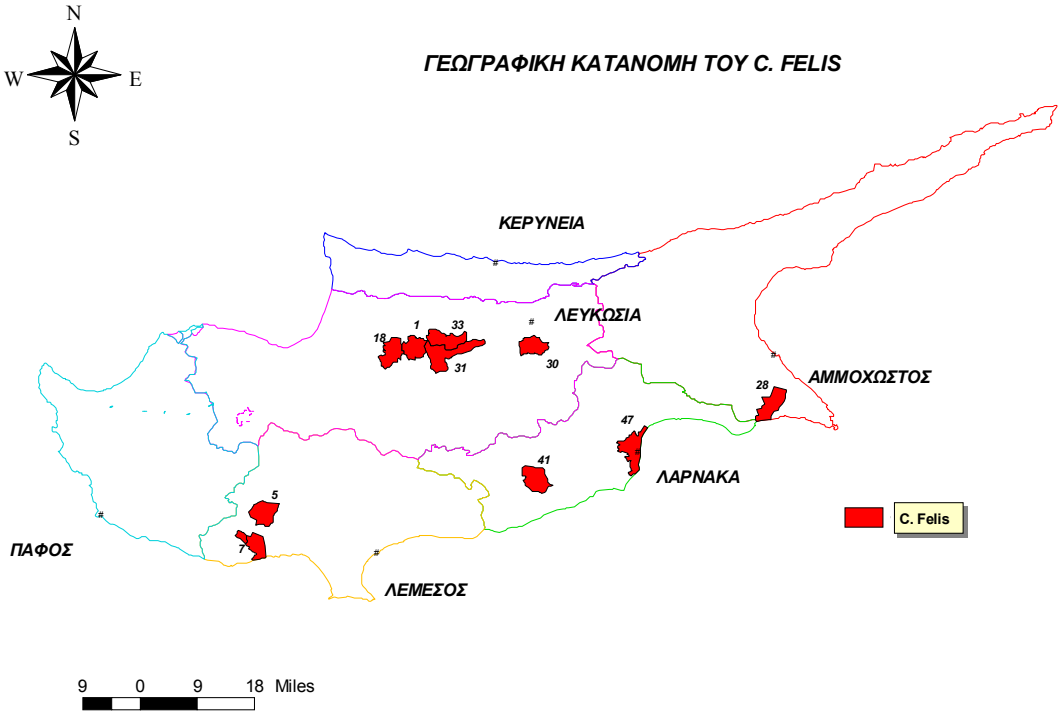
Στον πίνακα 21 φαίνεται η σχέση των χαρακτηριστικών των τρωκτικών (είδος, φύλο, περιοχή κλπ) με τον παρασιτισμό τους από εκτοπαράσιτα, ανεξάρτητα του είδους του εκτοπαρασίτου. Στους πίνακες 22 και 23 φαίνεται η σχέση των χαρακτηριστικών των τρωκτικών με τον παρασιτισμό τους από ψύλλους του είδους *Xenopsylla cheopis* (πίνακας 22) ή από ψύλλους του είδους *Ctenocephalides felis* (πίνακας 23).



Χάρτης 6



Χάρτης 7


N
W
E
S
ΓΕΩΓΡΑΦΙΚΗ ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΤΟΥ C. FELIS
ΚΕΡΥΝΕΙΑ
ΛΕΥΚΩΣΙΑ
ΑΜΜΟΧΩΣΤΟΣ
ΛΑΡΝΑΚΑ
ΠΑΦΟΣ
ΛΕΜΕΣΟΣ
18
1
33
31
30
28
47
41
5
7
C. Felis
9 0 9 18 Miles

Χάρτης 8

Πίνακας 21. Σχέση των χαρακτηριστικών των τρωκτικών με την παρουσία ή όχι εκτοπαρασίτων (ανεξάρτητα του είδους του εκτοπαρασίτου)

Χαρακτηριστικό	**Εκτοπαράσιτα Παρουσία, n (%)**	**Απουσία, n (%)**	**p-value**
Είδος τρωκτικού			<0.0001
Rattus rattus	59 (23.4%)	161 (43.5%)	
Rattus norvegicus	193 (76.6%)	209 (56.5%)	
Φύλο			0.002
Male	138 (55.0%)	155 (42.6%)	
Περιοχή			<0.0001
Λευκωσία	64 (25.4%)	143 (38.6%)	
Αμμόχωστος	15 (6.0%)	7 (1.9%)	
Λάρνακα	118 (46.8%)	72 (19.5%)	
Λεμεσός	51 (20.2%)	89 (24.1%)	
Πάφος	4 (25.5%)	59 (15.9%)	
Χρήση γης			0.044
10	183 (72.6%)	233 (63.0%)	
20	5 (2.0%)	3 (0.8%)	
30	29 (11.5%)	68 (18.4%)	
40	14 (5.6%)	24 (6.5%)	
50	21 (8.3%)	42 (11.4%)	
Έτος δειγματοληψίας			<0.0001
2001-2	68 (27.0%)	153 (41.6%)	
2003	184 (73.0%)	215 (58.4%)	
Εποχή			<0.0001
Άνοιξη	41 (16.3%)	110 (29.9%)	
Καλοκαίρι	109 (43.3%)	103 (28.0%)	
Φθινόπωρο	85 (33.7%)	112 (30.4%)	
Χειμώνας	17 (6.7%)	43 (11.7%)	
Κατάσταση υγείας			<0.0001
Κακή	2 (0.8%)	9 (6.5%)	
Μέτρια	22 (8.7%)	72 (19.5%)	
Καλή	90 (35.7%)	163 (44.1%)	
Πολύ καλή	123 (48.8%)	111 (30.0%)	
Άριστη	15 (6.0%)	15 (4.1%)	
Βάρος σώματος (g)	**Mean (Serratrice *et al.*) Median**	**Mean (Serratrice *et al.*) Median**	
	283 (148.4) 314	215 (135.9) 190	<0.0001

Πίνακας 22. Σχέση των χαρακτηριστικών των τρωκτικών με τον παρασιτισμό τους από ψύλλους του είδους *Xenopsylla cheopis*

Χαρακτηριστικό		***Xenopsylla cheopis*** **Παρουσία, n (%)**	**Απουσία, n (%)**	**p-value**
Είδος τρωκτικού				<0.0001
Rattus rattus		27 (14.3%)	193 (44.6%)	
Rattus norvegicus		162 (85.7%)	240 (55.4%)	
				0.001
	Male	108 (57.4%)	185 (43.3%)	
Περιοχή				<0.0001
	Λευκωσία	47 (24.9%)	160 (37.0%)	
	Αμμόχωστος	9 (4.8%)	13 (3.0%)	
	Λάρνακα	106 (56.1%)	84 (19.4%)	
	Λεμεσός	27 (14.3%)	113 (26.1%)	
	Πάφος	0	63 (14.5%)	
Χρήση γης				0.025
	1.0	135 (71.4%)	281 (64.9%)	
	2.0	5 (2.6%)	3 (0.7%)	
	3.0	18 (9.5%)	79 (18.2%)	
	4.0	12 (6.3%)	26 (6.0%)	
	5.0	19 (10.1%)	44 (10.2%)	
Έτος δειγματοληψίας				<0.0001
	2001-2	45 (23.8%)	176 (40.8%)	
	2003	144 (76.2%)	255 (59.2%)	
Εποχή				<0.0001
	Άνοιξη	25 (13.2%)	126 (29.2%)	
	Καλοκαίρι	81 (42.9%)	131 (30.4%)	
	Φθινόπωρο	72 (38.1%)	125 (29.0%)	
	Χειμώνας	11 (5.8%)	49 (11.4%)	
Κατάσταση υγείας				<0.0001
Κακή		1 (0.5%)	10 (2.3%)	
Μέτρια		16 (8.5%)	78 (18.0%)	
Καλή		59 (31.2%)	194 (44.8%)	
Πολύ καλή		104 (55.0%)	130 (30.0%)	
Άριστη		9 (4.8%)	21 (4.8%)	
Βάρος σώματος (g)		**Mean (Serratrice *et al.*) Median**	**Mean (Serratrice *et al.*) Median**	
		308 (142.3) 355	214 (136.6) 180	<0.0001

Πίνακας 23. Σχέση των χαρακτηριστικών των τρωκτικών με τον παρασιτισμό τους από ψύλλους του είδους *Ctenocephalides felis*

Χαρακτηριστικό	**Ctenocephalides felis**		**p-value**
	Παρουσία, n (%)	**Απουσία, n (%)**	
Είδος τρωκτικού			0.096
Rattus rattus	33 (44.0%)	187 (34.2%)	
Rattus norvegicus	42 (56.0%)	360 (65.8%)	
Φύλο			0.576
Male	38 (50.7%)	255 (47.2%)	
Περιοχή			<0.0001
Λευκωσία	13 (17.3%)	194 (35.5%)	
Αμμόχωστος	9 (12.0%)	13 (2.4%)	
Λάρνακα	24 (32.0%)	166 (30.3%)	
Λεμεσός	28 (37.3%)	112 (20.5%)	
Πάφος	1 (0.2%)	62 (11.3%)	
Χρήση γης			0.006
1.0	64 (85.3%)	352 (64.4%)	
2.0	0	8 (1.5%)	
3.0	8 (10.7%)	89 (16.3%)	
4.0	1 (1.3%)	37 (6.8%)	
5.0	2 (2.7%)	61 (11.2%)	
Έτος δειγματοληψίας			0.006
2001-2	16 (21.3%)	205 (37.6%)	
2003	59 (78.7%)	340 (62.4%)	
Εποχή			<0.0001
Άνοιξη	7 (9.3%)	144 (26.4%)	
Καλοκαίρι	43 (57.3%)	169 (31.0%)	
Φθινόπωρο	19 (25.3%)	178 (32.7%)	
Χειμώνας	6 (8.0%)	54 (9.9%)	
Κατάσταση υγείας			0.066
Κακή	1 (1.3%)	10 (1.8%)	
Μέτρια	3 (4.0%)	91 (16.6%)	
Καλή	33 (44.0%)	220 (40.2%)	
Πολύ καλή	33 (44.0%)	201 (36.7%)	
Άριστη	5 (6.7%)	25 (4.6%)	
Βάρος σώματος (g)	**Mean (Serratrice *et al.*) Median**	**Mean (Raoult and Roux 1997) Median**	
	264 (147.9) 206	240 (144.3) 218	0.118

3.2.1.2. Εκτοπαράσιτα που παρασιτούσαν σε γάτες

Οι 38 από τις 72 γάτες (52,7%) παρασιτούνταν από εκτοπαράσιτα. Εντοπίστηκαν, συλλέχτηκαν και ταξινομήθηκαν 155 εκτοπαράσιτα, από τα οποία 127 ήταν ψύλλοι και 28 κρότωνες. Οι ψύλλοι που συλλέχτηκαν και ταυτοποιήθηκαν using accepted morphologic criteria ανήκουν στα είδη : *Ctenocephalides felis* (96/127: 75,6%), *και Ctenocephalides canis* (31/127: 24,4%). Ο αριθμός των εκτοπαρασίτων ανά ζώο κυμάνθηκε από 1-18 (μέσο παρασιτικό φορτίο 4 ψύλλοι/γάτα).

Το πιο συχνό είδος που παρασιτούσε τις γάτες ήταν ο ψύλλος του είδους *Ctenocephalides felis που βρέθηκε σε* 33 από τις 38 γάτες (86,8 %) παρασιτούμενες από εκτοπαράσιτα γάτες. Ψύλλοι του είδους *Ctenocephalides canis* συλλέχθηκαν από 8 γάτες. Από 3 γάτες συλλέχθηκαν και τα δυο είδη.

3.2.1.3. Γονοτυπική ανίχνευση και ταυτοποίηση *Rickettsia* sp και *Bartonella* sp στα αρθρόποδα-μεταβιβαστές

3.2.1.3.1. Ψύλλοι των τρωκτικών

457 ψύλλοι (400 *X. cheopis,* 250 *C. felis* 45 *L. Segnis,* 5 *C. canis* και 7 N. fasciatus) ελέγχθηκαν για την ανίχνευση *Rickettsia* spp. και *Bartonella* spp DNA.

3.2.1.3.2. Ανίχνευση και τυποποίηση ρικετσιακών στελεχών σε ψύλλους που παρασιτούσαν τρωκτικά

Η γενετική ανάλυση βασίστηκε στον γενωμικό πολλαπλασιασμό για τρεις ανεξάρτητες αλληλουχίες γονιδίων (gltA - κιτρική συνθετάση, ompB-OmpB μεμβρανική πρωτεΐνη και 17- kDa protein gene- πρωτεΐνη 17- kDa) με ειδικούς εναρκτές. Ακολουθούσε μετέπειτα ανάλυση στα προιόντα του PCR με την επίδραση

περιοριστικών ενζύμων (RFLP) για τον προσδιορισμό του είδους και/ή sequencing analysis.

Η εφαρμογή της PCR με τη χρήση ειδικών εναρκτών α) για το γονίδιο gltA (ζεύγος εναρκτών Rp877F και Rp1258R) (Roux and Raoult 2000) και β) για το γονίδιο ompB (ζεύγος εναρκτών 120-M59' και 120–807') (Roux and Raoult 1995a) οδήγησε στην ανίχνευση ρικετσιακού DNA σε 37 ψύλλους και με τους δυο γενωμικούς πολ/σμούς (%). Από τους 37 ψύλλους θετικούς και στις δυο PCR assays, 20 ήταν *X. cheopis, 14 C. felis* και 3 *L. segnis*.

3.2.1.3.3. Γονοτυπική ταυτοποίηση της *R.typhi*

Η γονοτυπική ταυτοποίηση της *R.typhi* έγινε με την επίδραση της ενδονουκλεάσης AluI στο προιόν του πρώτου γενωμικού πολλαπλασιασμού (gltA, 381-bp) ενώ στο προιόν του τρίτου γενωμικού πολλαπλασιασμού (17- kDa : 434 bp), έγινε επίδραση με τα περιοριστικά ένζυμα και AluI και BsaI.

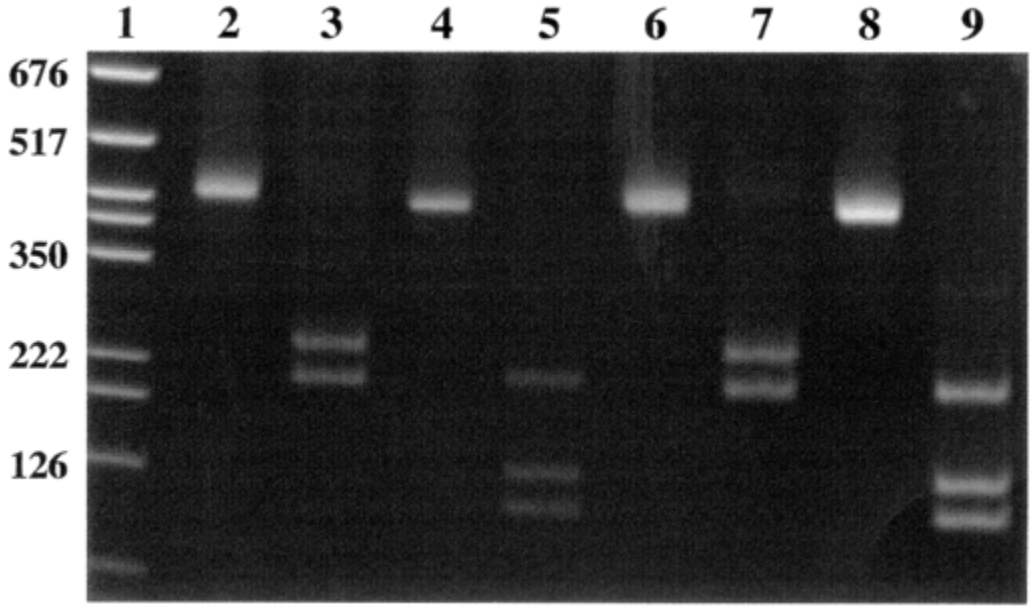
Το προφιλ μετα από εφαρμογή της RFLP στο προιόν του πρώτου γενωμικού πολλαπλασιασμού βρέθηκε να είναι ταυτόσημο με το πρότυπο στέλεχος αναφοράς της *R.typhi* σε 19 δείγματα. Το προφίλ (Εικόνα 31) μετά από εφαρμογή της RFLP στο προιόν του τρίτου γενωμικού πολλαπλασιασμού (17- kDa : 434 bp), βρέθηκε επίσης ταυτόσημο με το πρότυπο στέλεχος αναφοράς της *R.typhi* σε όλα τα παραπάνω δείγματα.

Η ταυτότητα της *R.typhi* επιβεβαιώθηκε και μετά από εφαρμογή της μεθόδου sequencing analysis (100% ομοιότητα με τις αλληλουχίες βάσεων του DNA των γονιδίων gltA και ompB της *R.typhi*). Η *R.typhi* ανιχνεύτηκε σε 4% (16/400) των ψύλλων του είδους *X. cheopis*, και σε 6,6 % (3/45) των ψύλλων του είδους *L. segnis*.

Από τους μολυσμένους με *R.typhi* ψύλλους 9 ήταν γένους αρσενικού και 10 γένους θηλυκού (η διαφορά δεν ήταν στατιστικά σημαντική). Οι *R.typhi* θετικοί ψύλλοι προέρχονταν και από τα δυο είδη αρουραίων [R. norvegicus (n=12) και R. rattus (n=4)], αλλά ο βαθμός μόλυνσης με *R.typhi* ήταν σημαντικά υψηλότερος σε ψύλλους που παρασιτούσαν τρωκτικά του είδους R. norvegicus.

3.2.1.3.4. Γονοτυπική ταυτοποίηση της *R.felis*

Η γονοτυπική ταυτοποίηση της *R.felis* έγινε μετά από εφαρμογή της μεθόδου sequencing analysis στο προιόν 381-bp του πρώτου γενωμικού πολλαπλασιασμού (gltA) καθώς επίσης και στο προιόν του δεύτερου γενωμικού πολλαπλασιασμού (ompB). Παρατηρήθηκε 100% ομοιότητα με τις αλληλουχίες βάσεων του DNA των γονιδίων gltA και ompB της *R.felis* (GenBank accession no. AF516333). Επιπλέον, η ταυτότητα της *R.felis* επιβεβαιώθηκε επίσης και μετά από εφαρμογή της μεθόδου RFLP στο στο προιόν του τρίτου γενωμικού πολλαπλασιασμού (17- kDa : 434 bp) (Εικόνα 30).



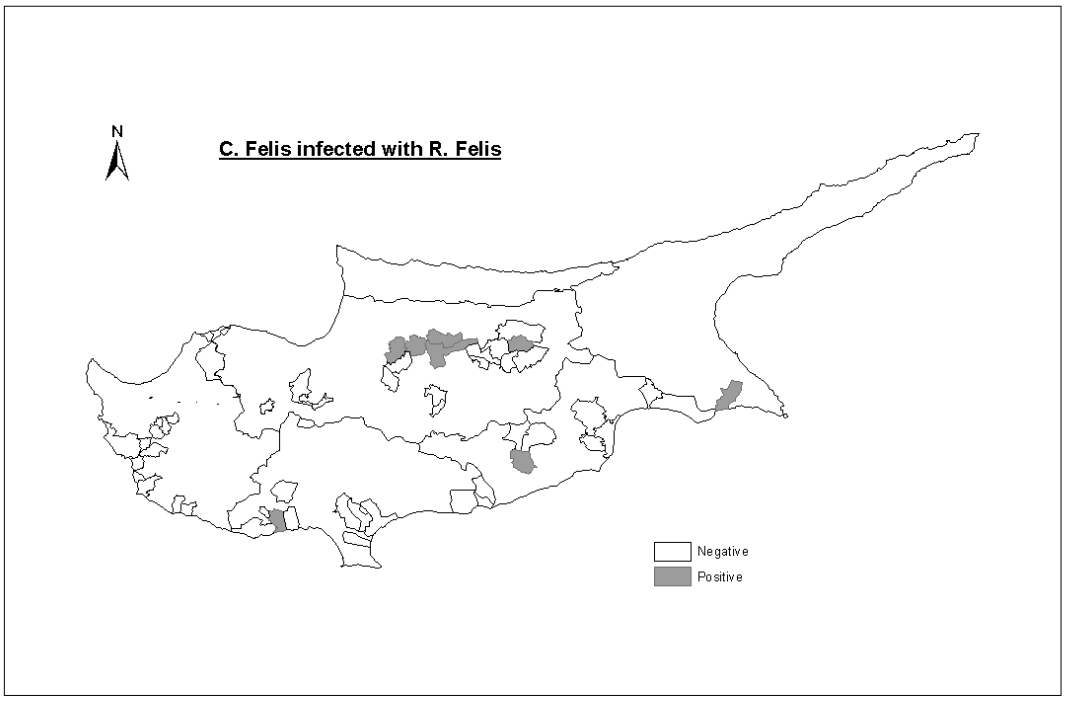
Εικόνα 30. Αντιπροσωπευτική εικόνα **PCR-RFLP** στην οποία φαίνεται το προιόν (434 ζευγάρια βάσεων) που προέκυψε μετά από γενωμικό πολλαπλασιασμό με τη χρήση ειδικών εναρκτών για το γονίδιο που κωδικοποιεί την 17-kDa protein των ρικετσιών, καθώς και το προφιλ των τμημάτων του DNA μετά από την επίδραση με περιοριστικό ένζυμο *Alu*I
Στήλη 1: DNA marker
Στήλη 2 : 17-kDa-fragment amplification product από μολυσμένα με *Rickettsia typhi* Vero cells
Στήλη 3 : 17-kDa-fragment amplification product μετά από επίδραση με *Alu*I
Στήλες 4,8 : 17-kDa-fragment amplification product από ψύλλο μολυσμένο με *R.felis*
Στήλες 5,9 : 17-kDa-fragment amplification product από ψύλλο μολυσμένο με *R.felis* μετά από επίδραση με *Alu*I
Στήλη 6: 17-kDa-fragment amplification product από ψύλλο μολυσμένο με *R.typhi*
Στήλη 7: 17-kDa-fragment amplification product από ψύλλο μολυσμένο με *R.typhi* μετά από επίδραση με *Alu*I

Η *R.felis* ανιχνεύτηκε σε 1% (4/400) από τους ψύλλους του είδους *X. cheopis και σε* 5,6% (14/250) από τους ψύλλους του είδους *C. felis*

Οι 16 ψύλλοι του είδους *X. cheopis* που βρέθηκαν μολυσμένοι με *R.typhi* απομονώθηκαν από 2 *R. rattus* και 12 *R. norvegicus* που είχαν συλληφθεί σε 10 διαφορετικές περιοχές, ενώ οι 3 μολυσμένοι με *R.typhi* ψύλλοι του είδους *L.segnis* είχαν απομονωθεί από 2 *R. rattus* συλληφθεί σε 2 περιοχές.
Το ποσοστό των μολυσμένων είτε με *R.typhi* ή με *R.felis* ψύλλων, ήταν σημαντικά υψηλότερο στην επαρχία της Λευκωσίας ($p<0,001$).

ΠΙΝΑΚΑΣ 24. Εκτοπαράσιτα τρωκτικών μολυσμένα με ρικέτσιες

	No of tested fleas	PCR θετικοί N (%)	*Rickettsia spp.*	Ξενιστής	**Περιοχή**
X. cheopis	400	20	16 *R .typhi* 4 *R.felis*	2 *RR*-12 *RN*	10 localities 3 localities
C. felis	250	14 (5,6)	14 *R.felis*	4 *RR*- 10 *RN*	8 localities
L. segnis	45	3	3 *R .typhi*	2 *RR*	2 localities
C. canis	5	-			
N. fasciatus	7	-			
Σύνολο	457	23			



Χάρτης 9 *C. felis* infected by *Rickettsia felis* as determined using the Geographic Information System technology (GIS), Microsoft Access, ArcView V8.1.

3.2.1.3.5. Ανίχνευση και τυποποίηση *Bartonella sp* sp σε ψύλλους που παρασιτούσαν τρωκτικά

Το εξαχθέν DNA από κάθε ψύλλο, ελέγχθηκε με τη μέθοδο της PCR με τη χρήση των εναρκτών QHVE1 και QHVE3, οι οποίοι πολλαπλασιάζουν ένα τμήμα DNA της 16S-23S rRNA intergenic spacer (ITS). Το μέγεθος του προιόντος ποικίλει και είναι διαφορετικό ανάλογα με το είδος της *Bartonella* (Norman *et al.* 1995). Ακολούθως, τα αποτελέσματα του πρώτου PCR επιβεβαιώθηκαν με ένα δεύτερο γενωμικό πολλαπλασιασμό σε μια αντίδραση PCR με τη χρήση του ζεύγους εναρκτών BhCS.781p και BhCS.1137n, οι οποίοι πολλαπλασιάζουν ένα τμήμα (339-bp) του γονιδίου *glt*A των ειδών της *Bartonella* (De Sousa *et al.* 2006).

Σε 11 ψύλλους από τους 457 που ελέγχθηκαν (χ %) ανιχνεύτηκε *Bartonella* spp DNA και με τα δυο γονίδια (ITS και *glt*A-based PCR assays). Από τους 11 ψύλλους θετικούς 7 ήταν *X. cheopis, 2 C. felis* και 2 *L. segnis*.

Σε 5 ψύλλους *X. cheopis* η ανάλυση της αλληλουχίας των βάσεων των ITS (576 bp) και *glt*A (339 bp) προιόντων της PCR έδειξε ομοιότητα 100% με τις αποθηκευμένες στην Gen Bank αλληλουχίες AY877424 and AY877422 αντίστοιχα.. Τα παραπάνω στελέχη τα οποία είναι συγγενή με την *B. Elizabethae*, έχουν επίσης ανιχνευτεί και στην Πορτογαλία στα ίδια είδη ψύλλων (Marie *et al.* 2006). Συγκεκριμένα εμφανίζουν ομοιότητα 93.0% (536/576 bp) και 97.9% (331/339) για το ITS και *glt*A γονίδιο αντίστοιχα, με τις αντίστοιχες αλληλουχίες της *B. Elizabethae*.

Αλληλουχίες βάσεων με μεγάλη ομοιότητα (92.4% για το ITS και 97.0% για το *glt*A) με την *B. elizabethae* ελήφθησαν και από την ανάλυση της αλληλουχίας των βάσεων των ITS (576 bp) και *glt*A (339 bp) προιόντων της PCR σε 1 ψύλλο L.segnis. Διαπιστώθηκε ομοιότητα 100% με τις αποθηκευμένες στην Gen Bank αλληλουχίες AY877425 και AY877423 αντίστοιχα. Στελέχη τα οποία είναι συγγενή με την *B. Elizabethae*, έχουν επίσης ανιχνευτεί σε ψύλλους τρωκτικών και στο Αφγανιστάν (Li *et al.* 2007). Σε 2 ψύλλους *X. cheopis* η ανάλυση της αλληλουχίας των βάσεων έδειξε ομοιότητα 100% με την *Bartonella tribocorum*. Αυτό το είδος μπαρτονέλλας έχει βρεθεί σε ψύλλους *Xenopsylla cheopis από τρωκτικά του γένους Rattus στην Κίνα (Audoin-Rouzeau 1999)*. Σε 3 ψύλλους 2 *Rattus norvegicus* (*2* του είδους *C. felis.* και του είδους 1 *L. Segnis*) τυποποιήθηκε ένας νέος γονότυπος *(*Novel *Bartonella* genotype) με 90% ομοιότητα με ένα μη καταταχθέν στέλεχος (unnamed *Bartonella sp :* strain CtF4YN, AY566176).

ΠΙΝΑΚΑΣ 25. Εκτοπαράσιτα τρωκτικών μολυσμένα με μπαρτονέλλες

Είδος ψύλλου	**Ελέγχθηκαν No**	**Θετικό PCR No (%)**	***Bartonella sp***	
X. cheopis	400		5 2	*B. elizabethae* *Bartonella tribocorum*
C. felis	250		2	*Bartonella sp* strain CtF4YN
L. segnis	45		1 1	*Bartonella sp* strain CtF4YN *B. elizabethae*
C. canis	5			
N. fasciatus	7			
Σύνολο	457		**11**	

3.2.1.4. Γονοτυπική ανίχνευση και τυποποίηση *Rickettsia* spp και *Bartonella* spp στους ψύλλους που παρασιτούσαν σε γάτες

127 ψύλλοι (96 *Ctenocephalides felis* και 31 *Ctenocephalides Canis*) που συλλέχθηκαν από 38 γάτες ελέγχθηκαν για τη γονοτυπική ανίχνευση *Rickettsia spp* και *Bartonella spp*.

Από τους 96 *Ctenocephalides felis* 23 (24%) ήταν μολυσμένοι είτε με ρικέτσιες (9/96; 9,3%) είτε με μπαρτονέλλες (14/96; 14,6%). Δεν ανιχνεύτηκε *Bartonella spp* DNA σε ψύλλους του είδους *C. Canis.*

Για την ανίχνευση ρικετσιών έγινε χρήση ειδικών εναρκτών για το gltA γονίδιο. Με τη χρήση των ειδικών εναρκτών για το gltA γονίδιο, πολλαπλασιάστηκε ένα DNA προιόν περίπου 381 ζευγών βάσεων σε 9 από τους 96 ψύλλους του είδους *Ctenocephalides felis* (πίνακας 26). Στη συνέχεια τα αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν με μια δεύτερη PCR με ζεύγος ειδικών εναρκτών για το γονίδιο rOmpB. Η ανάλυση της αλληλουχίας των βάσεων των προιόντων των PCR έδειξε 100% ομολογία με τη *R.felis* (GenBank accession no. AF516333 και Genbank accession no. U33922).

Η γενετική ανάλυση για την ανίχνευση *Bartonella spp* βασίστηκε στον γενωμικό πολλαπλασιασμό για δυο ανεξάρτητες αλληλουχίες γονιδίων (its gene, pap31) με αντίστοιχους ειδικούς εναρκτές. Ακολουθούσε μετέπειτα ανάλυση της αλληλουχίας των βάσεων του DNA στα προιόντα του PCR για τον προσδιορισμό του είδους.

Με τη χρήση των ειδικών εναρκτών για το ITS γονίδιο (για τον πολλαπλασιασμό *Bartonella* spp.), ελήφθησαν PCR προιόντα σε 14 ψύλλους *Ctenocephalides felis*.

Η ανάλυση της αλληλουχίας των βάσεων των προιόντων του γενωμικού πολλαπλασιασμού με τη χρήση του ITS γονιδίου έδειξαν 100% ομοιότητα με την *B.henselae* (GenBank accession no. AF312496 και Genbank accession no. AF369527) σε 11 ψύλλους. Ακολούθως, ο γενωμικός πολλαπλασιασμός με τη χρήση του pap31 (partial sequence) έδωσε ένα προιόν DNA 257-bp. Η ανάλυση της αλληλουχίας των βάσεων αυτού του τμήματος του DNA έδειξε 100% ομοιότητα με τις αντίστοιχες αλληλουχίες της *B.henselae* (GenBank accession n. AF001274).

Σε 3 ψύλλους η ανάλυση της αλληλουχίας των βάσεων των προιόντων του γενωμικού πολλαπλασιασμού με τη χρήση του ITS γονιδίου έδειξε 99% ομοιότητα με την *B. clarridgeiae* (B. clarridgeiae (GenBank accession no. AF312497).

Πίνακας 26 Βαθμός μόλυνσης ψύλλων απομονωθέντων από γάτες από *Bartonella* spp. και *Rickettsia felis*

	Σύνολο ψύλλων No	PCR positive N (%)		
		Rickettsia felis	*B.henselae*	*B. clarridgeiae*
C. felis	96	9 (9.3%)	*11* (11.5%)	*3* (3%)
C. canis	31	-		
Σύνολο	127	9	11	3

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι λοιμώξεις που μεταδίδονται από αρθρόποδα -arthropod-borne (ARBO) infections - είναι κατηγορία λοιμώξεων στις οποίες στη σχέση παθογόνου παράγοντα και σπονδυλωτού ξενιστή (συμπεριλαμβανομένου του ανθρώπου, ο οποίος συνήθως είναι τυχαίος ξενιστής), παρεμβάλλεται αναγκαστικά αιμομυζητικό αρθρόποδο του οποίου ο ρόλος στην εξέλιξη και διασπορά του παρασίτου είναι σημαντικός.

Τα αρθρόποδα λειτουργούν σαν μεταβιβαστές, ξενιστές ή υπόδοχα πολλών ειδών παθογόνων μικροργανισμών. Είδη που παρασιτούν τον άνθρωπο και τα ζώα είναι σημαντικοί μεταβιβαστές ιών, βακτηρίων, πρωτοζώων. Με ελάχιστες εξαιρέσεις, η σχέση των βακτηρίων με τα αρθρόποδα μπορεί να χαρακτηριστεί ήπια και ισορροπημένη ως αποτέλεσμα μακρόχρονης εξελικτικής συμβίωσης. Συνήθως τα βακτήρια πολλαπλασιάζονται στο μέσο έντερο του αρθροπόδου ή/και στην αιμόλεμφο του, χωρίς να προκαλούν εμφανείς παρενέργειες στις ζωτικές λειτουργίες του αρθροπόδου. Σε κάποια είδη αρθροπόδων έχει αποδειχθεί ότι συμβαίνει κάθετη (transovarial:διαωοθηκική) μετάδοση βακτηρίων (π.χ ρικέτσιες). Σ' αυτές τις περιπτώσεις το αρθρόποδο εκτός από μεταβιβαστής λειτουργεί και σαν υπόδοχο (reservoir) του παθογόνου, συμβάλλοντας με τον τρόπο αυτό στη διατήρηση του παθογόνου στη φύση.

Η γεωγραφική κατανομή των μεταβιβαστών συνήθως ακολουθεί τη γεωγραφική κατανομή των παθογόνων που μεταφέρουν και επομένως η διασπορά τους αποτελεί δείκτη για την διασπορά των παθογόνων που μεταφέρουν. Ο έλεγχος επομένως των αρθροπόδων-διαβιβαστών και ο προσδιορισμός των παθογόνων που μεταφέρουν, μπορεί να καθορίσει "high risk" περιοχές για τα παθογόνα. Το παραπάνω έχει ιδιαίτερη αξία στις περιπτώσεις που λειτουργούν ταυτόχρονα σαν μεταβιβαστές και σαν reservoirs.

Γενικά, ο κίνδυνος (risk) για τη μετάδοση μικροοργανισμών που έχουν μεταβιβαστές αρθρόποδα όπως οι ζωονόσοι που μελετήθηκαν στην παρούσα μελέτη και συνεπώς ο επιπολασμός τους, εξαρτάται από παραμέτρους όπως: (1) τον επιπολασμό των μολυσμένων με το παθογόνο αρθροπόδων-μεταβιβαστών, ο οποίος μπορεί να διαφέρει σε διάφορες περιοχές (2) τη συγγένεια (affinity) ενός συγκεκριμένου αρθροπόδου με τον άνθρωπο (3) την παρουσία –αφθονία (abundance) των πληθυσμών του συγκεκριμένου σε κάθε περίπτωση αρθροπόδου, που

επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες που έχουν σχέση με κλιματολογικές οικολογικές και περιβαλλοντικές συνθήκες και την οικογεωγραφία της κάθε περιοχής και (4) την παρουσία επιδεκτικών θηλαστικών-ξενιστών.

Η παρούσα εργασία είναι μια οικογεωγραφική μελέτη των μπαρτονελλώσεων και των ρικετσιώσεων στην Κύπρο, με έμφαση στη ρικέτσια του Ενδημικού Τύφου (Καφετζής).

Κατά τη διάρκεια της μελέτης, αναζητήθηκαν και προσδιορίστηκαν αρθρόποδα-μεταβιβαστές που παρασιτούν τα τρωκτικά και τις γάτες στην Κύπρο. Διερευνήθηκε η παρουσία και προσδιορίστηκε η διασπορά και ο ο επιπολασμός των υπεύθυνων αιτιολογικών παραγόντων (*Rickettsia sp*. και *Bartonella sp*.) για τις παραπάνω ζωονόσους στα θηλαστικά-ξενιστές και τους μεταβιβαστές. Πιο συγκεκριμένα, προσδιορίστηκε ο ορο-επιπολασμός των IgG αντισωμάτων της *R. typhi* (Ενδημικός Τύφος), και της *Bartonella henselae* σε τρωκτικά του γένους *Rattus* και σε γάτες. *Rickettsia sp*. και *Bartonella sp*. ανιχνεύτηκαν με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) σε θηλαστικά- ξενιστές (τρωκτικά, γάτες) και στα εκτοπαράσιτά τους. Τα τρωκτικά, οι γάτες και τα εκτοπαράσιτα τους χρησιμοποιήθηκαν σαν δείκτες (indicators) της παρουσίας και της διασποράς παθογόνων βακτηρίων που ανήκουν στα γένη *Rickettsia sp*. και *Bartonella sp*. Ο βαθμός μόλυνσης και η γεωγραφική κατανομή των μολυσμένων θηλαστικών και των εκτοπαρασίτων τους (ψύλλοι) λειτούργησαν σαν δείκτης για να εντοπιστεί και να αναδειχτεί το κάθε παθογόνο και να υποδειχτούν συγκεκριμένες περιοχές κινδύνου.
Έμφαση και αναλυτικότερη μελέτη έγινε για τον ΕΤ. Η *Rickettsia felis* και οι μπαρτονελλώσεις μελετήθηκαν για πρώτη φορά στην Κύπρο. Από τη μελέτη προέκυψαν σημαντικά συμπεράσματα για την επιδημιολογική αλυσίδα, και παράγοντες κινδύνου για τη μετάδοση των παραπάνω παθογόνων.

Ένα γενικό συμπέρασμα που προέκυψε είναι ότι υπάρχουν όλες οι προυποθέσεις για τη μετάδοση των flea-borne ρικετσιών και μπαρτονελλών στην Κύπρο.

Αναλυτικότερα:

Προσδιορίστηκαν τα είδη των αρουραίων που ενδημούν στην Κύπρο, και η γεωγραφική κατανομή τους. Προσδιορίστηκαν επίσης τα εκτοπαράσιτα-μεταβιβαστές των υπό μελέτη παθογόνων. Το συμπέρασμα που προέκυψε είναι ότι ο

πληθυσμός των αρουραίων, που εποικούν την Κύπρο, είναι μεγάλος και αποτελούν σοβαρό κίνδυνο για τη δημόσια υγεία, ιδιαίτερα στις περιπτώσεις που οι πληθυσμοί τους αυξάνονται ανεξέλεγκτα. Τα τρωκτικά είναι φυσικοί ξενιστές και μπορούν να μεταδώσουν σε ανθρώπους και ζώα περισσότερους από 24 διαφορετικούς μολυσματικούς παράγοντες είτε άμεσα, είτε έμμεσα μέσω των αρθροπόδων που παρασιτούν σ' αυτά τα οποία λειτουργούν σαν μεταβιβαστές (ψύλλοι, κρότωνες, ακάρεα). Ο ρόλος τους στη μετάδοση ασθενειών (είτε άμεσα είτε έμμεσα), καθώς και στην εξάπλωσή τη διασπορά και τη διατήρηση στη φύση παθογόνων παραγόντων είναι ιδιαίτερα σημαντικός. Στην ελεύθερη Κύπρο βρέθηκαν 2 είδη αρουραίων ο Rattus rattus frugivorus ο «μαύρος αρουραίος» που προκαλεί ζημιές στη γεωργική και ζωϊκή παραγωγή, ο R. norvegicus ο καστανός ή νορβηγικός αρουραίος. Τα τρωκτικά του γένους *Rattus* (*R. rattus* και *R. norvegicus*), είναι είδη διαδεδομένα παγκοσμίως, αποτελούν τα πιο πολυάριθμα συμβιούντα ζώα σε αστικό περιβάλλον, και μοιράζονται ανθρώπινους βιότοπους. Ιδιαίτερα ευνοικό περιβάλλον για την εξάπλωσή τους είναι παραθαλάσσιες περιοχές με ζεστό κλίμα. Τα παραπάνω είδη διαδραματίζουν ένα πολύ σημαντικό ρόλο στην επιδημιολογική αλυσίδα διάφορων ζωονόσων στην οποία συμβάλλουν διάφορα είδη αρθροπόδων, κυρίως οι ψύλλοι. Τα εκτοπαράσιτα τρέφονται από αίμα του θηλαστικού-ξενιστή, μολύνονται και μεταδίδουν παθογόνους παράγοντες στον άνθρωπο και σε άλλα ζώα. Ο «μαύρος αρουραίος» (*Rattus rattus frugivorus*) είναι γνωστό ότι εποικούσε την Ευρώπη από την Ρωμαϊκή εποχή. Μέσα από το πέρασμα του χρόνου, ο πληθυσμός των αρουραίων αυξήθηκε και επεκτάθηκε προς διάφορες κατευθύνσεις, εξηγώντας έτσι τη γεωγραφική ποικιλομορφία των επιδημιών χολέρας, που είχαν ως αποτέλεσμα τη σημαντική δημογραφική ύφεση και υπονόμευση της υγείας και της οικονομίας του Ευρωπαϊκού κόσμου (Audoin-Rouzeau 1999). Το μεγαλύτερο ποσοστό (64.6%) των συλληφθέντων αρουραίων ήταν του είδους *R. norvegicus*, με ευρεία διασπορά σ΄ όλο το νησί και με έντονη παρουσία στην επαρχία Λευκωσίας. Είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι σε αντίθεση με τον *R. rattus,* ο *R. norvegicus* δεν ήταν ενδημικό είδος αλλά εισήχθη στην Κύπρο μέσω πλοίου στο λιμάνι της Λεμεσού πριν αρκετά χρόνια και πιστευόταν ότι η εξάπλωσή του ήταν περιορισμένη σε περιοχές του λιμένα Λεμεσού. Τα αποτελέσματα αυτά αναθεωρούν την παραπάνω άποψη. Φαίνεται ότι το είδος *R. norvegicus*, έχει εξαπλωθεί σε όλη την Κύπρο, και ενδημεί περισσότερο στις κατοικημένες περιοχές περιλαμβανομένων και των κτηνοτροφικών μονάδων.

Στα τρωκτικά αλλά και στις γάτες, εντοπίστηκαν να παρασιτούν εκτοπαράσιτα, κυρίως ψύλλοι. Η ομάδα αυτή των αρθροπόδων περιλαμβάνει > από 2.000 είδη, πολλά από τα οποία έχουν παγκόσμια κατανομή. Παρασιτούν πολλά είδη σπονδυλωτών (άγρια θηλαστικά και πτηνά καθώς και οικόσιτα ζώα) και λειτουργούν σαν μεταβιβαστές σημαντικών ζωονόσων όπως η πανώλη (*Yersinia pestis*), ο ενδημικός τύφος (*Rickettsia typhi*),ο fleaborne κηλιδώδης πυρετός (*R. felis*), καθώς και των μπαρτονελλώσεων. Οι ψύλλοι δεν παραμένουν υποχρεωτικά σταθεροί στον ξενιστή τους. Κάποια είδη έχουν αποκλειστική προτίμηση (highly host specific) σε κάποιο συγκεκριμένο θηλαστικό-ξενιστή, ενώ άλλα είδη είναι περισσότερο «καθολικά» και έχουν την ικανότητα να προσαρμόζονται σε ένα μεγάλο αριθμό ξενιστών, ειδικά όταν απουσιάζει ο προτιμητέος ξενιστής. Έτσι παρατηρείται μετακίνηση τους σε νέους ξενιστές, και κατά την διάρκεια ζωής των ξενιστών αλλά κυρίως μετά τον θάνατο τους (Azad *et al.* 1997). Ιδιαίτερα ενδιαφέρουν τα είδη που λειτουργούν σαν μεταβιβαστές παθογόνων στον άνθρωπο Είδη που έχουν προτίμηση στον άνθρωπο είναι τα παρακάτω: *Pulex irritans, C. canis, C. felis, Ceratophyllus gallinae, Ceratophyllus columbae,* και *Archaeopsylla erinacei*. Η μετάδοση της μπαρτονέλλας και της ρικέτσιας μπορεί να γίνει από την επαφή περιττωμάτων μολυσμένων ψύλλων με πληγές ή δερματικές εκδορές (Foil *et al.* 1998) αλλά και απευθείας από το τσίμπημα του ψύλλου (Azad *et al.* 1997).

Ένα υψηλό ποσοστό (40%) των τρωκτικών που συλλέχθηκαν έφεραν εκτοπαράσιτα τα οποία σχεδόν στο σύνολό τους ήταν ψύλλοι. Παρατηρήθηκε ευρεία γεωγραφική διασπορά των τρωκτικών που παρασιτούνταν από εκτοπαράσιτα. Ο βαθμός παρασιτισμού ήταν μεγάλος, με υψηλό παρασιτικό φορτίο ιδιαίτερα στην επαρχία της Λευκωσίας. Στα συλληφθέντα τρωκτικά παρατηρήθηκε ένας μεγάλος αριθμός εκτοπαρασίτων γεγονός που υποδηλώνει κινδύνους ανάπτυξης και διασποράς ζωονόσων (ενδημικός τύφος, μπαρτονελλώσεις) μέσω αυτού του είδους αρθρόποδων -μεταβιβαστών. Αντίθετα δεν φαίνεται να έχουν ιδιαίτερο ρόλο οι κρότωνες. Από τα τρωκτικά που παρασιτούνταν από ψύλλους, το μεγαλύτερο ποσοστό 76.6% ήταν του είδους *Rattus norvegicus*, ενώ το μεγαλύτερο μέρος είχε συλληφθεί τους μήνες του καλοκαιριού (43.3%) και του φθινοπώρου (33.7%). Προσδιορίστηκαν 5 είδη ψύλλων, όμως στο μεγαλύτερο μέρος τους, οι ψύλλοι που παρασιτούσαν τα τρωκτικά ήταν του είδους *Xenopsylla cheopis* (70,34%), και *Ctenocephalides felis* (24,22%). Τα παραπάνω είδη είναι γνωστοί μεταβιβαστές

παθογόνων (*R.typhi, R.felis, Bartonella sp.*κλπ). Είναι σημαντικό επίσης να σημειωθεί ότι τα είδη αυτά παρασιτούν και τον άνθρωπο. Ο *C. felis* είναι κοινό εκτοπαράσιτο περιοικιακών ζώων, κυρίως όμως και συχνότερα παρασιτεί τις γάτες. Το παραπάνω έχει ιδιαίτερο επιδημιολογικό ενδιαφέρον. Ο μεταβιβαστής αυτός ενδεχομένως να λειτουργεί σαν «γέφυρα» για τη μεταφορά του παθογόνου με το οποίο είναι μολυσμένος από άγρια σε περιοικιακά ζώα, εγγύτερα δηλαδή στο περι-οικιακό περιβάλλον του ανθρώπου. Αν στα παραπάνω προστεθεί και το γεγονός ότι για κάποια παθογόνα όπως η *R.typhi* και η *R. felis* συμβαίνει κάθετη μετάδοση στον ψύλλο, η δυνατότητα διασποράς και συντήρησης της μόλυνσης είναι πολύ μεγάλη. Στην παρούσα μελέτη περιγράφουμε για πρώτη φορά την παρουσία 3 ειδών μπαρτονέλλας και της *R.typhi* σε τρωκτικά καθώς και την παρουσία δύο ειδών μπαρτονέλλας και δυο ειδών ρικέτσιας σε ψύλλους τρωκτικών της Κύπρου. Στα τρωκτικά ανιχνεύτηκαν *Bartonella tribocorum*, Bartonella elizabethae, *Bartonella rattimassiliensis* sp. και η R.typhi. Ρικετσιακό DNA και/ή Bartonella DNA ανιχνεύτηκε με τη μέθοδο της PCR σε 3 από τα 5 είδη των ψύλλων των τρωκτικών. 10.5% των ψύλλων των τρωκτικών που ελέγχθηκαν ήταν μολυσμένοι με ρικετσιακό ή *Bartonella sp* DNA. Στους ψύλλους των τρωκτικών ανιχνεύτηκαν 5 διαφορετικά βακτήρια: *R. typhi*, *R. felis, B. elizabethae, Bartonella tribocorum* και ένα μη τυποποιηθέν στέλεχος *Bartonella sp* όμοιο γενετικά με το περιγραφέν στέλεχος strain CtF4YN. Τα 4 από τα παραπάνω (*R. felis, B. elizabethae, Bartonella tribocorum,* strain CtF4YN) περιγράφονται για πρώτη φορά στο νησί. Τα 3 από τα παραπάνω *(R. typhi*, *R. felis, B. elizabethae)* είναι αποδειγμένα παθογόνα για τον άνθρωπο.

Οι γάτες εμφάνισαν αρκετά υψηλά επίπεδα παρασιτισμού (52,7% από τις γάτες παρασιτούνταν από ψύλλους), με υψηλό παρασιτικό φορτίο όπως και τα τρωκτικά. Προσδιορίστηκαν 2 είδη ψύλλων, ο Ctenocephalides felis και ο Ctenocephalides canis από τους οποίους οι περισσότεροι (75,6%), ήταν Ctenocephalides felis. Στο 14,58% των ψύλλων που απομονώθηκαν από γάτες ανιχνεύτηκε *Bartonella* DNA. Πιο συγκεκριμένα το 11,4% των ψύλλων που ελέγχθηκαν βρέθηκαν μολυσμένοι με *B. Henselae* ενώ το 3,1% με την B. Clarridgeiae. Ολοι οι θετικοί ψύλλοι ήταν του είδους *Ctenocephalides felis.*

Πιο συγκεκριμένα:

Ενδημικός Τύφος (Καφετζής)

Ο ενδημικός τύφος που προκαλείται από την *Rickettsia typhi* αποτελεί παράδειγμα παθογόνου ρικετσιακού στελέχους που μεταδίδεται στους ανθρώπους, μέσω του ψύλλου και έχει σαν δεξαμενή (reservoir) τα τρωκτικά. Στην Κύπρο, στο παρελθόν έχουν χαρακτηριστεί ενδημικές εστίες του ΕΤ και αναφέρονται κάθε χρόνο κρούσματα σποραδικά ή με τη μορφή επιδημίας. Προηγούμενη μελέτη από τις Κτηνιατρικές Υπηρεσίες της Κύπρου σε συνεργασία με το Εργαστήριο Βακτηριολογίας, Παρασιτολογίας, Ζωονόσων, και Γεωγραφικής Ιατρικής, του Πανεπιστημίου Κρήτης, οδήγησε στο συμπέρασμα ότι ο Ενδημικός Τύφος αποτελεί σημσντικό πρόβλημα υγείας για την Κύπρο. Συγκεκριμένα, κατά τη χρονική περίοδο από το καλοκαίρι του 1996 μέχρι το φθινόπωρο του 1997 καταγράφηκαν 53 κρούσματα ασθενών με ΕΤ, τα περισσότερα (39) από τα οποία είχαν εκδηλωθεί με τη μορφή επιδημίας και προέρχονταν από την επαρχία Λευκωσίας (2 χωριά). Σε επόμενη μελέτη κατά την οποία έγινε διερεύνηση του περιβάλλοντος των ασθενών τα κρούσματα συσχετίστηκαν με την παρουσία αρουραίων στις περιοχές που είχαν εμφανιστεί τα κρούσματα. *Η R.typhi* είχε βρεθεί σε αρουραίους ενώ τα ποσοστά μόλυνσης των ψύλλων τους κυμάνθηκε από 2,5% έως 15%. Στην παρούσα μελέτη, από την ανά επαρχία μελέτη της κατανομής των συλληφθέντων τρωκτικών, προέκυψε ότι το 1/3 (33%) των τρωκτικών που συλλέχθηκαν, προέρχονταν από την επαρχία της Λευκωσίας. Είναι αξιοσημείωτο ότι η παρουσία των τρωκτικών ήταν ιδιαίτερα έντονη στην ευρύτερη περιοχή στην οποία είχαν σημειωθεί κρούσματα το 1996 και το 1997. Απ' αυτή την περιοχή καταγράφονται σταθερά τα περισσότερα κρούσματα ΕΤ τα χρόνια που ακολούθησαν (αρχείο Κτηνιατρικών Υπηρεσιών Κύπρου) (Koliou *et al.* 2007). Φαίνεται πως η εστία παραμένει ενεργή. Ενδεχομένως η επιδημιολογική αλυσίδα της λοίμωξης στην επαρχία αυτή χρήζει περαιτέρω μελέτης.

Από τον έλεγχο των υποδόχων και των μεταβιβαστών για την έμμεση ή άμεση ανίχνευση της *R.typhi* παρατηρήθηκε ευρεία διασπορά της *R.typhi* στα υπόδοχα και τους μεταβιβαστές. Διαπιστώθηκε υψηλός βαθμός έκθεσης των αρουραίων στη *R.typhi*: 48.6% από τα τρωκτικά που ελέγχθηκαν εμφάνισαν αντισώματα έναντι της *R.typhi*. Παρατηρήθηκε διασπορά των οροθετικών για *R.typhi* ζώων σε όλες τις επαρχίες (η οροθετικότητα κυμάνθηκε από 40,42% έως 65,07%). Να σημειωθεί ότι

το αυξημένο ποσοστό θετικών τρωκτικών συμφωνεί με ευρήματα προηγούμενων μελετών στην Κύπρο στις οποίες είχε βρεθεί ότι υψηλό ποσοστό του πληθυσμού (47%) εμφανίζει ορολογική ένδειξη παρελθούσας λοίμωξης από *R.typhi* (Psaroulaki 1998)

Παράγοντες με σημαντική συσχέτιση με την οροθετικότητα για τη *R. typhi* ήταν: το είδος του τρωκτικού, με περισσότερα οροθετικά ζώα του είδους *R. norvegicus* από εκείνα του είδους *R. rattus*, η περιοχή και η εποχή. Από την ανά μήνα μελέτη της παρουσίας των τρωκτικών (υποδόχων της *R. typhi*) παρατηρήθηκε μια αύξηση των πληθυσμών τους κατά τους καλοκαιρινούς μήνες και το φθινόπωρο (Ιούλιος – Νοέμβριος). Ο μήνας με την εντονότερη παρουσία των αρουραίων ήταν ο Σεπτέμβριος. Περισσότερα οροθετικά ζώα παρατηρήθηκαν το φθινόπωρο (43.2%) και το καλοκαίρι (39.4%). Αυξημένα επίπεδα παρασιτισμού των αρουραίων από ψύλλους παρατηρήθηκε επίσης κατά το ίδιο χρονικό διάστημα. Οι παραπάνω παρατηρήσεις συμφωνούν με την εποχιακή κατανομή του ΕΤ στον ανθρώπινο πληθυσμό στην Κύπρο, όπως έχει προκύψει από προηγούμενες μελέτες. Τα περισσότερα κρούσματα εκδηλώνονται το καλοκαίρι και αρχές του φθινοπώρου. Η αυξημένη συχνότητα κρουσμάτων ΕΤ στην Κύπρο κατά τους καλοκαιρινούς μήνες και το φθινόπωρο (Ιούλιος – Νοέμβριος), πρέπει να αναζητηθούν στις κλιματολογικές συνθήκες που επικρατούν και στην αύξηση του πληθυσμού των αρουραίων. Η οροθετικότητα για τη *R. typhi* είχε σημαντική συσχέτιση με την παρουσία εκτοπαρασίτων στο ζώο, και πιο συγκεκριμένα η οροθετικότητα συσχετίστηκε με τον παρασιτισμό του τρωκτικού από τον ψύλλο του είδους *X.cheopis*. Η παρουσία του *X.cheopis* στα τρωκτικά αύξησε the odds of being positive for *R. typhi* by a factor of 2.2. Σε 7 δείγματα ιστών από τρωκτικά ανιχνεύτηκε μετά από εφαρμογή των μεθόδων PCR-RFLP PCR-sequencing analysis η *R.typhi*. Επιπλέον, η *R. typhi* ανιχνεύτηκε στο 4% των ψύλλων του είδους *X. cheopis* και στο 6,6% των ψύλλων του είδους L. Segnis που παρασιτούσαν τρωκτικά. Ένα υψηλό ποσοστό (45%) των θετικών ψύλλων ήταν θηλυκού γένους. Αυτό είναι ένα σημαντικό στοιχείο, γιατί υποδηλώνει τον κίνδυνο παραπέρα διασποράς της *R.typhi*, αν ληφθεί υπ' όψιν, η δυνατότητα κάθετης μετάδοσης της *R.typhi* στον ψύλλο. Το μεγαλύτερο ποσοστό μολυσμένων με *R.typhi* ψύλλων παρατηρήθηκε στην επαρχία της Λευκωσίας. Ο βαθμός μόλυνσης που αναφέρεται από ανάλογες μελέτες για τα παραπάνω είδη αρουραίων και τους ψύλλους τους ποικίλουν από περιοχή σε περιοχή, και εξαρτάται κάθε φορά από την

ενδημικότητα του ΕΤ σε μια ορισμένη περιοχή. Σε μελέτες στην Αιθιοπία, και Αίγυπτο, ο βαθμός μόλυνσης των τρωκτικών κυμάνθηκε από 1% έως 46%, (Azad *et al.* 1990). Σε ενδημικές περιοχές, τα ποσοστά μόλυνσης για ψύλλους, συλλεχθέντες από *R. rattus* ποικίλουν από 3,2% μέχρι 9,7% για τον *X.cheopis* (Azad *et al.* 1990). Στην Ελλάδα, σε ενδημικές για τον ΕΤ περιοχές (2 εστίες ΕΤ στην Εύβοια και τα Χανιά) ο βαθμός μόλυνσης των *R.norvegicus* κυμάνθηκε από 25% έως 90% με μεγαλύτερο ποσοστό στην Εύβοια, ενώ των R.rattus 33,3 % (Chaniotis; Psaroulaki 1998; Gikas *et al.* 2004). Σε διάφορες ενδημικές περιοχές των ΗΠΑ, στις οποίες εκτός των τρωκτικών και άλλα ζώα φέρονται ως υπόδοχα του ΕΤ, ο βαθμός μόλυνσης των ψύλλων του είδους *C.felis* κυμάνθηκε από 0,8% έως 16,7% για την *R. typhi*, ενώ 4% - 40% των γατών και 31,4% - 90% των opossums από τα οποία συλλέχθηκαν τα παραπάνω αρθρόποδα εμφάνισαν αντισώματα έναντι της *R. Typhi*. Επίσης, 5,6% των αρουραίων εμφάνισαν αντισώματα έναντι της R. Typhi, ενώ ο βαθμός μόλυνσης των ψύλλων τους *X. cheopis* ήταν 2,8 % (Williams *et al.* 1992; Sorvillo *et al.* 1993; Schriefer *et al.* 1994; Azad *et al.* 1997).

Από επιδημιολογικές μελέτες σε επιμένουσες ενδημικές εστίες στην Καλλιφόρνια και το Τέξας είχε διαπιστωθεί ότι οι παράγοντες του κλασσικού κύκλου μετάδοσης του ΕΤ απουσίαζαν σε περιοχές με ανθρώπινα κρούσματα, ενώ αντίθετα ανιχνεύτηκε ή απομονώθηκε η *R.typhi* από γάτες, opossums, και από τους ψύλλους τους (*Ctenocephalides felis*). Με βάση τις παραπάνω διαπιστώσεις, είχε διατυπωθεί η άποψη ότι πιθανόν παράλληλα με τον κλασσικό ενζωοτικό κύκλο μετάδοσης της *R.typhi*, (αρουραίος- ψύλλος-αρουραίος), να λειτουργούν εναλλακτικοί κύκλοι στους οποίους ως υπόδοχα λειτουργούν και άλλα θηλαστικά (Azad *et al.* 1992; Schriefer *et al.* 1994). Πιο συγκεκριμένα διατύπωσαν την άποψη ότι παράλληλα με τον κλασσικό κύκλο λειτουργούν κύκλοι στους οποίους εμπλέκονται περιοικιακά ζώα, όπως είναι οι γάτες, οι σκύλοι, το μαρσιποφόρο ζώο opossum (*Didelphis virginiana*) και οι ψύλλοι τους (*Ctenocephalides felis*) (Adams *et al.* 1970; Williams *et al.* 1992; Sorvillo *et al.* 1993).

Από τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης προκύπτει το συμπέρασμα ότι οι γάτες δεν φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο σαν υπόδοχα. Σε σύγκριση με τα τρωκτικά τα ποσοστά των μολυσμένων με *R.typhi* γατών (19,4%) ήταν σχετικά χαμηλά, ενώ δεν ανιχνεύτηκε ρικετσιακό DNA στις γάτες, ούτε στα εκτοπαράσιτά τους. Εξ' άλλου, σε προηγούμενη οροεπιδημιολογική μελέτη που έγινε το 1997 σε

ανθρώπινο πληθυσμό στην Κύπρο, είχαν προκύψει ανάλογα αποτελέσματα: δεν παρατηρήθηκε αυξημένη οροθετικότητα στα άτομα που στο οικιακό ή εργασιακό περιβάλλον τους ανέφεραν την ύπαρξη σκύλων ή γάτας (Psaroulaki 1998). Όπως αποδείχτηκε στο μέρος της μελέτης που αφορούσε στα τρωκτικά, το κύριο reservoir της *R. typhi* είναι οι αρουραίοι οι οποίοι βρέθηκαν σε μεγάλο βαθμό μολυσμένοι με το βακτήριο. Οι ψύλλοι, οι οποίοι παρασιτούν και τρέφονται πάνω σ' ένα μολυσμένο αρουραίο, αποβάλλουν τη *R. typhi* στα περιττώματά τους. (Walker D. Boca book). Οι γάτες είναι κοινοί θηρευτές των τρωκτικών και ενδεχομένως να μολύνονται με τη *R. typhi* κατά τη θήρευση μολυσμένων τρωκτικών, είτε μέσω της άμεσης επαφής με μολυσμένα περιττώματα ψύλλων, είτε με έκθεσή τους σε μολυσματική σκόνη (dust-borne aerosols) κατά τη διάρκεια της θήρευσης ή στις φωλιές των τρωκτικών. Επιπλέον, βρέθηκαν είδη ψύλλων (*C. felis)* που παρασιτούν και τους αρουραίους και τις γάτες. Τα αποτελέσματα μας είναι σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες στις οποίες έχει δειχθεί ότι οι μολυσμένες γάτες παράγουν αντισώματα έναντι της *R. typhi* (Raynal 1940). Γάτες που είχαν πειραματικά μολυνθεί με τη *R. typhi,* εμφάνισαν υποκλινική λοίμωξη (Soliterman 1954) και η *R. typhi* έχει απομονωθεί απ' αυτές (Lépine and Lorando 1935).

Όμως, θα πρέπει να σημειωθεί ότι στις ορολογικές μεθόδους συμβαίνουν διασταυρούμενες αντιδράσεις ανάμεσα στη *R. typhi* και άλλα είδη ρικετσιών (Raoult and Dasch 1995) και δεν είναι δυνατόν να διακριθεί ορολογικά αν η έκθεση αφορά στη *R. typhi* ή τη *R. felis*. Δεν μπορεί να αποκλειστεί η πιθανότητα οι οροθετικές για *R. typhi* γάτες να ήταν μολυσμένες με *R. felis,* η οποία όπως αποδείχτηκε στην παρούσα μελέτη «κυκλοφορεί» στην Κύπρο και μεταφέρεται κυρίως από τους ψύλλους του είδους *Ctenocephalides felis*. Η R. felis ανιχνεύτηκε σε *Ctenocephalides felis* που είχαν απομονωθεί και από γάτες και από τρωκτικά. Όπως φάνηκε από τη μελέτη μας, οι γάτες εκτίθενται σε μεταβιβαστές ικανούς να μεταδώσουν τις ρικέτσια, είναι επιδεκτικές στη λοίμωξη με ρικέτσιες, και υπάρχει ορολογική απόκριση στη λοίμωξη. Επιπλέον, έρχονται σε στενή επαφή με τους αρουραίους που αποτελούν την κύρια δεξαμενή του βακτηρίου, και παρασιτούνται από ψύλλους που είναι οι κύριοι μεταβιβαστές της *R. typhi.* Με βάση τα παραπάνω κριτήρια, οι γάτες μπορεί να χρησιμοποιηθούν σαν «δείκτες» της παρουσίας των ρικετσιών, ειδικά της *R. typhi* και της *R.felis* στον άνθρωπο, αλλά ο ρόλος τους στην επιδημιολογία της *R. typhi* στον άνθρωπο είναι ασήμαντη.

Συμπερασματικά:

Επιβεβαιώθηκε η ενδημικότητα της R. typhi στην Κύπρο και χαρακτηρίστηκαν οι παράγοντες κινδύνου για τη μετάδοση της. Η ισχυρή παρουσία των υποδόχων και μεταβιβαστών και ο υψηλός βαθμός μόλυνσής τους, η απομόνωση στελεχών *R.typhi* από ξενιστές και μεταβιβαστές, δείχνουν ότι ο ΕΤ συνιστά ένα συνεχιζόμενο πρόβλημα υγείας για την Κύπρο που στις περισσότερες περιπτώσεις δεν καταγράφεται, γιατί η νόσος δεν διακρίνεται εύκολα στην κλινική πράξη από άλλα εμπύρετα, και υποδιαγιγνώσκεται. Τα ευρήματα της οροεπιδημιολογικής αλλά και της μοριακής μελέτης συγκλίνουν στο συμπέρασμα ότι ο αιτιολογικός παράγοντας του ΕΤ παρουσιάζει ευρεία διασπορά στην Κύπρο, με υψηλή συχνότητα εμφάνισης στις επαρχίες της Λευκωσίας και της Λάρνακας.

Η διασπορά των ρικετσιών στα τρωκτικά συμφωνεί με την διασπορά τους στα εκτοπαράσιτα και στον άνθρωπο όπως έχει διαπιστωθεί σε προηγούμενες μελέτες.
Στην επιδημιολογική αλυσίδα της *R. typhi* στην Κύπρο, σαν υπόδοχο θηλαστικό λειτουργεί ο αρουραίος, κυρίως ο *R. norvegicus* και σαν μεταβιβαστής ο ψύλλος *X. cheopis*, ο οποίος φαίνεται να παίζει τον κύριο ρόλο στη μετάδοση της *R.typhi*. Η επαφή με αρουραίους (ιδιαίτερα του είδους *R. norvegicus*) και τους ψύλλους τους (ιδιαίτερα του είδους *X.cheopis*) φαίνεται ότι αποτελούν παράγοντες κινδύνου για λοίμωξη από την *R. typhi*. Η επαφή με άλλα θηλαστικά, όπως γάτες, δεν φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στην ανθρώπινη λοίμωξη.

Οι παράγοντες του περιβάλλοντος που επικρατούν στην Κύπρο, έχουν άμεση σχέση με την εξάπλωση του ΕΤ. Οι κλιματολογικές συνθήκες, είναι ιδιαίτερα ευνοϊκές στην αύξηση των πληθυσμών των ψύλλων και συμβάλλουν στη διατήρηση της ρικέτσιας στο περιβάλλον (ιδανικές θερμοκρασίες για πολλαπλασιασμό της ρικέτσιας μέσα στον ψύλλο). Πιθανή αύξηση της θερμοκρασίας του περιβάλλοντος, θα ευνοήσει ιδιαίτερα και τον πολλαπλασιασμό των μεταβιβαστών αλλά και της ρικέτσιας μέσα σ' αυτούς, με αποτέλεσμα την αύξηση από τη μια των πληθυσμών και από την άλλη του βαθμού ρικετσιοφορίας των μεταβιβαστών. Εξ' άλλου, με την ανθρωπογενή παρέμβαση στο περιβάλλον, ευνοείται η αύξηση των πληθυσμών των υποδόχων, συμβάλλει στην αύξηση των πληθυσμών των τρωκτικών και στην εγκατάστασή τους στις πόλεις. Είναι σημαντικό ότι οι περιοχές που η παρούσα μελέτη χαρακτήρισε σαν περιοχές υψηλού κινδύνου είναι περιοχές απ' όπου

αναφέρονται τα περισσότερα κρούσματα και μάλιστα γειτνιάζουν με τη χαρακτηρισθείσα το 1996 εστία ΕΤ.

Η συγκεκριμένη μελέτη συνέβαλε στον προσδιορισμό του βαθμού μόλυνσης των υποδόχων και των μεταβιβαστών, σε όλο το νησί, στην αναζήτηση πληροφοριών για την αποσαφήνιση των συνθηκών και των παραγόντων που συμβάλλουν στη διατήρηση και την εξάπλωση του ΕΤ.

Rickettsia felis

Για πρώτη φορά στην Κύπρο, αλλά και την Ν.Α Μεσόγειο περιγράφηκε η παρουσία της *R. felis*. Οι γνώσεις όσον αφορά στην επιδημιολογία και οικολογία αυτού του βακτηρίου είναι ανεπαρκείς, και η έρευνα εστιάζεται διεθνώς στον καθορισμό της σχέσης μεταξύ θηλαστικών-ξενιστών μεταβιβαστών και μικροοργανισμού.

Η *Rickettsia felis* είναι ένα πρόσφατα χαρακτηρισθέν παθογόνο είδος ρικέτσιας που θεωρείται αναδυόμενο παθογόνο (Raoult *et al.* 2001). Έχει εντοπιστεί σε ψύλλους που παρασιτούν διάφορα είδη θηλαστικών σε διάφορες χώρες. Η *R. felis* μεταδίδεται ανάμεσα στα θηλαστικά-ξενιστές μέσω του δήγματος του ψύλλου, κατά τη διάρκεια γεύματος απ' αυτά και το βακτήριο μπορεί να παραμένει και να συντηρείται μέσα στους πληθυσμούς των ψύλλων μέσω της κάθετης μετάδοσης της στους απογόνους τους (Wedincamp and Foil 2002). Η *R. felis* δεν προκαλεί το θάνατο του ψύλλου (Azad et al. 1997), και –όπως και η *R. typhi* -μπορεί να μεταδοθεί διαωοθηκικά στους «απογόνους» του αρθροπόδου-ξενιστή; συνεπώς το βακτήριο έχει τη δυνατότητα να παραμένει και να συντηρείται στη φύση μέσα στους πληθυσμούς των αρθροπόδων, κάνοντας έτσι τους ψύλλους, σημαντικά reservoirs αλλά και πολλαπλασιαστικούς ξενιστές (amplifying host) του βακτηρίου. Ο *Ctenocephalides felis,* με την κοινή ονομασία «ψύλλος της γάτας» θεωρείται ο κύριος μεταβιβαστής αυτού του ρικετσιακού παράγοντα και φαίνεται να έχει ρόλο «κλειδί» τόσο στη μετάδοση όσο και τη διασπορά του παθογόνου (Kenny *et al.* 2003). Η *R. felis* έχει βρεθεί (σε ψηλά ποσοστά) σε ψύλλους *C. felis* που παρασιτούσαν γάτες, σε αρκετές χώρες όπως : Γαλλία (Rolain *et al.* 2003b), Ηνωμένο Βασίλειο (Kenny *et al.*

2003; Shaw *et al.* 2004), Νέα Ζηλανδία (Kelly *et al.* 2005), Αυστραλία. (Schloderer *et al.* 2006), Ταυλάνδη (Parola *et al.* 2003), Ισραήλ (Bauer *et al.* 2006). Οι γάτες πολύ συχνά παρασιτούνται από τον C.felis, και καθώς ο πληθυσμός τους αυξάνεται σαν pets παγκόσμια, υπάρχει αυξανόμενο ενδιαφέρον όσον αφορά τους flea-associated zoonotic μικροοργανισμούς όπως η R.felis (Brown et al 2003). Όμως ο *C. felis* έχει βρεθεί να παρασιτεί επίσης ένα ευρύ φάσμα θηλαστικών-ξενιστών, περιοικιακά (γάτες, σκυλιά) ή άγρια ζώα (opossums, τρωκτικά), και άλλα θηλαστικά στα οποία μπορεί να προσαρμοστεί αν χρειαστεί. Παρασιτεί επίσης τον άνθρωπο (Azad *et al.* 1992).

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης έδειξαν ότι *η R.felis* είναι ένα αρκετά διαδεδομένο βακτήριο στην Κύπρο, και φαίνεται ότι σχετίζεται κυρίως με τους ψύλλους του είδους *C. felis*. Ο *C. felis* ήταν το πιο συχνό είδος που παρασιτούσε τις γάτες (βρέθηκε στο 86,8 % των παρασιτούμενων από εκτοπαράσιτα γατών, αποτελώντας το 75,6% του συνόλου των ψύλλων που συλλέχθηκαν απ' αυτά τα ζώα). Όμως, το είδος αυτό του ψύλλου βρέθηκε με αρκετά μεγάλη συχνότητα και στα τρωκτικά (βρέθηκε στο 1/3 των αρουραίων πού παρασιτούνταν από ψύλλους, αποτελώντας σχεδόν το 25% του συνόλου των ψύλλων που συλλέχθηκαν από τα τρωκτικά). Επιπλέον, η *R. felis* ανιχνεύτηκε στο 9.3% των ψύλλων του είδους *C. felis* που απομονώθηκαν από γάτες και στο 5,6 % των ψύλλων του ίδιου είδους που απομονώθηκαν από τρωκτικά. Η *R. felis* ανιχνεύτηκε επίσης σε 1% από τους ψύλλους του είδους *X. cheopis*. Για πρώτη φορά ανιχνεύεται η R.felis σε ψύλλους αυτού του είδους.

Τα παραπάνω αποτελέσματα οδηγούν στο συμπέρασμα ότι υπάρχουν όλες οι προυποθέσεις και αυξημένος κίνδυνος (risk) για τη μετάδοση *R. felis* στην Κύπρο : η παρουσία των μολυσμένων με το παθογόνο *C. Felis* (αρθρόποδο-μεταβιβαστής), η συγγένεια του με τον άνθρωπο, η έντονη παρουσία των πληθυσμών του *C. Felis*, και η παρουσία επιδεκτικών θηλαστικών-ξενιστών (τρωκτικά-γάτες). Το τελευταίο έχει ιδιαίτερη σημασία στη διασπορά του παθογόνου. Ένας μολυσμένος με *Ricketsia felis* ψύλλος που παρασιτούσε ένα τρωκτικό, είναι δυνατόν να μολύνει ένα δεύτερο ξενιστή διαφορετικού είδους πχ ένα περιοικιακό ζώο κατά τη διάρκεια ενός γεύματος αίματος κατά τον παρασιτισμό του σ' αυτό. Δίνεται με τον τρόπο αυτό η δυνατότητα αφ' ενός της διασποράς του βακτηρίου σε διαφορετικούς φυσικούς ξενιστές και άρα την εγκατάσταση του, αφ' ετέρου την ευκαιρία στο παθογόνο για «γειτνίαση» με το

ανθρωπογενές περιβάλλον. Το παραπάνω είναι πολύ σημαντικό για τη διασπορά της λοίμωξης από *R. felis*, αφού μεταφέρεται ο αιτιολογικός παράγοντας στο εγγύτερο περιβάλλον του ανθρώπου.

Παρ' όλο που στην παρούσα μελέτη το 9,3 % των ψύλλων που απομονώθηκαν από γάτες ανιχνεύτηκε η R felis, το βακτήριο δεν βρέθηκε στα δείγματα αίματος από γάτες που ελέγχθηκαν. Το αποτέλεσμα αυτό συμφωνεί με προηγούμενες μελέτες. Ενώ η *R. felis* έχει βρεθεί (σε ψηλά ποσοστά) σε ψύλλους *C.felis* που παρασιτούσαν γάτες, σε αρκετές χώρες εν' τούτοις σε πολύ λίγες περιπτώσεις αποδείχτηκε να έχουν ενεργό λοίμωξη από *R. felis*. Γάτες που είχαν εκτεθεί σε ψύλλους μολυσμένους πειραματικά με *R felis* εμφάνισαν αντισώματα περίπου 4 μήνες μετά την έκθεση τους, ενώ ανιχνεύτηκε DNA της R felis με τη μέθοδο της PCR στο αίμα μόνο των 2 από τις 12 γάτες (Wedincamp and Foil 2000). Σε ορολογικές μελέτες σε φυσικά μολυσμένες γάτες έχουν ανιχνευτεί αντισώματα έναντι της *R.felis* (Sorvillo *et al.* 1993; Breitschwerdt *et al.* 2005; Case *et al.* 2006), ή related μικροοργανισμούς, αλλά δεν αποδείχτηκε ενεργή λοίμωξη με PCR ή καλλιέργεια του παθογόνου. Ανοικτά ερωτήματα παραμένουν: ποιό είναι το υπόδοχο της στη φύση καθώς και ποιός είναι ο κύκλος μετάδοσης αυτής της ρικέτσιας.

Ερωτήματα που χρήζουν παραπέρα διερεύνησης είναι: Ποια είναι η συμμετοχή της *R. felis*, μιας ρικέτσιας που πρώτη φορά περιγράφεται στην Κύπρο στην εκδήλωση νόσου σε ανθρώπους και ζώα; Ποιό είναι το υπόδοχο αυτής της ρικέτσιας στην Κύπρο; Απαιτείται παραπέρα διερεύνηση για τη συμμετοχή της νέας ρικέτσιας στην εκδήλωση νόσου σε ανθρώπους και ζώα στην Κύπρο.

Μπαρτονέλλα

Μέχρι σήμερα δεν υπάρχουν δεδομένα για τις μπαρτονελλώσεις στην Κύπρο, και η επιδημιολογία των μπαρτονελλών όχι μόνο στην Κύπρο αλλά και γενικότερα στη Μ. Ανατολή είναι τελείως άγνωστη. Στην παρούσα μελέτη προσδιορίστηκε ο επιπολασμός των anti-B. henselae αντισωμάτων στα τρωκτικά, και στις γάτες στην Κύπρο. Bartonella sp. ανιχνεύτηκαν (γονοτυπική ανίχνευση με τη μέθοδο της PCR) στα τρωκτικά, και στις γάτες και στα εκτοπαράσιτά τους. Αυτή είναι η πρώτη αναφορά για τις μπαρτονέλλες στην Κύπρο.

41,6% από τις γάτες που ελέγχθηκαν με τη μέθοδο του έμμεσου ανοσοφθορισμού εμφάνισαν αντισώματα έναντι της *B. Henselae* σε τίτλους >= 1/64

(τίτλος αντισωμάτων >= 1/64 θεωρήθηκε ως cut-off point). Αυξημένη οροθετικότητα παρατηρήθηκε στα θηλυκά ζώα, σε μεγαλύτερης ηλικίας γάτες, καθώς και σε γάτες που παρασιτούνταν από ψύλλους. Η σχέση μεταξύ της οροθετικότητας για τη B. henselae και του παρασιτισμού από ψύλλους έχει αναφερθεί σε προηγούμενες μελέτες. Γάτες που έρχονταν πιο συχνά σε επαφή με άλλα ζώα εμφάνισαν υψηλότερα ποσοστά οροθετικότητας. (Zangwill *et al.* 1993; Koehler *et al.* 1994; Chomel *et al.* 1999).

Σύμφωνα με οροεπιδημιολογικές μελέτες παγκόσμια, ο οροεπιπολασμός των αντι-*B. henselae* IgG αντισωμάτων στις γάτες έχει μεγάλες διακυμάνσεις. Στις ΗΠΑ έχουν αναφερθεί ποσοστά από 4% -95% (Koehler *et al.* 1994; Chomel *et al.* 1995; Jameson *et al.* 1995; Baneth *et al.* 1996), και από 6% - 47.5% στη Σιγκαπούρη (Nasirudeen and Thong 1999), 15.1% στην Ιαπωνία (Ueno *et al.* 1995). Ο επιπολασμός φαίνεται να εξαρτάται από τις κλιματολογικές συνθήκες με μια διακύμανση από πολύ χαμηλός σε ψυχρά κλίματα (0% στον Α. Καναδά και στη Νορβηγία) μέχρι πολύ υψηλός σε in warm and humid climates (68% στις Φιλιππίνες) (Jameson *et al.* 1995; Bergmans *et al.* 1997; Glaus *et al.* 1997; Heller *et al.* 1997; Sander and Frank 1997; Chomel *et al.* 1999; Nasirudeen and Thong 1999; Bergh *et al.* 2002). Από τις χώρες της Ευρώπης, στη στη Γερμανία και στην Ελβετία τα επίπεδα επιπολασμού ποικίλουν από 1% έως 15% (Glaus *et al.* 1997; Haimerl *et al.* 1999; Arvand *et al.* 2001), στη Σουηδία, 8.3% (Glaus *et al.* 1997), 33.3% στην Αυστρία (Allerberger *et al.* 1995), ενώ στην Ολλανδία φτάνει το 56% (Bergmans *et al.* 1997). Στις χώρες γύρω από τη Μεσόγειο, έχουν αναφερθεί επίπεδα επιπολασμού: 41% στη Γαλλία (Gurfield *et al.* 2001), 38%, στην Ιταλία, 36% στη Ιορδανία, 39.5% στο Ισραήλ (Baneth *et al.* 1996). Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης (41, 6%) συμφωνούν με τα παραπάνω αποτελέσματα που αναφέρονται από χώρες με ανάλογες κλιματολογικές συνθήκες.

Στις γάτες ανιχνεύτηκε με τη μέθοδο της PCR η *B. henselae* (ποσοστό 15,6 %), ενώ στο 14,58% των ψύλλων που απομονώθηκαν από γάτες ανιχνεύτηκε *Bartonella* DNA. Πιο συγκεκριμένα, το 11,4% των ψύλλων που ελέγχθηκαν βρέθηκαν μολυσμένοι με *B. Henselae* ενώ το 3, 1% με την *B. Clarridgeiae*. Όλοι οι θετικοί ψύλλοι ήταν του είδους *Ctenocephalides felis.* Και τα δυο είδη *Bartonella henselae και B. clarridgeiae* είναι παθογόνα για τον άνθρωπο. Όπως έχει αποδειχθεί σε προηγούμενες μελέτες, οι γάτες αποτελούν «δεξαμενή» στη φύση (natural

reservoir) για τα παραπάνω βακτήρια και οι ψύλλοι κυρίως ο *C. Felis* οι κύριοι μεταβιβαστές (Regnery *et al.* 1992b; Chomel *et al.* 1995; Chomel *et al.* 1996; Heller *et al.* 1997; Spach and Koehler 1998; Droz *et al.* 1999; Jensen *et al.* 2000; Jacomo *et al.* 2002; Yamamoto *et al.* 2002). Οι μολυσμένες γάτες είναι συνήθως ασυμπτωματικές και μπορούν να παραμείνουν βακτηριαιμικές για μεγάλα χρονικά διαστήματα (αρκετούς μήνες ή και χρόνια) διαδραματίζοντας έτσι σημαντικό ρόλο στην διατήρηση και μετάδοση του βακτηρίου (Koehler *et al.* 1994; Kordick *et al.* 1995; Chomel 2000). Η *Bartonella clarridgeiae* κατανέμεται άνισα στους πληθυσμούς γατών ανά τον κόσμο, με επιπολασμό που κυμαίνεται από 30% - 36% σε κάποιες μελέτες (Γαλλία, Κάτω Χώρες ή Φιλιππίνες) σε λιγότερο από 10% στις νοτιοανατολικές ΗΠΑ και Ιαπωνία ή Ταϊβάν μέχρι και την παντελή απουσία σε διάφορες μελέτες στην Ευρώπη, Αυστραλία και Βόρεια Αμερική (Guptill 2003; Chomel *et al.* 2004a). Επιδημιολογικές μελέτες στην Γαλλία έχουν δείξει ότι περίπου 1.1% από τις οικόσιτες γάτες ήταν μολυσμένες παράλληλα από δύο στελέχη μπαρτονέλλας (*B. henselae* και *B. clarridgeiae*). Στην παρούσα μελέτη, παρ' όλο που η *B. clarridgeiae* βρέθηκε σε ψύλλους που απομονώθηκαν από γάτες, δεν έγινε δυνατή η γονοτυπική τους ανίχνευση στα δείγματα αίματος από τα ζώα αυτά. Αυτό πιθανόν να οφείλεται στη χαμηλή συχνότητα και τη μεγάλη διακύμανση που εμφανίζει αυτό το είδος στους πληθυσμούς των γατών (Sander and Frank 1997; Chomel 2000). Μια πιθανή εξήγηση που θα μπορούσε επίσης να δοθεί γι' αυτό, είναι ότι ο αριθμός των ζώων που ελέγχθηκαν σ' αυτή τη μελέτη ήταν μικρός και από μικρή γεωγραφική περιοχή και όχι απ' όλη την Κύπρο. Παρ' όλ' αυτά, τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης δείχνουν ότι η *B. clarridgeiae* υφίσταται στην Κύπρο.

Όπως προέκυψε από τα αποτελέσματα της μελέτης μας, ο ψύλλος της γάτας, *Ctenocephalides felis,* φαίνεται να έχει σπουδαίο ρόλο στην μετάδοση των παραπάνω ειδών μπαρτονελλών στην Κύπρο. Το παραπάνω συμπέρασμα συμφωνεί με ανάλογες μελέτες σε άλλες περιοχές (Chomel *et al.* 1996; Higgins *et al.* 1996; Foil *et al.* 1998) στις οποίες η επιδημιολογία των παραπάνω ειδών μπαρτονέλλας έχει κυρίως συνδεθεί με τον ψύλλο της γάτας *C. felis* και τις γάτες. Όμως, στη μελέτη μας το είδος αυτό του ψύλλου βρέθηκε σε αρκετά μεγάλο ποσοστό και στους αρουραίους, ενώ 10.5% των τρωκτικών εμφάνισαν αντισώματα έναντι της *B. Henselae*. Η οροθετικότητα για τη *Bartonella henselae* στους αρουραίους βρέθηκε να έχει σημαντική συσχέτιση με

την παρουσία εκτοπαρασίτων και πιο συγκεκριμένα συσχετίστηκε με την παρουσία του ψύλλου *C. Felis*. Τρωκτικά που παρασιτούνταν από C. felis increased the odds of being seropositive for Bartonella spp. by a factor of 5.8. Η οροθετικότητα επίσης συσχετίστηκε με την περιοχή σύλληψης του τρωκτικού με περισσότερα οροθετικά ζώα στην περιοχή της Λεμεσού και λιγότερα στη Λευκωσία. Απαιτείται παραπέρα διερεύνηση για το ρόλο των ψύλλων *C. Felis* των τρωκτικών στη μετάδοση και την επιδημιολογία των παραπάνω ειδών μπαρτονέλλας στην Κύπρο. Η ανίχνευση της *Bartonella henselae* στις γάτες και στους ψύλλους τους, αλλά και η σημαντική διασπορά των ψύλλων *C. Felis* στην Κύπρο, υπαγορεύει την αναζήτηση και καταγραφή κλινικών περιστατικών στον άνθρωπο.

Διάφορα είδη μπαρτονελών (Bartonella sp.) έχουν απομονωθεί από διάφορα είδη μικρών θηλαστικών τρωκτικά (αρουραίοι, ποντικοί), αλλά και οικόσιτων ζώων (γάτες, σκύλοι, βοοειδή) (Birtles *et al.* 1994; Chomel *et al.* 1995; Heller *et al.* 1997; Kosoy *et al.* 1997; Birtles *et al.* 1999; Smith *et al.* 2002; Ying *et al.* 2002; Castle *et al.* 2004; Gundi *et al.* 2004; Marie *et al.* 2006). Είναι σημαντική η αξιολόγηση της παρουσίας μπαρτονελλών σε ζώα τα οποία ζούνε κοντά σε ανθρώπους. Ένα ευρύ φάσμα Bartonella species έχουν απομονωθεί σε πληθυσμούς τρωκτικών, και σε προηγούμενες μελέτες έχει αποδειχθεί η δυνατότητα μόλυνσης του ανθρώπου από μπαρτονέλλες που σχετίζονται με τρωκτικά ((Daly *et al.* 1993; Kosoy *et al.* 2003; Avidor *et al.* 2004), και έχει επισημανθεί η ολοένα αυξανόμενη σχέση αυτών των στελεχών μπαρτονέλλας με την πρόκληση νόσου σε ανθρώπους (Bown *et al.* 2004). Είδη μπαρτονέλλας που έχουν απομονωθεί από τρωκτικά είναι η *Bartonella tribocorum,* η *B. Elizabethae, η Bartonella doshiae* και η *B. Taylori,* καθώς επίσης και αρκετά μη χαρακτηρισμένα στελέχη (strains). Από τα παραπάνω η *Bartonella tribocorum,* και η *B. Elizabethae* έχουν συσχετιστεί με νόσο στον άνθρωπο, ενώ τα είδη *B. doshiae* και *B. taylorii* δεν έχουν ακόμα συσχετιστεί με την πρόκληση νόσου στον άνθρωπο. Bartonella spp. έχουν βρεθεί σε ψύλλους των τρωκτικών στο Ηνωμένο Βασίλειο, στην Ταυλάνδη στις ΗΠΑ, στο Αφγανιστάν, Αίγυπτο, Πορτογαλία (Gurfield *et al.* 2001; Parola *et al.* 2003; Rolain *et al.* 2003b; Stevenson *et al.* 2003; Kelly *et al.* 2004; De Sousa *et al.* 2006; Loftis *et al.* 2006; Marie *et al.* 2006). Όπως έχει προκύψει από προηγούμενες μελέτες, το γένος *Rattus* είναι συνήθως μολυσμένο με μπαρτονέλες (Heller *et al.* 1998; Ellis *et al.* 1999; Castle *et al.* 2004; Gundi *et al.* 2004). Έχει επίσης βρεθεί ότι 61% των ψύλλων των αρουραίων

είναι μολυσμένοι με στελέχη μπαρτονέλλας συμπεριλαμβάνοντας την *B. elizabethae* (Breitschwerdt and Kordick 2000).

Στην παρούσα μελέτη, με την εφαρμογή της PCR, ερευνήσαμε την παρουσία μπαρτονελών σε τρωκτικά του γένους *Rattus* (*R. rattus* και *R. norvegicus*) και στους ψύλλους τους. Τρία είδη μπαρτονέλλας: *Bartonella tribocorum, Bartonella elizabethae* και *Bartonella rattimassiliensis* ανιχνεύτηκαν και χαρακτηρίστηκαν γονοτυπικά σε αρουραίους του γένους *Rattus.* Από τα παραπάνω είδη, που βρέθηκαν στους αρουραίους του γένους *Rattus* στην Κύπρο, η *Bartonella tribocorum,* και η *B. Elizabethae* έχουν συσχετιστεί με νόσο στον άνθρωπο.

Η Bartonella elizabethae ή συγγενικά στελέχη με μεγάλη γενετική ομοιότητα μ' αυτή τη μπαρτονέλλα έχουν απομονωθεί σε τρωκτικά του γένους Rattus στη Β. και Ν. Αμερική (ΗΠΑ, Περού) (Birtles and Raoult 1996; Ellis *et al.* 1999), την Ασία (Κίνα, Ταϊλάνδη) (Ying *et al.* 2002; Castle *et al.* 2004), την Ν.Αφρική (Pretorius *et al.* 2004), αλλά και την Ευρώπη (Πορτογαλία) (Kosoy *et al.* 2000). Η *B. tribocorum* έχει απομονωθεί από αρουραίους στις ΗΠΑ (Heller *et al.* 1998; Ellis *et al.* 1999), ενώ η *Bartonella rattimassiliensis* έχει απομονωθεί στη Γαλλία από τρωκτικά του γένους *Rattus* (Vijay A. K. B 2004), και είναι αγνώστου παθογένειας για τον άνθρωπο.

Η *B. elizabethae*, η *Bartonella tribocorum* ανιχνεύτηκαν επίσης σε ψύλλους που συλλέχθηκαν από αρουραίους. Επιπλέον, ένας νέος γονότυπος *Bartonella sp* strain CtF4YN (μη κατατάξιμο στέλεχος) βρέθηκε σε ψύλλους του είδους *Ctenocephalides felis* και L. Segnis. *Bartonella sp* DNA ανιχνεύτηκε στο 2,4% των ψύλλων των τρωκτικών. Το μεγαλύτερο ποσοστό (54,5%) από τους θετικούς για *Bartonella sp* ψύλλους ήταν μολυσμένοι με *B. elizabethae*. Υψηλότερο βαθμό μόλυνσης παρατηρήθηκε στον X. Cheopis (5 θετικοί για *B. elizabethae* 2 θετικοί για *Bartonella tribocorum*).

Στελέχη συγγενή με την *B. Elizabethae* έχουν βρεθεί σε ψύλλους που ανήκουν στα είδη *X. cheopis* και L.segnis σε προηγούμενες μελέτες. Στελέχη τα οποία είναι συγγενή με την *B. Elizabethae*, έχουν ανιχνευτεί σε ψύλλους που απομονώθηκαν από τρωκτικά του γένους *Rattus* στην Πορτογαλία (De Sousa *et al.* 2006) και στο Αφγανιστάν (Marie *et al.* 2006). Η *Bartonella tribocorum* βρέθηκε σε ψύλλους του είδους *Xenopsylla cheopis*. Αυτό το είδος μπαρτονέλλας έχει βρεθεί επίσης σε ψύλλους τρωκτικών (*X. Cheopis*) του γένους *Rattus* στην Κίνα (Li *et al.*

2007). Ένας νέος γονότυπος (Novel *Bartonella* genotype) με 90% ομοιότητα με ένα μη καταταχθέν στέλεχος (unnamed *Bartonella sp:* strain CtF4YN, AY566176) ανιχνεύτηκε σε ψύλλους του είδους *C. felis.* και του είδους *L. Segnis*. Ανάλογα αποτελέσματα έχουν αναφερθεί από την Πορτογαλία.

Η *B. elizabethae* είναι μια παθογόνος μπαρτονέλλα για τον άνθρωπο (Breitschwerdt and Kordick 2000; Ying *et al.* 2002), και έχει ενοχοποιηθεί σαν αίτιο ενδοκαρδίτιδας (Daly *et al.* 1993), νευρορετινίτιδας, αμφιβληστροειδίτιδας (O'Halloran *et al.* 1998). Απομονώθηκε για πρώτη φορά το 1986 από τα αίμα ασθενούς με ενδοκαρδίτιδα στη Μασαχουσέτη (Daly *et al.* 1993). Το βακτήριο έχει επίσης εντοπιστεί στο αίμα άρρωστου σκύλου (Guptill 2003). Σύμφωνα με ορολογικές μελέτες, η λοίμωξη με *B. elizabethae* φαίνεται να είναι συχνή στους χρήστες ενδοφλέβιων (IV) φαρμάκων και σε άστεγους σε διάφορα μέρη των ΗΠΑ και στη Σουηδία (Comer *et al.* 1996; Comer *et al.* 2001; McGill *et al.* 2003). Σε χρήστες, ενδοφλέβιων φαρμάκων ο οροεπιπολασμός για την *B. elizabethae* κυμαίνεται από 33% στη Βαλτιμόρη (Comer *et al.* 1996) σε 39% στην Στοκχόλμη (McGill *et al.* 2003) και 46% στη Νέα Υόρκη (Comer *et al.* 2001). Στους άστεγους από το Λος Αντζελες της Καλιφόρνιας, ο οροεπιπολασμός για την *B. elizabethae* ήταν 12,5% (Smith *et al.* 2002). Οι αρουραίοι (*Rattus norvegicus*) αποτελούν τον κύριο ξενιστή της *B. elizabethae* (Childs *et al.* 1999; Ellis *et al.* 1999). Παρ' όλο που ο ρόλος των τρωκτικών σαν ξενιστές της *B. elizabethae* έχει αποσαφηνιστεί, πριν την παρούσα μελέτη δεν είχε προσδιοριστεί αρθρόποδο-μεταβιβαστής γι' αυτό το είδος. Σε μια πρόσφατη μελέτη στην Πορτογαλία που διεξήχθη την ίδια χρονική περίοδο με την παρούσα μελέτη, σε 2 είδη ψύλλων των τρωκτικών (του γένους Ornithophaga και Stenoponia) ανιχνεύτηκαν με τη μέθοδο της PCR στελέχη μπαρτονέλλας με μεγάλη γενετική ομοιότητα με τη *B. elizabethae* (De Sousa *et al.* 2007). Στη μελέτη μας, η *B. elizabethae* βρέθηκε για πρώτη φορά σε ψύλλους τρωκτικών του είδους X.cheopis. Το παραπάνω είδος, είναι πιθανόν εν δυνάμει μεταβιβαστής της *B. elizabethae* στην Κύπρο και πιθανόν να παίζουν ρόλο στη μετάδοση της λοίμωξης στον άνθρωπο**.** Η παραπάνω υπόθεση ενισχύεται και από το γεγονός ότι το ίδιο στέλεχος *B. Elizabethae* βρέθηκε και στα τρωκτικά. Η πιθανή σημασία αυτών των πρόσφατα περιγραφέντων μικροργανισμών στη δημόσια υγεία μένει να αποσαφηνιστεί. Είναι όμως ιδιαίτερου ενδιαφέροντος μιας και τα θηλαστικά -ξενιστές τους βρίσκονται σε αφθονία στην Κύπρο. Η επαφή του ανθρώπου μ' αυτά τα είδη, μπορεί να είναι άμεση ή έμμεση

μέσω αρθρόποδων όπως ο ψύλλος των αρουραίων (*Xenopsylla cheopis*). Παραπέρα διερεύνηση απαιτείται προκειμένου να αποσαφηνιστεί ο ρόλος αυτών των αρθροπόδων στις αλυσίδες μετάδοσης της Bartonella.

Η επιδημιολογική σημασία των μπαρτονελλών με ξενιστές τρωκτικά ως αίτιο νόσου στα ζώα και στον άνθρωπο συνεχώς μεγαλώνει.(Iralu *et al.* 2006) και τα τελευταία χρόνια πολλά νέα είδη μπαρτονέλλας έχουν απομονωθεί (Ying *et al.* 2002; Castle *et al.* 2004) πολλά από τα οποία θα μπορούσαν να είναι πηγή μόλυνσης σε ανθρώπους.

Η μόλυνση των ανθρώπων από ψύλλους των τρωκτικών είναι πιθανό να προκύψει στις περιπτώσεις συνύπαρξης συμβιωτικών τρωκτικών όπως τα *Rattus* spp. ή *Mus* spp., καθώς και όταν οι άνθρωποι ζουν σε περιβάλλοντα με μεγάλους πληθυσμούς τρωκτικών. Απαιτείται παραπέρα διερεύνηση για την επιδημιολογία των μπαρτονελλών στην Κύπρο.

Όπως φάνηκε από τα αποτελέσματα μας, ο ψύλλος των τρωκτικών Xenopsylla cheopis είναι ο κύριος μεταβιβαστής της R. typhi, και ενδεχομένως είναι ένας μεταβιβαστής ικανός να μεταδώσει τη *R. felis* και τουλάχιστον 2 *Bartonella* species, την *B. elizabethae*, και τη *B. tribocorum.* Όλα τα παραπάνω είδη έχουν συσχετιστεί με νόσο στον άνθρωπο. Ο Ctenocephalides felis είναι ο μεταβιβαστής της *R. felis,* της *B.henselae* και της *B. clarridgeiae*.

Ο ψύλλος της γάτας *Ctenocephalides felis* είναι ένα εκτοπαράσιτο οικόσιτων και άγριων ζώων, ο οποίς επίσης παρασιτεί και τρέφεται από τον άνθρωπο. Ένας μεγάλος αριθμός μελετών – οι περισσότερεςτην τελευταία 5ετία- εμπλέκουν το είδος αυτό σαν μεταβιβαστή νέων και αναδυόμενων λοιμωδών νόσων (Rolain *et al.* 2003b). Θεωρείται ότι παίζει ένα σημαντικό ρόλο στην cat-to-cat μετάδοση των B. henselae, B. clarridgeiae, and *B. koehlerae* (Chomel et al. 1996; Higgins et al. 1996; Foil et al. 1998). Στη Νέα Ζηλανδία, ποσοστά 19% , 11%, και 7% των *Ctenocephalides felis* που απομονώθηκαν από γάτες, βρέθηκαν μολυσμένοι με *R.felis*, *B.henselae* και *B. clarridgeiae* αντίστοιχα. (Kelly *et al.* 2004; Blanco *et al.* 2006), , ενώ στη Γαλλία από το ίδιο είδος ψύλλου (*Ctenocephalides felis* από γάτες) τα αντίστοιχα ποσοστά μόλυνσης ήταν 8,1%, 11,1% , και 67,9% για τη *R.felis*, *B.henselae* και *B. clarridgeiae* (Gurfield *et al.* 2001; Rolain *et al.* 2003b). Στο Ισραήλ 7.6% των ψύλλων του είδους Ctenocephalides felis από γάτες ηταν θετικοί (Bauer *et al.* 2006),

ενώ στην Ισπανία σε ανάλογη μελέτη σε ψύλλους του είδους *Ctenocephalides felis* and Ctenocephalides canis που παρασιτούσαν σε γάτες τα ποσοστά μόλυνσης από *B. clarridgeiae* και *B.henselae* ήταν 6,8% και *3,4%* αντίστοιχα (Kelly *et al.* 2004; Blanco *et al.* 2006)..

Η *B. clarridgeiae* έχει βρεθεί σε *Ctenocephalides felis* που απομονώθηκαν από γάτες στη Γαλλία, (Gurfield *et al.* 2001; Rolain *et al.* 2003b), την Ταυλάνδη, (Parola *et al.* 2003) τη Νέα Ζηλανδία (Kelly *et al.* 2004)

Η *R felis* έχει επίσης βρεθεί (σε ψηλά ποσοστά) σε ψύλλους *C. felis* που παρασιτούσαν γάτες, σε αρκετές χώρες όπως : Γαλλία (Rolain *et al.* 2003b), Ηνωμένο Βασίλειο (Kenny *et al.* 2003; Shaw *et al.* 2004), Ισραήλ (Bauer *et al.* 2006), Νέα Ζηλανδία (Kelly *et al.* 2005), Αυστραλία. (Schloderer *et al.* 2006), Ταυλάνδη (Parola *et al.* 2003).

Η τεχνική της PCR για την ανίχνευση της *R.typhi* στους μεταβιβαστές αποδείχθηκε ιδιαίτερα χρήσιμη και αποτελεσματική. Απαιτείται ελάχιστη ποσότητα δείγματος, γεγονός σημαντικό αφού και στους αρουραίους και στους ψύλλους (λόγω του μικρού μεγέθους τους) ακόμα και στην καλύτερη περίπτωση η ποσότητα του δείγματος δεν είναι δυνατόν να είναι μεγάλη (είναι περιορισμένη). Πριν την εξέλιξη των τεχνικών μοριακής βιολογίας η τεκμηρίωση της παρουσίας βακτηρίων σε αιματοφάγα αρθρόποδα, όπως κρότωνες, ψύλλοι, κουνούπια και ψείρες, βασίζονταν σε ειδικές τεχνικές χρώσης, που όμως ήταν αναποτελεσματικές και αναξιόπιστες, λόγω της παρουσίας μιας σύνθετης μικροβιακής χλωρίδας που βρίσκεται στα αρθρόποδα- μεταβιβαστές. Τεχνικές βασιζόμενες σε ορολογικές μεθόδους όπως η ELISA και ο IFA απαιτούσαν αντιορούς ειδικούς για το είδος. Χαμηλός αριθμός παθογόνων μικροοργανισμών στον ξενιστή δεν ήταν δυνατόν να διαγνωστεί με το εύρος ευαισθησίας αυτών των τεχνικών (Higgins A., 1995). Ένα άλλο σημαντικό πλεονέκτημα είναι ότι παρέχει τη δυνατότητα ανίχνευσης παθογόνων σε διατηρημένους σε αλκοόλη ψύλλους και επομένως μειώνονται οι δυσκολίες που προκύπτουν κατά τη συλλογή στην ύπαιθρο απλοποιώντας τις διαδικασίες συλλογής, διατήρησης και μεταφοράς των μολυσμένων αρθροπόδων από το φυσικό περιβάλλον συλλογής στο εργαστήριο. Τα πλεονεκτήματα αυτά της μεθόδου την κάνουν ιδιαίτερα χρήσιμη και εύχρηστη, για την εκτέλεση επιδημιολογικών ερευνών τέτοιου

είδους, όχι μόνο για τις ρικέτσιες και τις μπαρτονέλλες αλλά και για άλλα λοιμώδη νοσήματα που μεταδίδονται με αρθρόποδα.

Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων αναπτύχθηκε ηλεκτρονικό στατιστικό πρόγραμμα εφοδιασμένο με Σύστημα Γεωγραφικής Ανάλυσης. Με τη βοήθεια του προγράμματος αυτού έγινε συσχετισμός των αποτελεσμάτων της έρευνας με επιδημιολογικούς και γεωγραφικούς παράγοντες και αξιολόγηση των αποτελεσμάτων του έργου για προσδιορισμό του μεγέθους του κινδύνου, για την ανθρώπινη και ζωική υγεία, από κάθε παράγοντα. Τα αποτελέσματα από τη μελέτη των αρθροπόδων-μεταβιβαστών των υπό μελέτη παθογόνων, συγκρίθηκαν με αυτά που προέκυψαν από τη μελέτη των θηλαστικών-ξενιστών. Επίσης, τα επιδημιολογικά δεδομένα αυτής της μελέτης συσχετίστηκαν με προηγούμενες μελέτες σε ανθρώπινο πληθυσμό και με διαθέσιμα δεδομένα για κλινικά περιστατικά σε ασθενείς. Προέκυψε το συμπέρασμα ότι η γεωγραφική κατανομή των αρθροπόδων-μεταβιβαστών ακολουθεί την γεωγραφική κατανομή των παθογόνων που αυτά μεταφέρουν.

Η μηχανογραφημένη χαρτογράφηση αποδείχτηκε ένα χρήσιμο εργαλείο στην επιδημιολογική διερεύνηση. Με τη βοήθεια του ΠΜΧ εντοπίστηκαν περιοχές με υψηλό επιπολασμό και προσδιορίστηκαν περιοχές υψηλού κινδύνου.

Η τοποθέτηση των αποτελεσμάτων του εργαστηριακού ελέγχου και των επιδημιολογικών δεδομένων σε χάρτες έδωσε τη δυνατότητα να εντοπιστούν περιοχές με υψηλό επιπολασμό των παθογόνων στα υπόδοχα και τους μεταβιβαστές. Δίνεται έτσι η δυνατότητα να αναζητηθούν πιο συστηματικά σ' αυτές τις περιοχές κλινικά περιστατικά στον άνθρωπο, να διερευνηθεί η σχέση των κρουσμάτων με το χώρο, και να διαπιστωθεί η συγκέντρωση κρουσμάτων σε μια περιοχή. Με τη βοήθεια του ΠΜΧ εντοπίστηκαν περιοχές με υψηλό επιπολασμό και προσδιορίστηκαν περιοχές υψηλού κινδύνου για τη *R.typhi*. Έδωσε τη δυνατότητα της συσχέτισης των αποτελεσμάτων της παρούσας μελέτης με προηγούμενες. Τα παραπάνω θέτουν το πρόβλημα της λήψης μέτρων περιορισμού της παραπέρα διασποράς του ΕΤ και μέτρων ελέγχου και πρόληψης.

Η συγκεκριμένη εργασία, εκτός του ότι παρέχει επιδημιολογικά στοιχεία και πληροφόρηση, αποτελεί και ένα βασικό οδηγό για αποτελεσματικά προγράμματα

ελέγχου και σε άλλες περιοχές. Η μελέτη συνέβαλε στον προσδιορισμό των φυσικών ξενιστών και του βαθμού μόλυνσης τους, σε επίπεδο χώρας, στην αναζήτηση πληροφοριών για την αποσαφήνιση των συνθηκών και των παραγόντων που συμβάλλουν στη διατήρηση και την εξάπλωση των υπό μελέτη παθογόνων, αλλά και την αναζήτηση ενδημικών περιοχών. Τα ευρήματα αυτά έχουν μεγάλη σημασία για την δημόσια υγεία. Η πληροφορία μπορεί να αξιοποιηθεί για την επιτήρηση των παθογόνων από τους φορείς της υγείας.

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης οδήγησαν στον προσδιορισμό του ρόλου των τρωκτικών, της γάτας, και των εκτοπαράσιτών τους, στην επιδημιολογική αλυσίδα των flea-borne ρικετσιώσεων και των μπαρτονελώσεων στην Κύπρο, και στον εντοπισμό ενδημικών περιοχών, καθώς και παραγόντων κινδύνου για τη μετάδοση στον άνθρωπο, για το κάθε παθογόνο. Υποδεικνύει περιοχές που απαιτείται διερεύνηση από τις αρμόδιες υπεύθυνες αρχές και φορείς Δημόσιας Υγείας και υπαγορεύει την ανάγκη για την εφαρμογή προγραμμάτων πρόληψης, ελέγχου και επιτήρησης των ζωονόσων που μελετήθηκαν. Τα επιδημιολογικά δεδομένα που παρέχει μπορεί να χρησιμοποιηθούν για να καταρτιστούν σχήματα ελέγχου και επιτήρησης των ζωονόσων που ελέγχθηκαν, στην κατεύθυνση περιορισμού της εξάπλωσης και μείωση της συχνότητας εμφάνισης των ζωονόσων,
Τίθεται το πρόβλημα της λήψης μέτρων ελέγχου για τον περιορισμό της εξάπλωσης των τρωκτικών και των εκτοπαρασίτων τους, καθώς και των αδέσποτων ζώων, της βελτίωσης των συνθηκών υγιεινής, της ενημέρωση των κατοίκων και του σχεδιασμό μέτρων αντιμετώπισης για την προστασία του πληθυσμού.

Θα πρέπει εδώ να σημειωθεί ότι ο έλεγχος των τρωκτικών και των εκτοπαρασίτων τους δεν είναι γενικά εύκολο έργο. Ο έλεγχος των τρωκτικών περιλαμβάνει μέτρα για την υγιεινή για την ορθή μέθοδο φύλαξης τροφών καθώς και μέτρα για την μείωση του πληθυσμού των τρωκτικών με μυοκτόνα και παγίδες. Απαιτούνται ειδικοί χειρισμοί για τα νεκρά ή παγιδευμένα τρωκτικά έτσι ώστε να αποφευχθεί όσο το δυνατόν περισσότερο η πιθανή επαφή των ανθρώπων με τους ψύλλους. Ο έλεγχος των εκτοπαρασίτων επίσης δεν είναι γενικά εύκολο έργο. Η αντιμετώπισή τους απαιτεί στρατηγική που περιλαμβάνει ενημέρωση του κοινού, προσωπικά προστατευτικά μέτρα, και χρήση χημικών ουσιών για την καταπολέμηση τους στα ζώα και το περιβάλλον.

Συνοπτικά

Ο ΕΤ συνιστά ένα συνεχιζόμενο πρόβλημα υγείας για την Κύπρο που στις περισσότερες περιπτώσεις δεν καταγράφεται, και υποδιαγιγνώσκεται. Για πρώτη φορά στην Κύπρο, ανιχνεύτηκαν γονοτυπικά η Rickettsia felis, και 5 είδη μπαρτονελλών με γενετική συγγένεια με τα παρακάτω είδη: B. henselae, B. clarridgeiae, *B. elizabethae*. *B. tribocorum, Bartonella rattimassiliensis*. Στα τρωκτικά ανιχνεύτηκαν *Bartonella tribocorum*, *Bartonella* elizabethae, *Bartonella rattimassiliensis* sp. και η *R.typhi*. Ρικετσιακό DNA και/ή *Bartonella* DNA ανιχνεύτηκε με τη μέθοδο της PCR σε 3 από τα 5 είδη των ψύλλων των τρωκτικών. 10.5% των ψύλλων των τρωκτικών που ελέγχθηκαν ήταν μολυσμένοι με ρικετσιακό ή *Bartonella sp* DNA. Στους ψύλλους των τρωκτικών ανιχνεύτηκαν 5 διαφορετικά βακτήρια: *R.typhi*, *R.felis, B. elizabethae, Bartonella tribocorum* και ένα μη τυποποιηθέν στέλεχος *Bartonella sp* όμοιο γενετικά με το περιγραφέν στέλεχος strain CtF4YN. Τα 4 από τα παραπάνω (*R.felis, B. elizabethae, Bartonella tribocorum,* strain CtF4YN) περιγράφονται για πρώτη φορά στο νησί. Τα 3 από τα παραπάνω *(R.typhi*, *R.felis, B. elizabethae)* είναι αποδειγμένα παθογόνα για τον άνθρωπο. Σε 3 (*Xenopsylla cheopis, Ctenocephalides felis, Leptopsylla segnis*) από τα 5 είδη ψύλλων που παρασιτούσαν τα τρωκτικά και σε *C.felis* ψύλλους που απομονώθηκαν από γάτες ανιχνεύτηκαν γονοτυπικά παθογόνοι παράγοντες (ρικέτσιες και/ή μπαρτονέλλες).

Οι γνώσεις όσον αφορά στην επιδημιολογία και οικολογία αυτών των βακτηρίων είναι ανεπαρκείς, επομένως είναι αναγκαία η συνέχιση των ερευνών, ιδιαίτερα για τον καθορισμό της σχέσης μεταξύ ξενιστών διαβιβαστών και μικροοργανισμών. Αν και ο ρόλος του ψύλλου των τρωκτικών ως διαβιβαστής που προκαλεί την μόλυνση ανθρώπων με *B. elizabethae*, και *R. felis*, δεν είναι αποσαφηνισμένος πλήρως, παρόλα αυτά ο κίνδυνος έκθεσης και μόλυνσης τοπικών πληθυσμών, υπάρχει.

Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής προσθέτουν στην υπάρχουσα γνώση, παρέχοντας νέα δεδομένα για τους flea vectors και για τα παθογόνα που πιθανόν αυτοί πιθανόν να μεταφέρουν στον άνθρωπο.

Με βάση τα παραπάνω, φαίνεται ότι υπάρχει ανάγκη, εκτός από τη *R. typhi,* να συμπεριλαμβάνεται η *R. felis* and *Bartonella* spp.στη διαφορική διάγνωση των flea-borne infections στην Κύπρο. Τα αναδυόμενα παθογόνα για τον άνθρωπο βακτήρια που για πρώτη φορά εντοπίστηκαν στην Κύπρο, αλλά και η διαπίστωση ότι παραμένουν ενεργές γνωστές εστίες ΕΤ στο νησί κάνουν επιτακτική την ανάγκη για την αναζήτηση καλύτερων μεθόδων προστασίας ενάντια στις ζωονόσους στις οποίες εμπλέκονται τρωκτικά.

Η παρούσα μελέτη συνέβαλε στον προσδιορισμό των φυσικών ξενιστών και του βαθμού μόλυνσης τους, σε επίπεδο χώρας, στην αναζήτηση πληροφοριών για την αποσαφήνιση των συνθηκών και των παραγόντων που συμβάλλουν στη διατήρηση και την εξάπλωση των υπό μελέτη παθογόνων, αλλά και την αναζήτηση ενδημικών περιοχών. Τα ευρήματα αυτά έχουν μεγάλη σημασία για την δημόσια υγεία. Η πληροφορία μπορεί να αξιοποιηθεί για την επιτήρηση των παθογόνων από τους φορείς της υγείας.

5. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τίτλος: «ΟΙΚΟΓΕΩΓΡΑΦΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΕΝΔΗΜΙΚΟΥ ΤΥΦΟΥ ΚΑΙ ΤΩΝ ΜΠΑΡΤΟΝΕΛΛΩΣΕΩΝ ΣΤΗΝ ΚΥΠΡΟ »

Εισαγωγή

Ο **Ενδημικός Τύφος** (ή μυικός τύφος) είναι μια ζωονόσος με αιτιολογικό παράγοντα τη R.typhi η οποία ανήκει στην ομάδα ρικετσιών που είναι γνωστή ως Ομάδα του Τύφου (ΟΤ). Τα τρωκτικά λειτουργούν σαν υπόδοχα της *R.typhi* με σημαντικότερους μεταβιβαστές τους ψύλλους των αρουραίων. Στον άνθρωπο η νόσος μεταδίδεται με τα μολυσμένα κόπρανα των ψύλλων που παρασιτούν σε μολυσμένα τρωκτικά .

Η νόσος έχει παγκόσμια κατανομή, επικρατεί σε παραθαλάσσιες περιοχές με ζεστό κλίμα όπου ενδημούν τα σημαντικότερα υπόδοχα (*Rattus rattus* και *Rattus norvegicus*). Η νόσος εμφανίζεται με αυξημένη συχνότητα τους θερινούς μήνες του χρόνου και το φθινόπωρο. Παρ' όλο που συχνά υποδιαγιγνώσκεται και θεωρείται ήπια νόσος, παρουσιάζεται σε ορισμένες περιοχές ως επιδημία και προκαλεί αρκετά σοβαρή κλινική συμπτωματολογία με αναφερόμενους θανάτους σε μικρό ποσοστό των προσβεβλημένων ατόμων.

Flea- Spotted Fever Group rickettsioses

Ο κηλιδώδης πυρετός που μεταδίδεται μέσω του ψύλλου (Flea-borne spotted fever) αποκαλούμενος επίσης με την ονομασία «cat flea typhus», είναι μια αναδυόμενη λοιμώδης νόσος με αιτιολογικό παράγοντα ένα είδος ρικέτσιας της Ομάδας των Κηλιδωδών Πυρετών (ΟΚΠ), τη *Rickettsia felis*. Το είδος αυτό είναι μια ρικέτσια που αναγνωρίστηκε πρόσφατα και δεν έχει ακόμα πλήρως περιγραφεί λεπτομερώς ούτε η παθογένεια της ούτε η επιδημιολογία της. Το βακτήριο είχε χαρακτηριστεί με μεθόδους μοριακής βιολογίας το 1991, και αρχικά ονομάστηκε ELB agent (EL Laboratory, Soquel, CA),ενώ η ονομασία Rickettsia felis δόθηκε μετά την πρώτη απομόνωση και καλλιέργεια του, το 2001. Πρόκειται για τη μοναδική

ρικέτσια της ΟΚΠ που έχει σαν μεταβιβαστή τον ψύλλο, σε αντίθεση με τα άλλα είδη ρικετσιών της ομάδας που μεταδίδονται μέσω των κροτώνων. Το βακτήριο έχει εντοπιστεί σε ψύλλους διάφορων ειδών θηλαστικών σε διάφορες χώρες του κόσμου. Ο ψύλλος της γάτας Ctenocephalides felis θεωρείται ο κύριος μεταβιβαστής αυτού του ρικετσιακού παράγοντα.

Μπαρτονελλώσεις

Μέχρι το 1993 μόνο 3 είδη μπαρτονελλών ήταν γνωστό ότι προκαλούν νόσο στον άνθρωπο: η *B. bacilliformis* (νόσος του Carrion/ Πυρετός Oroya) η *B. quintana* (πυρετός των χαρακωμάτων) και η *B. henselae* (νόσος εξ ονύχων γαλής -Cat scratch disease). Οι μπαρτονελλώσεις αποτελούν αναδυόμενες ζωονόσους, αφού την τελευταία δεκαετία ένας μεγάλος αριθμός νέων ειδών εντοπίστηκαν σε αρθρόποδα - μεταβιβαστές και/ή σε θηλαστικά-ξενιστές, πολλά από τα οποία έχουν αποδειχθεί παθογόνα για τον άνθρωπο. Σήμερα, το γένος *Bartonella* περιλαμβάνει περισσότερα από 20 είδη από τα οποία τουλάχιστον 8 είναι παθογόνα για τον άνθρωπο: *B. bacilliformis, B. henselae, B. Quintana, B. elizabethae, B. vinsonii, B. clarridgeiae, B.grahamii, B. Washoensis*.

Τα βακτήρια του γένους *Bartonella* είναι οξειδάση-, καταλάση-αρνητικά (εκτός από τη *B. bacilliformis*), απαιτητικά βακτήρια. Τα μέλη του γένους *Bartonella* είναι ποικιλόμορφα, Gram-αρνητικά ραβδόμορφα βακτηρίδια που μολύνουν τα ερυθροκύτταρα των θηλαστικών ξενιστών τους. Κοινά χαρακτηριστικά γνωρίσματα τους είναι η μετάδοση τους μέσω ενός αρθροπόδου- μεταβιβαστή και η επιβίωση τους σε θηλαστικά- ξενιστές. Τα αρθρόποδα διαδραματίζουν έναν ουσιαστικό ρόλο στο κύκλο μετάδοσης όλων των ειδών μπαρτονέλλας, λειτουργώντας ως φορείς και ενδεχομένως ως ξενιστές. Πολύ λίγα είναι γνωστά για το ρόλο των αρθρόποδων στην επιδημιολογική αλυσίδα των μπαρτονελλών. Η κατανόηση της οικολογίας και της επιδημιολογίας τους είναι φτωχή, αφού αφ' ενός τα θηλαστικά-υπόδοχα ή τα αρθρόποδα-μεταβιβαστές για το κάθε είδος μπαρτονέλλας δεν έχει αποσαφηνιστεί, και αφ' ετέρου, ο τρόπος μετάδοσης των μπαρτονελλών από τα θηλαστικά-υπόδοχα ή τα αρθρόποδα-μεταβιβαστές στους ανθρώπους παραμένει ασαφής. Βασική

προϋπόθεση για την πρόοδο της κατανόησης των μπαρτονελλών αποτελεί η αποσαφήνιση των τρόπων μεταδόσεως. Μελέτες πάνω στην οικολογία τους είναι σημαντικές, προκειμένου να προσδιοριστούν τα είδη των φυσικών ξενιστών που λειτουργούν ως πηγή λοίμωξης στον άνθρωπο.

Μέχρι σήμερα δεν υπήρχαν καθόλου δεδομένα όσον αφορά στην παρουσία των *Bartonella spp*. και της *Rickettsia felis*, καθώς και των αρθροπόδων-μεταβιβαστών και υποδόχων-θηλαστικών που συμπληρώνουν τον κύκλο ζωής τους, στην Κύπρο. Για τον Ενδημικό Τύφο υπάρχουν προηγούμενες μελέτες στις οποίες είχε αποδειχθεί ότι η νόσος αποτελεί πρόβλημα υγείας για την Κύπρο.

Οι στόχοι της παρούσας μελέτης ήταν να καθοριστεί ο επιπολασμός των παραπάνω παθογόνων σε θηλαστικά ζώα – ξενιστές και σε αρθρόποδα-μεταβιβαστές στην Κύπρο, σε μια προσπάθεια διερεύνησης της επιδημιολογικής αλυσίδας τους του κύκλου μετάδοσης τους.

ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

Έγινε σύλληψη θηλαστικών-ξενιστών (625 τρωκτικά και 72 γάτες) από τα οποία έγινε αιμοληψία και συλλογή αρθροπόδων που παρασιτούσαν σ' αυτά. Η μελέτη του βαθμού μόλυνσης των θηλαστικών-ξενιστών και των εκτοπαρασίτων τους έγινε με ορολογικές μεθόδους και με τεχνικές μοριακής βιολογίας. Το υλικό της μελέτης αποτέλεσαν :

1) Οροί που συλλέχθηκαν από τα παραπάνω ζώα και ελέγχθηκαν για την ύπαρξη ειδικών αντισωμάτων με τη μέθοδο του έμμεσου ανοσοφθορισμού.

2) Δείγματα ολικού αίματος τα οποία ελήφθησαν από τα υπόδοχα, καθώς και τα αρθρόποδα τα οποία ελέγχθηκαν με μεθόδους μοριακής βιολογίας για ανίχνευση και ταυτοποίηση των υπό μελέτη παθογόνων.

3) Εκτοπαράσιτα που συλλέχθηκαν από τα παραπάνω ζώα.

Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με τη χρήση GIS (Geographical Information System Technology).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Α) ΜΕΛΕΤΗ ΣΕ ΘΗΛΑΣΤΙΚΑ-ΞΕΝΙΣΤΕΣ

Η δειγματοληψία περιέλαβε 51 περιοχές κατανεμημένες και στις 5 επαρχίες της ελεύθερης Κύπρου. Καταγράφηκαν τα εξής είδη τρωκτικών, Rattus rattus frugivorous, Rattus norvegicous, Mus musculus . Από τα 625 τρωκτικά, τα 399 ήταν Rattus norvegicus, τα 223 Rattus rattus, και 3 Mus musculus. Μελετήθηκε η διασπορά των ειδών των τρωκτικών και των παθογόνων που μεταφέρουν, και εντοπίστηκαν οι ενδημικές περιοχές για κάθε παθογόνο και των περιοχών υψηλού κινδύνου για τον άνθρωπο.

Η δειγματοληψία περιέλαβε επίσης 72 γάτες (29 ζώα συντροφιάς 12 αδέσποτες γάτες και 31 από φάρμες). 55,6% ήταν θηλυκού γένους και 44,4% ήταν αρσενικού γένους. 27,7% (20/72) γάτες είχαν ηλικία <= 1 έτους.

Οροεπιδημιολογική μελέτη

Τρωκτικά

496 δείγματα αίματος από τα 625 τρωκτικά ελέγχθηκαν για την ανίχνευση αντισωμάτων έναντι της R.typhi, και της B. Henselae, με τη μέθοδο του έμμεσου ανοσοφθορισμού (τίτλος αντισωμάτων >= 1/60 θεωρήθηκε ως cut-off point). 48.6% από τα τρωκτικά που ελέγχθηκαν εμφάνισαν αντισώματα έναντι της R.typhi. Οι τίτλοι των IgG αντισωμάτων στα οροθετικά ζώα κυμάνθηκαν από 1/60 έως 1/3840. Τα 52 (10.5%) από τα 494 τρωκτικά που ελέγχθηκαν εμφάνισαν αντισώματα έναντι της B. henselae, Οι τίτλοι των IgG αντισωμάτων στα οροθετικά ζώα κυμάνθηκαν από 1/60 έως 960.

Παρατηρήθηκε διασπορά των οροθετικών για R.typhi ζώων σε όλες τις επαρχίες. Παράγοντες με σημαντική συσχέτιση με την οροθετικότητα για τη R. typhi ήταν: το είδος του τρωκτικού, με περισσότερα οροθετικά ζώα του είδους R. norvegicus από εκείνα του είδους R. rattus ($p<0.0001$); η περιοχή, ($p<0.0001$); η εποχή με περισσότερα οροθετικά ζώα το φθινόπωρο ($p<0.0001$). Η οροθετικότητα

είχε σημαντική συσχέτιση με την παρουσία εκτοπαρασίτων στο ζώο (p<0.0001). Πιο συγκεκριμένα η οροθετικότητα για τη R. typhi συσχετίστηκε με τον παρασιτισμό του τρωκτικού από τον ψύλλο X.cheopis (p<0.0001), ενώ η συσχέτιση με την παρουσία C. felis ή L. Segnis, δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Η παρουσία του X.cheopis στα τρωκτικά αύξησε the odds of being positive for R. typhi by a factor of 2.2.

Η οροθετικότητα για τη Bartonella βρέθηκε να έχει σημαντική συσχέτιση με την παρουσία εκτοπαρασίτων (p<0.0001). Πιο συγκεκριμένα η οροθετικότητα για τη Bartonella συσχετίστηκε με την παρουσία του ψύλλου C. felis (p<0.0001) αλλά όχι με τον ψύλλο X. cheopis ή L. segnis. Τρωκτικά που παρασιτούνταν από C. felis increased the odds of being seropositive for Bartonella spp. by a factor of 5.8. Η οροθετικότητα επίσης συσχετίστηκε με την περιοχή σύλληψης του τρωκτικού.

Γάτες

30 από τις 72 γάτες (41, 6%) από τις ελήφθησαν δείγματα ορού και ελέγχθηκαν με τη μέθοδο του έμμεσου ανοσοφθορισμού εμφάνισαν αντισώματα έναντι της B. Henselae Οι τίτλοι των IgG αντισωμάτων στα οροθετικά ζώα κυμάνθηκαν από 1/64 έως 1024. Αυξημένη οροθετικότητα παρατηρήθηκε στα θηλυκά ζώα (17/40: 42,5%) σε σύγκριση με τα αρσενικά (13/32: 40,6%), χωρίς όμως η διαφορά να είναι στατιστικά σημαντική. Οι αδέσποτες γάτες και γάτες που προέρχονταν από φάρμες εμφάνισαν υφηλότερη οροθετικότητα (58,3% και 48,38 αντίστοιχα) σε σύγκριση με τις γάτες συντροφιάς (27,5%). Οι δυο πρώτες ομάδες επίσης εμφάνισαν υψηλούς τίτλους αντισωμάτων. 23 από τις 72 γάτες (32,8%) εμφάνισαν αντισώματα έναντι της R.typhi.

Γονοτυπική ανίχνευση Rickettsia sp. και Bartonella sp. με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) σε σπονδυλωτούς ξενιστές (τρωκτικά, γάτες)

Δείγματα αίματος και ιστών από σπονδυλωτούς ξενιστές (τρωκτικά, γάτες) ελέγχθηκαν με την μέθοδο της PCR, για τη γονοτυπική ανίχνευση των υπό μελέτη παθογόνων. Ελέγχθηκαν 146 δείγματα αίματος από τρωκτικά (82 δείγματα) και από

γάτες (64 δείγματα), και 32 δείγματα ιστών από τρωκτικά. Η ταυτοποίηση έγινε με την εφαρμογή των μεθόδων PCR-RFLP PCR-sequencing analysis.

Δεν ανιχνεύτηκε ρικετσιακό DNA στα δείγματα αίματος, ενώ σε 7 δείγματα ιστών ανιχνεύτηκε ρικετσιακό DNA. Η εφαρμογή των μεθόδων RFLP και sequencing analysis στο προιόν της PCR οδήγησε στην ταυτοποίηση της R.typhi .

Bartonella sp DNA ανιχνεύτηκε σε 5 τρωκτικά. Η εφαρμογή της sequencing analysis στο προιόν της PCR οδήγησε στην ταυτοποίηση της Bartonella elizabethae (3/5). Επιπλέον 2 novel Bartonella genotypes που δεν έγινε δυνατή η ταυτοποίηση τους ανιχνεύτηκαν σε 2 Rattus norvegicus. Από τις 64 γάτες που ελέγχθηκαν με τη μέθοδο της PCR σε 10 (15,6 %) ανιχνεύτηκε Bartonella sp DNA. Η εφαρμογή της sequencing analysis στο προιόν της PCR οδήγησε στην ταυτοποίηση της B. henselae. Δεν ανιχνεύτηκε ρικετσιακό DNA στις γάτες.

Β) ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΜΕΛΕΤΗΣ ΑΡΘΡΟΠΟΔΩΝ

Αναζητήθηκαν και ταυτοποιήθηκαν τα αρθρόποδα-εκτοπαράσιτα που παρασιτούσαν τα τρωκτικά και τις γάτες.

Εκτοπαράσιτα των τρωκτικών

Τα 254 από τα 625 τρωκτικά παρασιτούνταν από εκτοπαράσιτα. Εντοπίστηκαν, συλλέχτηκαν και ταξινομήθηκαν 1038 εκτοπαράσιτα, τα οποία εκτός από 3 κρότωνες ήταν όλα ψύλλοι. Οι 3 κρότωνες ανήκαν στο είδος Rhipicephalus turanicus. Οι ψύλλοι που συλλέχτηκαν και ταυτοποιήθηκαν ανήκουν στα εξής 5 είδη : Xenopsylla cheopis (70,34%), Ctenocephalides felis (24,22%), Ctenocephalides canis (0,48 %), Leptopsylla segnis (4,36 %), Nosophylla fasciatus (0,67%). Παρατηρήθηκε ευρεία γεωγραφική διασπορά των τρωκτικών που παρασιτούνταν από εκτοπαράσιτα. Ο αριθμός των εκτοπαρασίτων ανά ζώο κυμάνθηκε από 1-25 (μέσο παρασιτικό φορτίο 4 ψύλλοι/τρωκτικό).

Εκτοπαράσιτα που παρασιτούσαν σε γάτες

Οι 38 από τις 72 γάτες (52,7%) παρασιτούνταν από εκτοπαράσιτα. Εντοπίστηκαν, συλλέχτηκαν και ταξινομήθηκαν 155 εκτοπαράσιτα, από τα οποία 127 ήταν ψύλλοι και 28 κρότωνες. Οι ψύλλοι που συλλέχτηκαν και ταυτοποιήθηκαν using accepted morphologic criteria ανήκουν στα είδη : Ctenocephalides felis (96/127: 75,6%), και Ctenocephalides canis (31/127: 24,4%). Ο αριθμός των εκτοπαρασίτων ανά ζώο κυμάνθηκε από 1-18 (μέσο παρασιτικό φορτίο 4 ψύλλοι/γάτα).

Το πιο συχνό είδος που παρασιτούσε τις γάτες ήταν ο ψύλλος του είδους Ctenocephalides felis που βρέθηκε σε 33 από τις 38 γάτες (86,8 %) παρασιτούμενες από εκτοπαράσιτα γάτες. Ψύλλοι του είδους Ctenocephalides canis συλλέχθηκαν από 8 γάτες. Από 3 γάτες συλλέχθηκαν και τα δυο είδη.

Γονοτυπική ανίχνευση και ταυτοποίηση Rickettsia sp και Bartonella sp στα αρθρόποδα-μεταβιβαστές

Εκτοπαράσιτα, που παρασιτούσαν τα τρωκτικά και τις γάτες κατά τη διάρκεια της αιμοληψίας συλλέχθηκαν και ελέγχθηκαν με τη μέθοδο της PCR για την ανίχνευση και απομόνωση των υπό διερεύνηση παθογόνων παραγόντων (ρικέτσιες και μπαρτονέλλες)

Στους ψύλλους που παρασιτούσαν τα τρωκτικά: Η R.typhi ανιχνεύτηκε σε 4% (16/400) από τους ψύλλους του είδους Xenopsylla cheopis και σε 6,6 % (3/45) από τους ψύλλους του είδους L. segnis. Η R. felis ανιχνεύτηκε σε 1% (4/400) από τους ψύλλους του είδους Xenopsylla cheopis και σε 5,6% (14/250) από τους ψύλλους του είδους Ctenocephalides felis. Στους ψύλλους που παρασιτούσαν τις γάτες ανιχνεύτηκαν : R. felis (19%), B. henselae (11%), and B. clarridgeiae (7%) σε ψύλλους του είδους Ctenocephalides felis..

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα μελέτη τα τρωκτικά, οι γάτες και τα εκτοπαράσιτα τους χρησιμοποιήθηκαν σαν δείκτες (indicators) της παρουσίας και της διασποράς παθογόνων βακτηρίων που ανήκουν στα γένη Rickettsia sp. και Bartonella sp., στην Κύπρο, ένα νησιωτικό οικοσύστημα.

Ο αιτιολογικός παράγοντας του ΕΤ R.typhi παρουσιάζει ευρεία διασπορά στα υπόδοχα και τους μεταβιβαστές. Ο βαθμός μόλυνσης των υποδόχων με R.typhi ήταν υψηλός. Επιβεβαιώθηκε ο ρόλος των τρωκτικών του γένους R. rattus και R. norvegicus και των ψύλλων τους στην επιδημιολογική αλυσίδα της Rickettsia typhi στην Κύπρο.

Στην επιδημιολογική αλυσίδα σαν υπόδοχο θηλαστικό λειτουργεί ο αρουραίος, κυρίως ο R. norvegicus και σαν μεταβιβαστής ο ψύλλος X.cheopis, ο οποίος φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο.

Τα αποτελέσματα από τη μελέτη των αρθροπόδων-μεταβιβαστών των υπό μελέτη παθογόνων, συγκρίθηκαν με αυτά που προέκυψαν από τη μελέτη των θηλαστικών-ξενιστών. Επίσης, τα επιδημιολογικά δεδομένα αυτής της μελέτης συσχετίστηκαν με προηγούμενες μελέτες σε ανθρώπινο πληθυσμό και με διαθέσιμα δεδομένα για κλινικά περιστατικά σε ασθενείς. Προέκυψε το συμπέρασμα ότι η γεωγραφική κατανομή των αρθροπόδων- μεταβιβαστών ακολουθεί την γεωγραφική κατανομή των παθογόνων που αυτά μεταφέρουν.

Η μηχανογραφημένη χαρτογράφηση αποδείχτηκε ένα χρήσιμο εργαλείο στην επιδημιολογική διερεύνηση. Η τοποθέτηση των αποτελεσμάτων του εργαστηριακού ελέγχου και των επιδημιολογικών δεδομένων σε χάρτες έδωσε τη δυνατότητα να εντοπιστούν περιοχές με υψηλό επιπολασμό των παθογόνων στα υπόδοχα και τους μεταβιβαστές. Δίνεται έτσι η δυνατότητα να αναζητηθούν πιο συστηματικά σ' αυτές τις περιοχές κλινικά στον άνθρωπο, να διερευνηθεί η σχέση των κρουσμάτων με το χώρο, και να διαπιστωθεί η συγκέντρωση κρουσμάτων σε μια περιοχή. Με τη βοήθεια του ΠΜΧ εντοπίστηκαν περιοχές με υψηλό επιπολασμό και προσδιορίστηκαν περιοχές υψηλού κινδύνου για τη R.typhi. Έδωσε τη δυνατότητα της συσχέτισης των αποτελεσμάτων της παρούσας μελέτης με προηγούμενες. Τα παραπάνω θέτουν το πρόβλημα της λήψης μέτρων περιορισμού της παραπέρα διασποράς του ΕΤ και μέτρων ελέγχου και πρόληψης. Η συγκεκριμένη εργασία,

εκτός του ότι παρέχει επιδημιολογικά στοιχεία και πληροφόρηση, αποτελεί και ένα βασικό οδηγό για αποτελεσματικά προγράμματα ελέγχου και σε άλλες περιοχές.

Η παρούσα μελέτη συνέβαλε στον προσδιορισμό των φυσικών ξενιστών και του βαθμού μόλυνσης τους, σε επίπεδο χώρας, στην αναζήτηση πληροφοριών για την αποσαφήνιση των συνθηκών και των παραγόντων που συμβάλλουν στη διατήρηση και την εξάπλωση των υπό μελέτη παθογόνων, αλλά και την αναζήτηση ενδημικών περιοχών. Τα ευρήματα αυτά έχουν μεγάλη σημασία για την δημόσια υγεία. Η πληροφορία μπορεί να αξιοποιηθεί για την επιτήρηση των παθογόνων από τους φορείς της υγείας.

ΣΥΝΟΠΤΙΚΑ:

- Προσδιορίστηκε ο ορο-επιπολασμός της R. typhi και της Bartonella henselae στα τρωκτικά και στις γάτες.
- Προσδιορίστηκαν τα είδη των αρουραίων που ενδημούν στην Κύπρο, και η γεωγραφική κατανομή τους
- Τα μολυσμένα τρωκτικά αλλά και τα εκτοπαράσιτα τους λειτούργησαν σαν δείκτης για να εντοπιστεί και να αναδειχτεί το κάθε παθογόνο και υπέδειξαν συγκεκριμένες περιοχές κινδύνου. Διαπιστώθηκε υψηλός βαθμός μόλυνσης τους κυρίως με τη R.typhi.
- Περιγράφηκε για πρώτη φορά στην Κύπρο, η παρουσία 3 ειδών μπαρτονέλλας (B. henselae B. clarridgeiae B. elizabethae).
- Για πρώτη φορά στην Κύπρο, αλλά και την Ν.Α Μεσόγειο περιγράφηκε η παρουσία της R. felis. Οι γνώσεις όσον αφορά στην επιδημιολογία και οικολογία αυτών των βακτηρίων είναι ανεπαρκείς, επομένως είναι αναγκαία η συνέχιση των ερευνών, ιδιαίτερα για τον καθορισμό της σχέσης μεταξύ ξενιστών διαβιβαστών και μικροοργανισμών. Απαιτείται παραπέρα διερεύνηση για τη συμμετοχή της νέας ρικέτσιας στην εκδήλωση νόσου σε ανθρώπους και ζώα στην Κύπρο.
- Επιβεβαιώθηκε η ενδημικότητα της R. typhi στην Κύπρο και χαρακτηρίστηκαν οι παράγοντες κινδύνου για τη μετάδοση της.

- Η παρούσα μελέτη παρέχει επιδημιολογικά στοιχεία και σημαντική πληροφορία για τη διασπορά και την κατανομή των παθογόνων που μελετήθηκαν, και υπαγορεύει την ανάγκη για την εφαρμογή προγραμμάτων ελέγχου και επιτήρησης των ζωονόσων που μελετήθηκαν.

6. ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η μελέτη αυτή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βακτηριολογίας-Παρασιτολογίας Ζωονόσων και Γεωγραφικής Ιατρικής του Ιατρικού Τμήματος του Πανεπιστημίου Κρήτης, (WHO C.C), σε συνεργασία με τα Εργαστήρια των Κτηνιατρικών Υπηρεσιών της Κύπρου υπό την καθοδήγηση του Καθηγητή κ. Τσελέντη Ιωάννη. Ένα μέρος της μελέτης χρηματοδοτήθηκε από το ΙΠΕ, στα πλαίσια ερευνητικού προγράμματος.

Θα επιθυμούσα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου σε όσους συνέβαλαν στην εκπόνηση της διατριβής.

Αρχικά, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον Καθηγητή κ. Ιωάννη Τσελέντη, για την ερευνητική και επιστημονική καθοδήγησή του, τη συνεχή παρακολούθηση και επίβλεψη της προσπάθειάς μου, τις πολύτιμες συμβουλές του και το ενδιαφέρον του, την αμέριστη υποστήριξη, και την πολύπλευρη βοήθεια του. Είμαι βαθύτατα ευγνώμων για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, για τη δυνατότητα και τα μέσα που μου παρείχε για να εκπονήσω την παρούσα εργασία.

Ευχαριστώ τα μέλη της 3μελούς επιτροπής, τον αναπληρωτή καθηγητή κ Γκίκα Αχιλλέα, και την επίκουρη καθηγήτρια κ. Αντωνίου Μαρία, καθώς και τα μέλη της 7μελούς επιτροπής, τους καθηγητές κ. Σαμώνη Γεώργιο και κ. Μελισσά Γιάννη, την επίκουρη καθηγήτρια Σκούλικα Έφη και τη λέκτορα Ψαρουλάκη Άννα.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στη Λέκτορα της Ιατρικής Σχολής κ. Ψαρουλάκη Άννα, για την καθοριστική συμβολή της στο σχεδιασμό, την οργάνωση, και επίβλεψη της μελέτης, καθώς και για την ουσιαστική υποστήριξή και την ανεκτίμητη βοήθεια που μου παρείχε κατά την εκπόνηση της διατριβής..

Ευχαριστώ τους διευθυντές των Κτηνιατρικών Υπηρεσιών της Κύπρου νυν και πρώην : κ. Λουκαίδη Φειδία, Νεοφύτου Γιώργο και Κακογιάννη Χαράλαμπο για τη συνεργασία στην οργάνωση της συλλογής του υλικού στην Κύπρο. Ιδιαίτερα όμως τον κ. Λουκαίδη Φειδία πρώην Διευθυντή των Κτηνιατρικών Υπηρεσιών, που με την παρότρυνσή και τη στήριξη του ανέλαβα την εκτέλεση της παρούσας εργασίας.

Η ιδιαίτερα δύσκολη εργασία της συλλογής και ταξινόμησης των υποδόχων και των μεταβιβαστών δεν θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί χωρίς την ενεργό συμμετοχή και την πολύτιμη εμπειρία των εντομολόγων Β.Χανιώτη, και Β.Παπαδόπουλου, συνεργατών του Εργαστηρίου Βακτηριολογίας-Παρασιτολογίας Ζωονόσων και Γεωγραφικής Ιατρικής, τους οποίους και ευχαριστώ. Ευχαριστώ επίσης την κ. Μοσχανδρέα Ιωάννα,επίκ.καθ/τρια της Ιατρικής Σχολής του Παν/μιου Κρήτης για τη στατιστική επεξεργασία των δεδομένων της μελέτης καθώς και την κ. Αβραμάκη Χρυσούλα για την εφαρμογή του προγράμματος μηχανογραφημένης χαρτογράφησης

Θερμότατα ευχαριστώ τους μεταπτυχιακούς του Εργαστηρίου Κλινικής Βακτηριολογίας, Παρασιτολογίας, Ζωονόσων και Γεωγραφικής Ιατρικής, Χοχλάκη Δημοσθένη, Βρανάκη Σήφη, Σανδαλάκη Βασίλη για την πολύτιμη βοήθεια και υποστήριξή τους στο εργαστηριακό μέρος της μελέτης ιδιαίτερα στην ανάπτυξη και εφαρμογή των μοριακών τεχνικών, καθώς και για τη σημαντική προσφορά τους, τα πολύτιμα σχόλια και τις χρήσιμες συμβουλές τους στη διόρθωση των δοκιμίων. Ευχαριστώ επίσης την τεχνολόγο Κοκκινάκη Χρυσάνθη για τη βοήθεια στον ορολογικό έλεγχο των ζώων.

Η συλλογή των τρωκτικών στην Κύπρο έγινε με την ευθύνη του Τμήματος Γεωργίας της Κύπρου και συγκεκριμένα των λειτουργών του Τμήματος κ. Πατσιά Ανδρέα και κ. Παναγιώτου Ελευθέριο, τους οποίους θα ήθελα να ευχαριστήσω για την ουσιαστική συμβολή τους και τη σημαντική βοήθειά τους και σ' όλη τη διάρκεια της συνεργασίας μας.

Σημαντική ήταν η βοήθεια του προσωπικού των Κτηνιατρικών Υπηρεσιών της Κύπρου στη συλλογή του υλικού από τα συλληφθέντα τρωκτικά, προσωπικό για το οποίο αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω τον συνάδελφο Παύλο Τουμάζο ο οποίος συντόνιζε και επέβλεπε την εργασία που εκτελείτο από το προσωπικό των Κτηνιατρικών Υπηρεσιών, το στενό συνεργάτη και συνάδελφο Ιωάννη

Ιωάννου για τη συνεργασία στον εργαστηριακό τομέα, την πολύπλευρη βοήθεια και συμβολή του, καθώς επίσης και την ηθική συμπαράσταση που μου παρείχε.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω επίσης τον συνάδελφο Απόστολο Μαζέρη καθώς και τους Νίκο Χριστοφή και Δώρο Δημητρίου υπαλλήλους των Κτηνιατρικών Υπηρεσιών οι οποίοι συνέβαλαν στην εκτέλεση των δειγματοληψιών καθώς επίσης και τους ιδιώτες κτηνιάτρους Αντωνίου Γιαννάκη, Γιαπάνη Χρίστο και Κωνσταντίνου Κώστα για τη βοήθεια και τη συνεργασία στη συλλογή των δειγμάτων από γάτες.

Τέλος πρέπει να ευχαριστήσω την οικογένεια μου για την αμέριστη συμπαράσταση και την κατανόηση που έδειξαν καθ΄ όλη τη διάρκεια αυτής της μελέτης.

7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

Ιστιοσελίδες

- (www.avma.org/ cienact/jtua/default.asp)

Abbott, R. C., B. B. Chomel, R. W. Kasten, K. A. Floyd-Hawkins, Y. Kikuchi, J. E. Koehler and N. C. Pedersen (1997). Experimental and natural infection with Bartonella henselae in domestic cats. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. **20:** 41-51.

Adams, J. R., E. T. Schmidtmann and A. F. Azad (1990). "Infection of colonized cat fleas, Ctenocephalides felis (Bouche), with a rickettsia-like microorganism." Am J Trop Med Hyg **43**(4): 400-9.

Adams, W. H., R. W. Emmons and J. E. Brooks (1970). "The changing ecology of murine (endemic) typhus in Southern California." Am J Trop Med Hyg **19**(2): 311-8.

Ahsan, N., M. J. Holman, T. R. Riley, C. S. Abendroth, E. G. Langhoff and H. C. Yang (1998). "Peloisis hepatis due to Bartonella henselae in transplantation: a hemato-hepato-renal syndrome." Transplantation **65**(7): 1000-3.

Al-Awadi, A. R., N. Al-Kazemi, G. Ezzat, A. J. Saah, C. Shepard, T. Zaghloul and B. Gherdian (1982). "Murine typhus in Kuwait in 1978." Bull World Health Organ **60**(2): 283-9.

Al-Matar, M. J., R. E. Petty, D. A. Cabral, L. B. Tucker, B. Peyvandi, J. Prendiville, J. Forbes, R. Cairns and R. Rothstein (2002). "Rheumatic manifestations of Bartonella infection in 2 children." J Rheumatol **29**(1): 184-6.

Alexander, B. (1995). "A review of bartonellosis in Ecuador and Colombia." Am J Trop Med Hyg **52**(4): 354-9.

Allerberger, F., M. Schonbauer, R. Zangerle and M. Dierich (1995). "Prevalence of antibody to Rochalimaea henselae among Austrian cats." Eur J Pediatr **154**(2): 165.

Allison, A. C. and H. R. Perkins (1960). "Presence of Cell Walls Like those of Bacteria in Rickettsiae." Nature **188**(4753): 796-798.

Anderson, B. E. (1990). "The 17-kilodalton protein antigens of spotted fever and typhus group rickettsiae." Ann N Y Acad Sci **590**: 326-33.

Anderson, B. E., R. L. Regnery, G. M. Carlone, T. Tzianabos, J. E. McDade, Z. Y. Fu and W. J. Bellini (1987). "Sequence analysis of the 17-kilodalton-antigen gene from Rickettsia rickettsii." J Bacteriol **169**(6): 2385-90.

Anderson, B. E. and T. Tzianabos (1989). "Comparative sequence analysis of a genus-common rickettsial antigen gene." J Bacteriol **171**(9): 5199-201.

Arango-Jaramillo, S., A. Farhang-Azad and C. L. Wisseman, Jr. (1984). "Experimental infection with Rickettsia mooseri and antibody response of adult and newborn laboratory rats." Am J Trop Med Hyg **33**(5): 1017-25.

Arango-Jaramillo, S., C. L. Wisseman, Jr. and A. F. Azad (1988). "Newborn rats in the murine typhus enzootic infection cycle: studies on transplacental infection and passively acquired maternal antirickettsial antibodies." Am J Trop Med Hyg **39**(4): 391-7.

Arvand, M., A. J. Klose, D. Schwartz-Porsche, H. Hahn and C. Wendt (2001). "Genetic variability and prevalence of Bartonella henselae in cats in Berlin, Germany, and analysis of its genetic relatedness to a strain from Berlin that is pathogenic for humans." J Clin Microbiol **39**(2): 743-6.

Audoin-Rouzeau, F. (1999). "Le rat noir (Rattus rattus) et la peste dans l'occident antique et médieval (The black rat (Rattus rattus) and plague in ancient and medieval western Europe)." Bull. Soc. pathol. exot. **92**(5BIS): 422-426.

Avidor, B., M. Graidy, G. Efrat, C. Leibowitz, G. Shapira, A. Schattner, O. Zimhony and M. Giladi (2004). "Bartonella koehlerae, a new cat-associated agent of culture-negative human endocarditis." J Clin Microbiol **42**(8): 3462-8.

Azad, A. F. (1988). Relationship of vector biology and epidimiology of louse and flea-born rickettsiosies. Biology of Rickettsial Disease 1:. D. H. Walker. Boca Raton, CRC Press**:** 51-61.

Azad, A. F. (1990). "Epidemiology of murine typhus." Annu Rev Entomol **35**: 553-69.

Azad, A. F., S. Radulovic, J. A. Higgins, B. H. Noden and J. M. Troyer (1997). "Flea-borne Rickettsioses : Ecologic Considerations." Emerging Infectious Diseases **Vol. 3**(NO 3): 319-327.

Azad, A. F., J. B. Sacci, Jr., W. M. Nelson, G. A. Dasch, E. T. Schmidtmann and M. Carl (1992). "Genetic characterization and transovarial transmission of a typhus-like rickettsia found in cat fleas." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(1): 43-6.

Azad, A. F. and R. Traub (1985). "Transmission of murine typhus rickettsiae in Xenopsylla cheopis, with notes on experimental infection and effects of temperature." Am J Trop Med Hyg **34**: 555-563.

Azad, A. F. and R. Traub (1989). "Experimental transmission of murine typhus by Xenopsylla cheopis flea bites." Med Vet Entomol **3**(4): 429-33.

Azad, A. F., R. Traub and S. Baqar (1985). "Transovarial transmission of murine typhus rickettsiae in Xenopsylla cheopis." Science **227**: 543-545.

Azad, A. F., R. Traub and C. L. Wisseman (1983). "Rickettsia mooseri infection in fleas Leptopsylla segnis and Xenopsylla cheopis." Am. J. Trop. Med. Hyg(32): 1392-1400.

Azad, A. F., L. Webb, M. Carl and G. A. Dasch (1990). "Detection of rickettsiae in arthropod vectors by DNA amplification using the polymerase chain reaction." Ann N Y Acad Sci **590**: 557-63.

Bajer, A., A. Pawelczyk, J. M. Behnke, F. S. Gilbert and E. Sinski (2001). "Factors affecting the component community structure of haemoparasites in bank voles (Clethrionomys glareolus) from the Mazury Lake District region of Poland." Parasitology **122 Pt 1**: 43-54.

Baker, J. A. (1946). "A Rickettsial infection in Canadian voles. ." J Exp Med(84): 37–51.

Baneth, G., E. B. Breitschwerdt, B. C. Hegarty, B. Pappalardo and J. Ryan (1998). "A survey of tick-borne bacteria and protozoa in naturally exposed dogs from Israel." Vet Parasitol **74**(2-4): 133-42.

Baneth, G., D. L. Kordick, B. C. Hegarty and E. B. Breitschwerdt (1996). "Comparative seroreactivity to Bartonella henselae and Bartonella quintana among cats from Israel and North Carolina." Vet Microbiol **50**(1-2): 95-103.

Barnes, A., S. C. Bell, D. R. Isherwood, M. Bennett and S. D. Carter (2000). "Evidence of Bartonella henselae infection in cats and dogs in the United Kingdom." Vet Rec **147**(24): 673-7.

Bauer, O., G. Baneth, T. Eshkol, S. E. Shaw and S. Harrus (2006). "Polygenic detection of Rickettsia felis in cat fleas (Ctenocephalides felis) from Israel." Am J Trop Med Hyg **74**(3): 444-8.

Bell, E. J. and H. G. Stoenner (1961). "Spotted fever vaccine; potency assay by direct challenge of vaccinated mice with toxin of Rickettsia rickettsii." J Immunol **87**: 737-46.

Bella, F., E. Espejo, S. Uriz, J. A. Serrano, M. D. Alegre and J. Tort (1991). "Randomized trial of 5-day rifampin versus 1-day doxycycline therapy for Mediterranean spotted fever." J Infect Dis **164**(2): 433-4.

Bereswill, S., S. Hinkelmann, M. Kist and A. Sander (1999). "Molecular analysis of riboflavin synthesis genes in Bartonella henselae and use of the ribC gene for differentiation of Bartonella species by PCR." J Clin Microbiol **37**(10): 3159-66.

Bergh, K., L. Bevanger, I. Hanssen and K. Loseth (2002). "Low prevalence of Bartonella henselae infections in Norwegian domestic and feral cats." Apmis **110**(4): 309-14.

Bergmans, A. M., C. M. de Jong, G. van Amerongen, C. S. Schot and L. M. Schouls (1997). "Prevalence of Bartonella species in domestic cats in The Netherlands." J Clin Microbiol **35**(9): 2256-61.

Bergmans, A. M., J. F. Schellekens, J. D. van Embden and L. M. Schouls (1996). "Predominance of two Bartonella henselae variants among cat-scratch disease patients in the Netherlands." J Clin Microbiol **34**(2): 254-60.

Betz, T. G., J. A. Rawlings, J. P. Taylor and B. L. Davis (1983). "Endemic typhus in Texas." Tex Med **79**(11): 48-53.

Birtles, R. J., J. Canales, P. Ventosilla, E. Alvarez, H. Guerra, A. Llanos-Cuentas, D. Raoult, N. Doshi and T. G. Harrison (1999). "Survey of Bartonella species infecting intradomicillary animals in the Huayllacallan Valley, Ancash, Peru, a region endemic for human bartonellosis." Am J Trop Med Hyg **60**(5): 799-805.

Birtles, R. J., T. G. Harrison and D. H. Molyneux (1994). "Grahamella in small woodland mammals in the U.K.: isolation, prevalence and host specificity." Ann Trop Med Parasitol **88**(3): 317-27.

Birtles, R. J., S. Hazel, K. Bown, D. Raoult, M. Begon and M. Bennett (2000). "Subtyping of uncultured bartonellae using sequence comparison of 16 S/23 S rRNA intergenic spacer regions amplified directly from infected blood." Mol Cell Probes **14**(2): 79-87.

Birtles, R. J. and D. Raoult (1996). "Comparison of partial citrate synthase gene (gltA) sequences for phylogenetic analysis of Bartonella species." Int J Syst Bacteriol **46**(4): 891-7.

Bitam, I., P. Parola, K. D. De La Cruz, K. Matsumoto, B. Baziz, J. M. Rolain, M. Belkaid and D. Raoult (2006). "First molecular detection of Rickettsia felis in fleas from Algeria." Am J Trop Med Hyg **74**(4): 532-5.

Blair, P. J., J. Jiang, G. B. Schoeler, C. Moron, E. Anaya, M. Cespedes, C. Cruz, V. Felices, C. Guevara, L. Mendoza, P. Villaseca, J. W. Sumner, A. L. Richards and J. G. Olson (2004). "Characterization of spotted fever group rickettsiae in flea and tick specimens from northern Peru." J Clin Microbiol **42**(11): 4961-7.

Blanco, J. R., L. Perez-Martinez, M. Vallejo, S. Santibanez, A. Portillo and J. A. Oteo (2006). "Prevalence of rickettsia felis-like and Bartonella Spp. in Ctenocephalides felis and Ctenocephalides canis from La Rioja (Northern Spain)." Ann N Y Acad Sci **1078**: 270-4.

Boostrom, A., M. S. Beier, J. A. Macaluso, K. R. Macaluso, D. Sprenger, J. Hayes, S. Radulovic and A. F. Azad (2002). "Geographic association of Rickettsia felis-infected opossums with human murine typhus, Texas." Emerg Infect Dis **8**(6): 549-54.

Boulouis, H. J., F. Barrat, D. Bermond, F. Bernex, D. Thibault, R. Heller, J. J. Fontaine, Y. Piemont and B. B. Chomel (2001). "Kinetics of Bartonella birtlesii infection in experimentally infected mice and pathogenic effect on reproductive functions." Infect Immun **69**(9): 5313-7.

Boulouis, H. J., C. C. Chang, J. B. Henn, R. W. Kasten and B. B. Chomel (2005). "Factors associated with the rapid emergence of zoonotic Bartonella infections." Vet Res **36**(3): 383-410.

Bouyer, D. H., J. Stenos, P. Crocquet-Valdes, C. G. Moron, V. L. Popov, J. E. Zavala-Velazquez, L. D. Foil, D. R. Stothard, A. F. Azad and D. H. Walker (2001). "Rickettsia felis: molecular characterization of a new member of the spotted fever group." Int J Syst Evol Microbiol **51**(Pt 2): 339-47.

Bovarnick, M. R., L. Schneider and H. Walter (1959). "The incorporation of labeled methionine by typhus rickettsiae." Biochim Biophys Acta **33**(2): 414-22.

Bown, K. J., M. Bennet and M. Begon (2004). "Flea-borne Bartonella grahamii and Bartonella taylorii in bank voles." Emerg Infect Dis **10**(4): 684-7.

Breitschwerdt, E. B., C. E. Atkins, T. T. Brown, D. L. Kordick and P. S. Snyder (1999). "Bartonella vinsonii subsp. berkhoffii and related members of the alpha subdivision of the Proteobacteria in dogs with cardiac arrhythmias, endocarditis, or myocarditis." J Clin Microbiol **37**(11): 3618-26.

Breitschwerdt, E. B., K. R. Blann, M. E. Stebbins, K. R. Munana, M. G. Davidson, H. A. Jackson and M. D. Willard (2004). "Clinicopathological Abnormalities and Treatment Response in 24 Dogs Seroreactive to Bartonella vinsonii (berkhoffii) Antigens." J Am Anim Hosp Assoc **40**(2): 92-101.

Breitschwerdt, E. B., B. C. Hegarty and S. I. Hancock (1998). "Sequential evaluation of dogs naturally infected with Ehrlichia canis, Ehrlichia chaffeensis, Ehrlichia equi, Ehrlichia ewingii, or Bartonella vinsonii." J Clin Microbiol **36**(9): 2645-51.

Breitschwerdt, E. B., B. C. Hegarty, R. Maggi, E. Hawkins and P. Dyer (2005). "Bartonella species as a potential cause of epistaxis in dogs." J Clin Microbiol **43**(5): 2529-33.

Breitschwerdt, E. B. and D. L. Kordick (2000). "Bartonella infection in animals: carriership, reservoir potential, pathogenicity, and zoonotic potential for human infection." Clin Microbiol Rev **13**(3): 428-38.

Breitschwerdt, E. B., D. L. Kordick, D. E. Malarkey, B. Keene, T. L. Hadfield and K. Wilson (1995). "Endocarditis in a dog due to infection with a novel Bartonella subspecies." J Clin Microbiol **33**(1): 154-60.

Brenner, D. J., S. P. O'Connor, H. H. Winkler and A. G. Steigerwalt (1993). "Proposals to unify the genera Bartonella and Rochalimaea, with descriptions of Bartonella quintana comb. nov., Bartonella vinsonii comb. nov., Bartonella henselae comb. nov., and Bartonella elizabethae comb. nov., and to remove the family Bartonellaceae from the order Rickettsiales." Int J Syst Bacteriol **43**(4): 777-86.

Brigham, G. D. (1937). "Susceptibility of animals to endemic typhus fever." Public Health Reports(52): 660-662.

Brigham, G. D. and R. E. Dyer (1938). " EndemicTyph-us Fever in Native Rodents." J.A.M.A. **3**(110): 180.

Brill, N. E. (1910). "An acute febrile illness of unknown origin : a clinical study based on 221 cases." Am. J. Med. Sci. **139**: 484- 502.

Brouqui, P., P. Parola, P. E. Fournier and D. Raoult (2007). "Spotted fever rickettsioses in southern and eastern Europe." FEMS Immunol Med Microbiol **49**(1): 2-12.

Brouqui, P. and D. Raoult (2006). "Arthropod-borne diseases in homeless." Ann N Y Acad Sci **1078**: 223-35.

Bruckert, F., E. de Kerviler, A. M. Zagdanski, J. M. Molina, I. Casin, A. Guermazi, J. Bedrossian and J. Frija (1997). "Sternal abscess due to Bartonella (Rochalimaea) henselae in a renal transplant patient." Skeletal Radiol **26**(7): 431-3.

Caniza, M. A., D. L. Granger, K. H. Wilson, M. K. Washington, D. L. Kordick, D. P. Frush and R. B. Blitchington (1995). "Bartonella henselae: etiology of pulmonary nodules in a patient with depressed cell-mediated immunity." Clin Infect Dis **20**(6): 1505-11.

Carithers, H. A. (1985). "Cat-scratch disease. An overview based on a study of 1,200 patients." Am J Dis Child **139**(11): 1124-33.

Case, J. B., B. Chomel, W. Nicholson and J. E. Foley (2006). "Serological survey of vector-borne zoonotic pathogens in pet cats and cats from animal shelters and feral colonies." J Feline Med Surg **8**(2): 111-7.

Castle, K. T., M. Kosoy, K. Lerdthusnee, L. Phelan, Y. Bai, K. L. Gage, W. Leepitakrat, T. Monkanna, N. Khlaimanee, K. Chandranoi, J. W. Jones and R. E. Coleman (2004). "Prevalence and diversity of Bartonella in rodents of northern Thailand: a comparison with Bartonella in rodents from southern China." Am J Trop Med Hyg **70**(4): 429-33.

Chang, C., K. Yamamoto, B. B. Chomel, R. W. Kasten, D. C. Simpson, C. R. Smith and V. L. Kramer (1999). "Seroepidemiology of Bartonella vinsonii subsp. berkhoffii infection in California coyotes, 1994-1998." Emerg Infect Dis **5**(5): 711-5.

Chang, C. C., B. B. Chomel, R. W. Kasten, V. Romano and N. Tietze (2001). "Molecular evidence of Bartonella spp. in questing adult Ixodes pacificus ticks in California." J Clin Microbiol **39**(4): 1221-6.

Chang, C. C., R. W. Kasten, B. B. Chomel, D. C. Simpson, C. M. Hew, D. L. Kordick, R. Heller, Y. Piemont and E. B. Breitschwerdt (2000). "Coyotes (Canis latrans) as the reservoir for a human pathogenic Bartonella sp.: molecular epidemiology of Bartonella vinsonii subsp. berkhoffii infection in coyotes from central coastal California." J Clin Microbiol **38**(11): 4193-200.

Chaniotis, B. Αρθρόποδα και Δημόσια Υγεία: Λοιμώξεις, Αλλεργίες και Εξωπαρασιτισμός., Zymel.

Childs, J. E., B. A. Ellis, W. L. Nicholson, M. Kosoy and J. W. Sumner (1999). "Shared vector-borne zoonoses of the Old World and New World: home grown or translocated?" Schweiz Med Wochenschr **129**(31-32): 1099-105.

Chomel, B. B. (2000). "Cat-scratch disease." Rev Sci Tech **19**(1): 136-50.

Chomel, B. B., R. C. Abbott, R. W. Kasten, K. A. Floyd-Hawkins, P. H. Kass, C. A. Glaser, N. C. Pedersen and J. E. Koehler (1995). "Bartonella henselae prevalence in domestic cats in California: risk factors and association between bacteremia and antibody titers." J Clin Microbiol **33**(9): 2445-50.

Chomel, B. B., H. J. Boulouis and E. B. Breitschwerdt (2004a). "Cat scratch disease and other zoonotic Bartonella infections." J Am Vet Med Assoc **224**(8): 1270-9.

Chomel, B. B., E. T. Carlos, R. W. Kasten, K. Yamamoto, C. C. Chang, R. S. Carlos, M. V. Abenes and C. M. Pajares (1999). "Bartonella henselae and Bartonella clarridgeiae infection in domestic cats from The Philippines." Am J Trop Med Hyg **60**(4): 593-7.

Chomel, B. B., R. W. Kasten, K. Floyd-Hawkins, B. Chi, K. Yamamoto, J. Roberts-Wilson, A. N. Gurfield, R. C. Abbott, N. C. Pedersen and J. E. Koehler (1996). "Experimental transmission of Bartonella henselae by the cat flea." J Clin Microbiol **34**(8): 1952-6.

Chomel, B. B., Y. Kikuchi, J. S. Martenson, M. E. Roelke-Parker, C. C. Chang, R. W. Kasten, J. E. Foley, J. Laudre, K. Murphy, P. K. Swift, V. L. Kramer and J. O'Brien S (2004b). "Seroprevalence of Bartonella infection in American free-ranging and captive pumas (Felis concolor) and bobcats (Lynx rufus)." Vet Res **35**(2): 233-41.

Chomel, B. B., K. A. Mac Donald, R. W. Kasten, C. C. Chang, A. C. Wey, J. E. Foley, W. P. Thomas and M. D. Kittleson (2001). "Aortic valve endocarditis in a dog due to Bartonella clarridgeiae." J Clin Microbiol **39**(10): 3548-54.

Chomel, B. B., A. C. Wey and R. W. Kasten (2003a). "Isolation of Bartonella washoensis from a dog with mitral valve endocarditis." J Clin Microbiol **41**(11): 5327-32.

Chomel, B. B., A. C. Wey, R. W. Kasten, B. A. Stacy and P. Labelle (2003b). "Fatal case of endocarditis associated with Bartonella henselae type I infection in a domestic cat." J Clin Microbiol **41**(11): 5337-9.

Chung, C. Y., R. W. Kasten, S. M. Paff, B. A. Van Horn, M. Vayssier-Taussat, H. J. Boulouis and B. B. Chomel (2004). "Bartonella spp. DNA associated with biting flies from California." Emerg Infect Dis **10**(7): 1311-3.

Comer, J. A., T. Diaz, D. Vlahov, E. Monterroso and J. E. Childs (2001). "Evidence of rodent-associated Bartonella and Rickettsia infections among intravenous drug users from Central and East Harlem, New York City." Am J Trop Med Hyg **65**(6): 855-60.

Comer, J. A., C. Flynn, R. L. Regnery, D. Vlahov and J. E. Childs (1996). "Antibodies to Bartonella species in inner-city intravenous drug users in Baltimore, Md." Arch Intern Med **156**(21): 2491-5.

Concannon, R., K. Wynn-Owen, V. R. Simpson and R. J. Birtles (2005). "Molecular characterization of haemoparasites infecting bats (Microchiroptera) in Cornwall, UK." Parasitology **131**(Pt 4): 489-96.

Culic, O., V. Erakovic, I. Cepelak, K. Barisic, K. Brajsa, Z. Ferencic, R. Galovic, I. Glojnaric, Z. Manojlovic, V. Munic, R. Novak-Mircetic, V. Pavicic-Beljak, M. Sucic, M. Veljaca, T. Zanic-Grubisic and M. J. Parnham (2002). "Azithromycin modulates neutrophil function and circulating inflammatory mediators in healthy human subjects." Eur J Pharmacol **450**(3): 277-289.

Daly, J. S., M. G. Worthington, D. J. Brenner, C. W. Moss, D. G. Hollis, R. S. Weyant, A. G. Steigerwalt, R. E. Weaver, M. I. Daneshvar and S. P. O'Connor (1993). "Rochalimaea elizabethae sp. nov. isolated from a patient with endocarditis." J Clin Microbiol **31**(4): 872-81.

De Sousa, R., P. Edouard-Fournier, M. Santos-Silva, F. Amaro, F. Bacellar and D. Raoult (2006). "Molecular detection of Rickettsia felis, Rickettsia typhi and two genotypes closely related to Bartonella elizabethae." Am J Trop Med Hyg **75**(4): 727-31.

De Sousa, R., M. Santos-Silva, A. S. Santos, S. C. Barros, J. Torgal, D. H. Walker and F. Bacellar (2007). "Rickettsia conorii Israeli tick typhus strain isolated from Rhipicephalus sanguineus ticks in Portugal." Vector Borne Zoonotic Dis **7**(3): 444-7.

Debre, R. and J. C. Job (1954). "[Cat scratch disease.]." Acta Paediatr Suppl **43**(96): 1-86.

Debre, R., M. Lamy, M. L. Jammet, L. Costil and P. Mozziconacci (1950). "[Cat scratch disease.]." Sem Hop **26**(40): 1895-1904.

Dehio, C. (2004). "Molecular and cellular basis of bartonella pathogenesis." Annu Rev Microbiol **58**: 365-90.

Demers, D. M., J. W. Bass, J. M. Vincent, D. A. Person, D. K. Noyes, C. M. Staege, C. P. Samlaska, N. H. Lockwood, R. L. Regnery and B. E. Anderson (1995). "Cat-scratch disease in Hawaii: etiology and seroepidemiology." J Pediatr **127**(1): 23-6.

Derrick, E. H. and J. H. Pope (1960). "Murine typhus, mice, rats and fleas on the Darling Downs." Med J Aust **47(2)**: 924-8.

Dharnidharka, V. R., G. A. Richard, R. E. Neiberger and R. S. Fennell, 3rd (2002). "Cat scratch disease and acute rejection after pediatric renal transplantation." Pediatr Transplant **6**(4): 327-31.

Drancourt, M., G. Aboudharam, M. Signoli, O. Dutour and D. Raoult (1998). "Detection of 400-year-old Yersinia pestis DNA in human dental pulp: an approach to the diagnosis of ancient septicemia." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(21): 12637-40.

Drancourt, M., R. Birtles, G. Chaumentin, F. Vandenesch, J. Etienne and D. Raoult (1996). "New serotype of Bartonella henselae in endocarditis and cat-scratch disease." Lancet **347**(8999): 441-3.

Drancourt, M., R. L. Regnery and D. Raoult (1991). Identification of tick-isolates by centrifugation-shell vial assay by polymerase chain reaction and restriction endonuclease length polymorphism analysis. Rickattsiae and Rickettsial Diseases. J. Kazar and D. Raoult. Bratislava, Slovac Academy of Sciences**:** 232.

Droz, S., B. Chi, E. Horn, A. G. Steigerwalt, A. M. Whitney and D. J. Brenner (1999). "Bartonella koehlerae sp. nov., isolated from cats." J Clin Microbiol **37**(4): 1117-22.

Dumler, J. S., J. P. Taylor and D. H. Walker (1991). "Clinical and laboratory features of murine typhus in south Texas, 1980 through 1987." Jama **266**(10): 1365-70.

Dyer, R., A. Rumreich and L. F. Badger (1931). "A virus of the typhus type derived from fleas collected from wild rats " Public Health Rep. **46**: 334.

Edlinger, E. (1980). "[3Autochthonous cases of murine typhus in France?]." Bull Soc Pathol Exot Filiales **73**(1): 48-53.

Ehrenborg, C., L. Wesslen, A. Jakobson, G. Friman and M. Holmberg (2000). "Sequence variation in the ftsZ gene of Bartonella henselae isolates and clinical samples." J Clin Microbiol **38**(2): 682-7.

Ellis, B. A., R. L. Regnery, L. Beati, F. Bacellar, M. Rood, G. G. Glass, E. Marston, T. G. Ksiazek, D. Jones and J. E. Childs (1999). "Rats of the genus Rattus are reservoir hosts for pathogenic Bartonella species: an Old World origin for a New World disease?" J Infect Dis **180**(1): 220-4.

Engbaek, K. and P. A. Lawson (2004). "Identification of Bartonella species in rodents, shrews and cats in Denmark: detection of two B. henselae variants, one in cats and the other in the long-tailed field mouse." Apmis **112**(6): 336-41.

Eskey, C. R. and F. M. Hemphill (1948). "Relation of reported cases of typhus fever to location, temperature, and precipitation." Public Health Rep.(63): 941-48.

Fenollar, F. and D. Raoult (2004). "Molecular genetic methods for the diagnosis of fastidious microorganisms." Apmis **112**(11-12): 785-807.

Finkelstein, J. L., T. P. Brown, K. L. O'Reilly, J. Wedincamp, Jr. and L. D. Foil (2002). "Studies on the growth of Bartonella henselae in the cat flea (Siphonaptera: Pulicidae)." J Med Entomol **39**(6): 915-9.

Fishbein, D. B., M. G. Frontini, R. Giles and L. L. Vernon (1990). "Fatal cases of Rocky Mountain spotted fever in the United States, 1981-1988." Ann N Y Acad Sci **590**: 246-7.

Foil, L., E. Andress, R. L. Freeland, A. F. Roy, R. Rutledge, P. C. Triche and K. L. O'Reilly (1998). "Experimental infection of domestic cats with Bartonella henselae by inoculation of Ctenocephalides felis (Siphonaptera: Pulicidae) feces." J Med Entomol **35**(5): 625-8.

Foucault, C., K. Barrau, P. Brouqui and D. Raoult (2002). "Bartonella quintana Bacteremia among Homeless People." Clin Infect Dis **35**(6): 684-9.

Foucault, C., P. Brouqui and D. Raoult (2006). "Bartonella quintana characteristics and clinical management." Emerg Infect Dis **12**(2): 217-23.

Foucault, C., B. La Scola, H. Lindroos, S. G. Andersson and D. Raoult (2005). "Multispacer typing technique for sequence-based typing of Bartonella quintana." J Clin Microbiol **43**(1): 41-8.

Fournier, P. E., H. Lelievre, S. J. Eykyn, J. L. Mainardi, T. J. Marrie, F. Bruneel, C. Roure, J. Nash, D. Clave, E. James, C. Benoit-Lemercier, L. Deforges, H. Tissot-Dupont and D. Raoult (2001a). "Epidemiologic and clinical characteristics of Bartonella quintana and Bartonella henselae endocarditis: a study of 48 patients." Medicine (Baltimore) **80**(4): 245-51.

Fournier, P. E., J. L. Mainardi and D. Raoult (2002). "Value of microimmunofluorescence for diagnosis and follow-up of Bartonella endocarditis." Clin Diagn Lab Immunol **9**(4): 795-801.

Fournier, P. E., M. F. Minnick, H. Lepidi, E. Salvo and D. Raoult (2001b). "Experimental model of human body louse infection using green fluorescent protein-expressing Bartonella quintana." Infect Immun **69**(3): 1876-9.

Fox, G. E., E. Stackebrandt, R. B. Hespell, J. Gibson, J. Maniloff, T. A. Dyer, R. S. Wolfe, W. E. Balch, R. S. Tanner, L. J. Magrum, L. B. Zablen, R. Blakemore, R. Gupta, L. Bonen, B. J. Lewis, D. A. Stahl, K. R. Luehrsen, K. N. Chen and C. R. Woese (1980). "The phylogeny of prokaryotes." Science **209**(4455): 457-63.

Freyche, M. J. and Z. Deutschman (1950). "Human rickettsioses in Africa. ." Epidemiol.Vital Stat.Rep.(WHO 3): 160-201.

Galvao, M. A., C. Mafra, C. B. Chamone, S. B. Calic, J. E. Zavala-Velazquez and D. H. Walker (2004). "Clinical and laboratorial evidence of Rickettsia felis infections in Latin America." Rev Soc Bras Med Trop **37**(3): 238-40.

Gerber, J. E., J. E. Johnson, M. A. Scott and K. T. Madhusudhan (2002). "Fatal meningitis and encephalitis due to Bartonella henselae bacteria." J Forensic Sci **47**(3): 640-4.

Gikas, A., S. Doukakis, J. Pediaditis, S. Kastanakis, A. Manios and Y. Tselentis (2004). "Comparison of the effectiveness of five different antibiotic regimens on infection with Rickettsia typhi: therapeutic data from 87 cases." Am J Trop Med Hyg **70**(5): 576-9.

Gillespie, T. N., R. J. Washabau, M. H. Goldschmidt, J. M. Cullen, A. R. Rogala and E. B. Breitschwerdt (2003). "Detection of Bartonella henselae and Bartonella clarridgeiae DNA in hepatic specimens from two dogs with hepatic disease." J Am Vet Med Assoc **222**(1): 47-51, 35.

Gilmore, R. D., Jr., N. Joste and G. A. McDonald (1989). "Cloning, expression and sequence analysis of the gene encoding the 120 kD surface-exposed protein of Rickettsia rickettsii." Mol Microbiol **3**(11): 1579-86.

Gimenez, D. F. (1964). "Staining Rickettsiae in Yolk-Sac Cultures." Stain Technol **39**: 135-40.

Glaus, T., R. Hofmann-Lehmann, C. Greene, B. Glaus, C. Wolfensberger and H. Lutz (1997). "Seroprevalence of Bartonella henselae infection and correlation with disease status in cats in Switzerland." J Clin Microbiol **35**(11): 2883-5.

Gray, A. V., K. S. Michels, A. K. Lauer and J. R. Samples (2004). "Bartonella henselae infection associated with neuroretinitis, central retinal artery and vein occlusion, neovascular glaucoma, and severe vision loss." Am J Ophthalmol **137**(1): 187-9.

Greene, C. E., M. McDermott, P. H. Jameson, C. L. Atkins and A. M. Marks (1996). "Bartonella henselae infection in cats: evaluation during primary infection, treatment, and rechallenge infection." J Clin Microbiol **34**(7): 1682-5.

Gundi, V. A., B. Davoust, A. Khamis, M. Boni, D. Raoult and B. La Scola (2004). "Isolation of Bartonella rattimassiliensis sp. nov. and Bartonella phoceensis sp. nov. from European Rattus norvegicus." J Clin Microbiol **42**(8): 3816-8.

Guptill, L. (2003). "Bartonellosis." Vet Clin North Am Small Anim Pract **33**(4): 809-25.

Guptill, L., L. Slater, C. C. Wu, T. L. Lin, L. T. Glickman, D. F. Welch and H. HogenEsch (1997). "Experimental infection of young specific pathogen-free cats with Bartonella henselae." J Infect Dis **176**(1): 206-16.

Guptill, L., L. N. Slater, C. C. Wu, T. L. Lin, L. T. Glickman, D. F. Welch, J. Tobolski and H. HogenEsch (1998). "Evidence of reproductive failure and lack of perinatal transmission of Bartonella henselae in experimentally infected cats." Vet Immunol Immunopathol **65**(2-4): 177-89.

Gurfield, A. N., H. J. Boulouis, B. B. Chomel, R. Heller, R. W. Kasten, K. Yamamoto and Y. Piemont (1997). "Coinfection with Bartonella clarridgeiae and Bartonella henselae and with different Bartonella henselae strains in domestic cats." J Clin Microbiol **35**(8): 2120-3.

Gurfield, A. N., H. J. Boulouis, B. B. Chomel, R. W. Kasten, R. Heller, C. Bouillin, C. Gandoin, D. Thibault, C. C. Chang, F. Barrat and Y. Piemont (2001). "Epidemiology of Bartonella infection in domestic cats in France." Vet Microbiol **80**(2): 185-98.

Hadfield, T. L., R. Warren, M. Kass, E. Brun and C. Levy (1993). "Endocarditis caused by Rochalimaea henselae." Hum Pathol **24**(10): 1140-1.

Haimerl, M., A. M. Tenter, K. Simon, M. Rommel, J. Hilger and I. B. Autenrieth (1999). "Seroprevalence of Bartonella henselae in cats in Germany." J Med Microbiol **48**(9): 849-56.

Hashkes, P. J., A. Trabulsi and M. H. Passo (1996). "Systemic cat-scratch disease presenting as leukocytoclastic vasculitis." Pediatr Infect Dis J **15**(1): 93-5.

Hayem, F., S. Chacar and G. Hayem (1996). "Bartonella henselae infection mimicking systemic onset juvenile chronic arthritis in a 2 1/2-year-old girl." J Rheumatol **23**(7): 1263-5.

Hechemy, K. E., R. W. Stevens, S. Sasowski, E. E. Michaelson, E. A. Casper and R. N. Philip (1979). "Discrepancies in Weil-Felix and microimmunofluorescence test results for Rocky Mountain spotted fever." J Clin Microbiol **9**(2): 292-3.

Heller, R., M. Artois, V. Xemar, D. De Briel, H. Gehin, B. Jaulhac, H. Monteil and Y. Piemont (1997). "Prevalence of Bartonella henselae and Bartonella clarridgeiae in stray cats." J Clin Microbiol **35**(6): 1327-31.

Heller, R., P. Riegel, Y. Hansmann, G. Delacour, D. Bermond, C. Dehio, F. Lamarque, H. Monteil, B. Chomel and Y. Piemont (1998). "Bartonella tribocorum sp. nov., a new Bartonella species isolated from the blood of wild rats." Int J Syst Bacteriol **48 Pt 4**: 1333-9.

Henn, J. B., C. H. Liu, R. W. Kasten, B. A. VanHorn, L. A. Beckett, P. H. Kass and B. B. Chomel (2005). "Seroprevalence of antibodies against Bartonella species and evaluation of risk factors and clinical signs associated with seropositivity in dogs." Am J Vet Res **66**(4): 688-94.

Higgins, J. A., S. Radulovic, D. C. Jaworski and A. F. Azad (1996). "Acquisition of the cat scratch disease agent Bartonella henselae by cat fleas (Siphonaptera:Pulicidae)." J Med Entomol **33**(3): 490-5.

Hofmeister, E. K., C. P. Kolbert, A. S. Abdulkarim, J. M. Magera, M. K. Hopkins, J. R. Uhl, A. Ambyaye, S. R. Telford, 3rd, F. R. Cockerill, 3rd and D. H. Persing (1998). "Cosegregation of a novel Bartonella species with Borrelia burgdorferi and Babesia microti in Peromyscus leucopus." J Infect Dis **177**(2): 409-16.

Holmberg, M., J. N. Mills, S. McGill, G. Benjamin and B. A. Ellis (2003). "Bartonella infection in sylvatic small mammals of central Sweden." Epidemiol Infect **130**(1): 149-57.

Honadel, T. E., B. B. Chomel, K. Yamamoto, C. Chang and T. B. Farver (2001). "Seroepidemiology of Bartonella vinsonii subsp berkhoffii exposure among healthy dogs." J Am Vet Med Assoc **219**(4): 480-4.

Hone, F. S. (1927). "Endemic typhus fever in Australia." Med.J.Aust. **2**: 213-226.

Houpikian, P. and D. Raoult (2001). "16S/23S rRNA intergenic spacer regions for phylogenetic analysis, identification, and subtyping of Bartonella species." J Clin Microbiol **39**(8): 2768-78.

Humar, A. and I. Salit (1999). "Disseminated Bartonella infection with granulomatous hepatitis in a liver transplant recipient." Liver Transpl Surg **5**(3): 249-51.

Iralu, J., Y. Bai, L. Crook, B. Tempest, G. Simpson, T. McKenzie and F. Koster (2006). "Rodent-associated Bartonella febrile illness, Southwestern United States." Emerg Infect Dis **12**(7): 1081-6.

Iredell, J., D. Blanckenberg, M. Arvand, S. Grauling, E. J. Feil and R. J. Birtles (2003). "Characterization of the natural population of Bartonella henselae by multilocus sequence typing." J Clin Microbiol **41**(11): 5071-9.

Ito, S., J. W. Vinson and J. Whitescarver (1978). Ultrastructural observations of Rickettsia typhi in human body louse. Rickattsiae and Rickattsial Diseases. J. Kazar, R. A. Ormsbee and I. N. Tarasevich. Bratislava, Slovak Academy of Science**:** 53-64.

Ives, T. J., P. Manzewitsch, R. L. Regnery, J. D. Butts and M. Kebede (1997). "In vitro susceptibilities of Bartonella henselae, B. quintana, B. elizabethae, Rickettsia rickettsii, R. conorii, R. akari, and R. prowazekii to macrolide antibiotics as determined by immunofluorescent-antibody analysis of infected Vero cell monolayers." Antimicrob Agents Chemother **41**(3): 578-82.

Ives, T. J., E. L. Marston, R. L. Regnery and J. D. Butts (2001). "In vitro susceptibilities of Bartonella and Rickettsia spp. to fluoroquinolone antibiotics as determined by immunofluorescent antibody analysis of infected Vero cell monolayers." Int J Antimicrob Agents **18**(3): 217-22.

Ives, T. J., E. L. Marston, R. L. Regnery, J. D. Butts and T. C. Majerus (2000). "In vitro susceptibilities of Rickettsia and Bartonella spp. to 14-hydroxy-clarithromycin as determined by immunofluorescent antibody analysis of infected vero cell monolayers." J Antimicrob Chemother **45**(3): 305-10.

Jacobs, R. F. and G. E. Schutze (1998). "Bartonella henselae as a cause of prolonged fever and fever of unknown origin in children." Clin Infect Dis **26**(1): 80-4.

Jacomo, V., P. J. Kelly and D. Raoult (2002). "Natural history of Bartonella infections (an exception to Koch's postulate)." Clin Diagn Lab Immunol **9**(1): 8-18.

Jameson, P., C. Greene, R. Regnery, M. Dryden, A. Marks, J. Brown, J. Cooper, B. Glaus and R. Greene (1995). "Prevalence of Bartonella henselae antibodies in pet cats throughout regions of North America." J Infect Dis **172**(4): 1145-9.

Jensen, W. A., M. Z. Fall, J. Rooney, D. L. Kordick and E. B. Breitschwerdt (2000). "Rapid identification and differentiation of Bartonella species using a single-step PCR assay." J Clin Microbiol **38**(5): 1717-22.

Juminer, B. (1972). "Recherche d' agglutinines anti-Rickettsia chez Cricetomys gambianus Waterhouse a' Dakar. ." Arch.Inst. Pasteur Tunis,(49): 235-42.

Juskevicius, R. and C. Vnencak-Jones (2004). "Pathologic quiz case: a 17-year-old renal transplant patient with persistent fever, pancytopenia, and axillary lymphadenopathy. Bacillary angiomatosis of the lymph node in the renal transplant recipient." Arch Pathol Lab Med **128**(1): e12-4.

Kaplan, J. E. and L. B. Schonberger (1986). "The sensitivity of various serologic tests in the diagnosis of Rocky Mountain spotted fever." Am J Trop Med Hyg **35**(4): 840-4.

Kelly, P., J. M. Rolain and D. Raoult (2005). "Prevalence of human pathogens in cat and dog fleas in New Zealand." N Z Med J **118**(1226): U1754.

Kelly, P. J., N. Meads, A. Theobald, P. E. Fournier and D. Raoult (2004). "Rickettsia felis, Bartonella henselae, and B. clarridgeiae, New Zealand." Emerg Infect Dis **10**(5): 967-8.

Kelly, T. M., I. Padmalayam and B. R. Baumstark (1998). "Use of the cell division protein FtsZ as a means of differentiating among Bartonella species." Clin Diagn Lab Immunol **5**(6): 766-72.

Kenny, M. J., R. J. Birtles, M. J. Day and S. E. Shaw (2003). "Rickettsia felis in the United Kingdom." Emerg Infect Dis **9**(8): 1023-4.

Kerkhoff, F. T., A. M. Bergmans, A. van Der Zee and A. Rothova (1999). "Demonstration of Bartonella grahamii DNA in ocular fluids of a patient with neuroretinitis." J Clin Microbiol **37**(12): 4034-8.

Ketring, K. L., E. E. Zuckerman and W. D. Hardy, Jr. (2004). "Bartonella: a new etiological agent of feline ocular disease." J Am Anim Hosp Assoc **40**(1): 6-12.

Kitchell, B. E., T. M. Fan, D. Kordick, E. B. Breitschwerdt, G. Wollenberg and C. A. Lichtensteiger (2000). "Peliosis hepatis in a dog infected with Bartonella henselae." J Am Vet Med Assoc **216**(4): 519-23, 517.

Koehler, J. E., C. A. Glaser and J. W. Tappero (1994). "Rochalimaea henselae infection. A new zoonosis with the domestic cat as reservoir." Jama **271**(7): 531-5.

Koehler, J. E., M. A. Sanchez, C. S. Garrido, M. J. Whitfeld, F. M. Chen, T. G. Berger, M. C. Rodriguez-Barradas, P. E. LeBoit and J. W. Tappero (1997). "Molecular epidemiology of bartonella infections in patients with bacillary angiomatosis-peliosis." N Engl J Med **337**(26): 1876-83.

Koehler, J. E. and J. W. Tappero (1993). "Bacillary angiomatosis and bacillary peliosis in patients infected with human immunodeficiency virus." Clin Infect Dis **17**(4): 612-24.

Koesling, J., T. Aebischer, C. Falch, R. Schulein and C. Dehio (2001). "Cutting edge: antibody-mediated cessation of hemotropic infection by the intraerythrocytic mouse pathogen Bartonella grahamii." J Immunol **167**(1): 11-4.

Koliou, M., A. Psaroulaki, C. Georgiou, I. Ioannou, Y. Tselentis and A. Gikas (2007). "Murine typhus in Cyprus: 21 paediatric cases." Eur J Clin Microbiol Infect Dis **26**(7): 491-3.

Komitova, R., A. Lakos, A. Aleksandrov, I. Christova and M. Murdjeva (2003). "A case of tick-transmitted lymphadenopathy in Bulgaria associated with Rickettsia slovaca." Scand J Infect Dis **35**(3): 213.

Kordick, D. L. and E. B. Breitschwerdt (1997). "Relapsing bacteremia after blood transmission of Bartonella henselae to cats." Am J Vet Res **58**(5): 492-7.

Kordick, D. L. and E. B. Breitschwerdt (1998). "Persistent infection of pets within a household with three Bartonella species." Emerg Infect Dis **4**(2): 325-8.

Kordick, D. L., T. T. Brown, K. Shin and E. B. Breitschwerdt (1999). "Clinical and pathologic evaluation of chronic Bartonella henselae or Bartonella clarridgeiae infection in cats." J Clin Microbiol **37**(5): 1536-47.

Kordick, D. L., E. J. Hilyard, T. L. Hadfield, K. H. Wilson, A. G. Steigerwalt, D. J. Brenner and E. B. Breitschwerdt (1997a). "Bartonella clarridgeiae, a newly recognized zoonotic pathogen causing inoculation papules, fever, and lymphadenopathy (cat scratch disease)." J Clin Microbiol **35**(7): 1813-8.

Kordick, D. L., M. G. Papich and E. B. Breitschwerdt (1997b). "Efficacy of enrofloxacin or doxycycline for treatment of Bartonella henselae or Bartonella clarridgeiae infection in cats." Antimicrob Agents Chemother **41**(11): 2448-55.

Kordick, D. L., B. Swaminathan, C. E. Greene, K. H. Wilson, A. M. Whitney, S. O'Connor, D. G. Hollis, G. M. Matar, A. G. Steigerwalt, G. B. Malcolm, P. S. Hayes, T. L. Hadfield, E. B. Breitschwerdt and D. J. Brenner (1996). "Bartonella vinsonii subsp. berkhoffii subsp. nov., isolated from dogs; Bartonella vinsonii subsp. vinsonii; and emended description of Bartonella vinsonii." Int J Syst Bacteriol **46**(3): 704-9.

Kordick, D. L., K. H. Wilson, D. J. Sexton, T. L. Hadfield, H. A. Berkhoff and E. B. Breitschwerdt (1995). "Prolonged Bartonella bacteremia in cats associated with cat-scratch disease patients." J Clin Microbiol **33**(12): 3245-51.

Kosoy, M., M. Murray, R. D. Gilmore, Jr., Y. Bai and K. L. Gage (2003). "Bartonella strains from ground squirrels are identical to Bartonella washoensis isolated from a human patient." J Clin Microbiol **41**(2): 645-50.

Kosoy, M. Y., R. L. Regnery, O. I. Kosaya and J. E. Childs (1999). "Experimental infection of cotton rats with three naturally occurring Bartonella species." J Wildl Dis **35**(2): 275-84.

Kosoy, M. Y., R. L. Regnery, T. Tzianabos, E. L. Marston, D. C. Jones, D. Green, G. O. Maupin, J. G. Olson and J. E. Childs (1997). "Distribution, diversity, and host specificity of Bartonella in rodents from the Southeastern United States." Am J Trop Med Hyg **57**(5): 578-88.

Kosoy, M. Y., E. K. Saito, D. Green, E. L. Marston, D. C. Jones and J. E. Childs (2000). "Experimental evidence of host specificity of Bartonella infection in rodents." Comp Immunol Microbiol Infect Dis **23**(4): 221-38.

Krampitz, H. E. (1962). "[Further studies on Grahamella Brumpt 1911.]." Z Tropenmed Parasitol **13**: 34-53.

La Scola, B., Z. Liang, Z. Zeaiter, P. Houpikian, P. A. Grimont and D. Raoult (2002a). "Genotypic characteristics of two serotypes of Bartonella henselae." J Clin Microbiol **40**(6): 2002-8.

La Scola, B., S. Meconi, F. Fenollar, J. M. Rolain, V. Roux and D. Raoult (2002b). "Emended description of Rickettsia felis (Bouyer et al. 2001), a temperature-dependent cultured bacterium." Int J Syst Evol Microbiol **52**(Pt 6): 2035-41.

La Scola, B. and D. Raoult (1999). "Culture of Bartonella quintana and Bartonella henselae from human samples: a 5-year experience (1993 to 1998)." J Clin Microbiol **37**(6): 1899-905.

La, V. D., L. Tran-Hung, G. Aboudharam, D. Raoult and M. Drancourt (2005). "Bartonella quintana in domestic cat." Emerg Infect Dis **11**(8): 1287-9.

Lappin, M. R. and J. C. Black (1999). "Bartonella spp infection as a possible cause of uveitis in a cat." J Am Vet Med Assoc **214**(8): 1205-7, 1200.

Lappin, M. R., D. L. Kordick and E. B. Breitschwerdt (2000). "Bartonella spp antibodies and DNA in aqueous humour of cats." J Feline Med Surg **2**(1): 61-8.

Lawson, P. A. and M. D. Collins (1996). "Description of Bartonella clarridgeiae sp. nov. isolated from the cat of a patient with Bartonella henselae septicemia." Med. Microbiol. Lett.(5): 64–73.

Lee, J. Y., Y. M. Lee, S. Y. Shin, Y. J. Seol, Y. Ku, I. C. Rhyu, C. P. Chung and S. B. Han (2004). "Effect of subantimicrobial dose doxycycline as an effective adjunct to scaling and root planing." J Periodontol **75**(11): 1500-8.

Lépine, P. and N. Lorando (1935). "Le typhus exanthématique du. chat." Bull Soc Path Exot (28): 356-360.

Li, D. M., Q. Y. Liu, D. Z. Yu, J. Z. Zhang, Z. D. Gong and X. P. Song (2007). "Phylogenetic analysis of Bartonella detected in rodent fleas in Yunnan, China." J Wildl Dis **43**(4): 609-17.

Loftis, A. D., W. K. Reeves, D. E. Szumlas, M. M. Abbassy, I. M. Helmy, J. R. Moriarity and G. A. Dasch (2006). "Surveillance of Egyptian fleas for agents of public health significance: Anaplasma, Bartonella, Coxiella, Ehrlichia, Rickettsia, and Yersinia pestis." Am J Trop Med Hyg **75**(1): 41-8.

Lucey, D., M. J. Dolan, C. W. Moss, M. Garcia, D. G. Hollis, S. Wegner, G. Morgan, R. Almeida, D. Leong, K. S. Greisen and et al. (1992). "Relapsing illness due to Rochalimaea henselae in immunocompetent hosts: implication for therapy and new epidemiological associations." Clin Infect Dis **14**(3): 683-8.

MacDonald, K. A., B. B. Chomel, M. D. Kittleson, R. W. Kasten, W. P. Thomas and P. Pesavento (2004). "A prospective study of canine infective endocarditis in northern California (1999-2001): emergence of Bartonella as a prevalent etiologic agent." J Vet Intern Med **18**(1): 56-64.

Margileth, A. M. (1993). "Cat scratch disease." Adv Pediatr Infect Dis **8**: 1-21.

Marie, J. L., P. E. Fournier, J. M. Rolain, S. Briolant, B. Davoust and D. Raoult (2006). "Molecular detection of Bartonella quintana, B. Elizabethae, B. Koehlerae, B. Doshiae, B. Taylorii, and Rickettsia felis in rodent fleas collected in Kabul, Afghanistan." Am J Trop Med Hyg **74**(3): 436-9.

Marquez, F. J., M. A. Muniain, J. J. Rodriguez-Liebana, M. D. Del Toro, M. Bernabeu-Wittel and A. J. Pachon (2006). "Incidence and distribution pattern of Rickettsia felis in peridomestic fleas from Andalusia, Southeast Spain." Ann N Y Acad Sci **1078**: 344-6.

Marrero, M. and D. Raoult (1989). "Centrifugation-shell vial technique for rapid detection of Mediterranean spotted fever rickettsia in blood culture." Am J Trop Med Hyg **40**(2): 197-9.

Marshall, J. D., D. V. Ouy, F. L. Gibson, T. C. Dung and D. C. Cavanaugh (1967). "Ecology of plague in Vietnam: commensal rodents and their fleas." Mil Med **132**(11): 896-903.

Marston, E. L., J. W. Sumner and R. L. Regnery (1999). "Evaluation of intraspecies genetic variation within the 60 kDa heat-shock protein gene (groEL) of Bartonella species." Int J Syst Bacteriol **49 Pt 3**: 1015-23.

Maruyama, S., S. Nogami, I. Inoue, S. Namba, K. Asanome and Y. Katsube (1996). "Isolation of Bartonella henselae from domestic cats in Japan." J Vet Med Sci **58**(1): 81-3.

Maurin, M., S. Gasquet, C. Ducco and D. Raoult (1995). "MICs of 28 antibiotic compounds for 14 Bartonella (formerly Rochalimaea) isolates." Antimicrob Agents Chemother **39**(11): 2387-91.

Maurin, M. and D. Raoult (1996). "Bartonella (Rochalimaea) quintana infections." Clin Microbiol Rev **9**(3): 273-92.

Maxcy , K. F. (1926). "An epidemiological study of endemic typhus in the southeastern United States, with special reference to its mode of transmission." Publ.Health Rep. **41**: 2967-95.

McGill, S., J. Rajs, E. Hjelm, O. Lindquist and G. Friman (2003). "A study on forensic samples of Bartonella spp antibodies in Swedish intravenous heroin addicts." Apmis **111**(4): 507-13.

McGill, S., L. Wesslen, E. Hjelm, M. Holmberg, C. Rolf and G. Friman (2001). "Serological and epidemiological analysis of the prevalence of Bartonella spp. antibodies in Swedish elite orienteers 1992-93." Scand J Infect Dis **33**(6): 423-8.

Melendez, L. D., D. C. Twedt and M. Wright (2000). "Suspected doxycycline-induced esophagitis with esophageal stricture formation in three cats." Feline Practice 28(2): 10-12.

Mexas, A. M., S. I. Hancock and E. B. Breitschwerdt (2002). "Bartonella henselae and Bartonella elizabethae as potential canine pathogens." J Clin Microbiol **40**(12): 4670-4.

Miller, E. S. (1946). "Murine typhus fever." Medicine **25**: 1-15.

Mooser, H. (1928). J. Infectious Diseases **43**: 241-61.

Musso, D., M. Drancourt and D. Raoult (1995). "Lack of bactericidal effect of antibiotics except aminoglycosides on Bartonella (Rochalimaea) henselae." J Antimicrob Chemother **36**(1): 101-8.

Myers, W. F., P. J. Provost and C. L. Wisseman, Jr. (1967). "Permeability properties of Rickettsia mooseri." J Bacteriol **93**(3): 950-60.

Nasirudeen, A. M. and M. L. Thong (1999). "Prevalence of Bartonella henselae immunoglobulin G antibodies in Singaporean cats." Pediatr Infect Dis J **18**(3): 276-8.

Noah, D. L., J. S. Bresee, M. J. Gorensek, J. A. Rooney, J. L. Cresanta, R. L. Regnery, J. Wong, J. del Toro, J. G. Olson and J. E. Childs (1995). "Cluster of five children with acute encephalopathy associated with cat-scratch disease in south Florida." Pediatr Infect Dis J **14**(10): 866-9.

Norman, A. F., R. Regnery, P. Jameson, C. Greene and D. C. Krause (1995). "Differentiation of Bartonella-like isolates at the species level by PCR-restriction fragment length polymorphism in the citrate synthase gene." J Clin Microbiol **33**(7): 1797-803.

O'Halloran, H. S., K. Draud, M. Minix, A. K. Rivard and P. A. Pearson (1998). "Leber's neuroretinitis in a patient with serologic evidence of Bartonella elizabethae." Retina **18**(3): 276-8.
O'Reilly, K. L., R. W. Bauer, R. L. Freeland, L. D. Foil, K. J. Hughes, K. R. Rohde, A. F. Roy, R. W. Stout and P. C. Triche (1999). "Acute clinical disease in cats following infection with a pathogenic strain of Bartonella henselae (LSU16)." Infect Immun **67**(6): 3066-72.
Ogata, H., P. Renesto, S. Audic, C. Robert, G. Blanc, P. E. Fournier, H. Parinello, J. M. Claverie and D. Raoult (2005). "The genome sequence of Rickettsia felis identifies the first putative conjugative plasmid in an obligate intracellular parasite." PLoS Biol **3**(8): e248.
Oliveira, R. P., M. A. Galvao, C. L. Mafra, C. B. Chamone, S. B. Calic, S. U. Silva and D. H. Walker (2002). "Rickettsia felis in Ctenocephalides spp. fleas, Brazil." Emerg Infect Dis **8**(3): 317-9.
Olsen, G. J. and C. R. Woese (1993). "Ribosomal RNA: a key to phylogeny." Faseb J **7**(1): 113-23.
Padmalayam, I., K. Karem, B. Baumstark and R. Massung (2000). "The gene encoding the 17-kDa antigen of Bartonella henselae is located within a cluster of genes homologous to the virB virulence operon." DNA Cell Biol **19**(6): 377-82.
Pappalardo, B. L., M. T. Correa, C. C. York, C. Y. Peat and E. B. Breitschwerdt (1997). "Epidemiologic evaluation of the risk factors associated with exposure and seroreactivity to Bartonella vinsonii in dogs." Am J Vet Res **58**(5): 467-71.
Parola, P., B. Davoust and D. Raoult (2005). "Tick- and flea-borne rickettsial emerging zoonoses." Vet Res **36**(3): 469-92.
Parola, P., O. Y. Sanogo, K. Lerdthusnee, Z. Zeaiter, G. Chauvancy, J. P. Gonzalez, R. S. Miller, S. R. Telford, 3rd, C. Wongsrichanalai and D. Raoult (2003). "Identification of Rickettsia spp. and Bartonella spp. in ffrom the Thai-Myanmar border." Ann N Y Acad Sci **990**: 173-81.
Paya, C. V., A. D. Wold and T. F. Smith (1987). "Detection of cytomegalovirus infections in specimens other than urine by the shell vial assay and conventional tube cell cultures." J Clin Microbiol **25**(5): 755-7.
Perez-Arellano, J. L., F. Fenollar, A. Angel-Moreno, M. Bolanos, M. Hernandez, E. Santana, M. Hemmersbach-Miller, A. M. Martin and D. Raoult (2005). "Human Rickettsia felis infection, Canary Islands, Spain." Emerg Infect Dis **11**(12): 1961-4.
Peter, J. B. (1991). "The polymerase chain reaction: amplifying our options." Rev Infect Dis **13**(1): 166-71.
Pretorius, A. M., L. Beati and R. J. Birtles (2004). "Diversity of bartonellae associated with small mammals inhabiting Free State province, South Africa." Int J Syst Evol Microbiol **54**(Pt 6): 1959-67.
Psaroulaki, A. (1998). Διδακτορική Διατριβή: Ο ενδημικός τύφος σε περιοχές της Ελλάδος και στην Κύπρο. Σχολή Επιστημών Υγείας. Ηράκλειο, Παν/μιο Κρήτης.
Raoult, D. (1988). La fievre Q: infection a Coxiella burnetii. Paris.
Raoult, D. and G. A. Dasch (1995). "Immunoblot cross-reactions among Rickettsia, Proteus spp. and Legionella spp. in patients with Mediterranean spotted fever." FEMS Immunol Med Microbiol **11**(1): 13-8.
Raoult, D. and M. Drancourt (1991). "Antimicrobial therapy of rickettsial diseases." Antimicrob Agents Chemother **35**(12): 2457-62.
Raoult, D., P. E. Fournier, M. Drancourt, T. J. Marrie, J. Etienne, J. Cosserat, P. Cacoub, Y. Poinsignon, P. Leclercq and A. M. Sefton (1996). "Diagnosis of 22 new cases of Bartonella endocarditis." Ann Intern Med **125**(8): 646-52.
Raoult, D., P. E. Fournier, F. Vandenesch, J. L. Mainardi, S. J. Eykyn, J. Nash, E. James, C. Benoit-Lemercier and T. J. Marrie (2003). "Outcome and treatment of Bartonella endocarditis." Arch Intern Med **163**(2): 226-30.
Raoult, D., H. Gallais, P. De Micco and P. Casanova (1986). "Ciprofloxacin therapy for Mediterranean spotted fever." Antimicrob Agents Chemother **30**(4): 606-7.
Raoult, D., B. La Scola, M. Enea, P. E. Fournier, V. Roux, F. Fenollar, M. A. Galvao and X. de Lamballerie (2001). "A flea-associated Rickettsia pathogenic for humans." Emerg Infect Dis **7**(1): 73-81.
Raoult, D., S. Rousseau, B. Toga, C. Tamalet, H. Gallais, P. De Micco and P. Casanova (1984). "[Serological diagnosis of Mediterranean boutonneuse fever]." Pathol Biol (Paris) **32**(7): 791-4.
Raoult, D. and V. Roux (1997). "Rickettsioses as paradigms of new or emerging infectious diseases." Clin Microbiol Rev **10**(4): 694-719.
Raoult, D. and V. Roux (1999). "The body louse as a vector of reemerging human diseases." Clin Infect Dis **29**(4): 888-911.
Raoult, D. and D. H. Walker (1990). Rickettsia rickettsii and other spotted

fever group rickettsiae,. New York, N.Y., Churchill Livingstone.
Raynal, J. (1940). "Le typhus murin a Changhai." Bull Soc Path Exot
Regnery, R., M. Martin and J. Olson (1992a). "Naturally occurring "Rochalimaea henselae" infection in domestic cat." Lancet **340**(8818): 557-8.
Regnery, R. L., B. E. Anderson, J. E. Clarridge, 3rd, M. C. Rodriguez-Barradas, D. C. Jones and J. H. Carr (1992b). "Characterization of a novel Rochalimaea species, R. henselae sp. nov., isolated from blood of a febrile, human immunodeficiency virus-positive patient." J Clin Microbiol **30**(2): 265-74.
Regnery, R. L., J. A. Rooney, A. M. Johnson, S. L. Nesby, P. Manzewitsch, K. Beaver and J. G. Olson (1996). "Experimentally induced Bartonella henselae infections followed by challenge exposure and antimicrobial therapy in cats." Am J Vet Res **57**(12): 1714-9.
Regnery, R. L., C. L. Spruill and B. D. Plikaytis (1991). "Genotypic identification of rickettsiae and estimation of intraspecies sequence divergence for portions of two rickettsial genes." J Bacteriol **173**(5): 1576-89.
Regnery, R. L., T. Tzianabos, J. J. Esposito and J. E. McDade (1983). "Strain differentiation of epidemic typhus rickettsiae (Rickettsia prowazekii) by DNA restriction endonuclease analysis." Current Microbiology **8**(6): 355-358.
Richter, J., P. E. Fournier, J. Petridou, D. Haussinger and D. Raoult (2002). "Rickettsia felis infection acquired in Europe and documented by polymerase chain reaction." Emerg Infect Dis **8**(2): 207-8.
Rolain, J. M., O. Bourry, B. Davoust and D. Raoult (2005). "Bartonella quintana and Rickettsia felis in Gabon." Emerg Infect Dis **11**(11): 1742-4.
Rolain, J. M., C. Foucault, R. Guieu, B. La Scola, P. Brouqui and D. Raoult (2002). "Bartonella quintana in human erythrocytes." Lancet **360**(9328): 226-8.
Rolain, J. M., P. E. Fournier, D. Raoult and J. J. Bonerandi (2003a). "First isolation and detection by immunofluorescence assay of Bartonella koehlerae in erythrocytes from a French cat." J Clin Microbiol **41**(8): 4001-2.
Rolain, J. M., M. Franc, B. Davoust and D. Raoult (2003b). "Molecular detection of Bartonella quintana, B. koehlerae, B. henselae, B. clarridgeiae, Rickettsia felis, and Wolbachia pipientis in cat fleas, France." Emerg Infect Dis **9**(3): 338-42.
Rolain, J. M., M. Maurin, M. N. Mallet, D. Parzy and D. Raoult (2003c). "Culture and antibiotic susceptibility of Bartonella quintana in human erythrocytes." Antimicrob Agents Chemother **47**(2): 614-9.
Rolain, J. M., M. Maurin and D. Raoult (2000). "Bactericidal effect of antibiotics on Bartonella and Brucella spp.: clinical implications." J Antimicrob Chemother **46**(5): 811-4.
Roux, V., S. J. Eykyn, S. Wyllie and D. Raoult (2000). "Bartonella vinsonii subsp. berkhoffii as an agent of afebrile blood culture-negative endocarditis in a human." J Clin Microbiol **38**(4): 1698-700.
Roux, V. and D. Raoult (1995a). "The 16S-23S rRNA intergenic spacer region of Bartonella (Rochalimaea) species is longer than usually described in other bacteria." Gene **156**(1): 107-11.
Roux, V. and D. Raoult (1995b). "Phylogenetic analysis of the genus Rickettsia by 16S rDNA sequencing." Res Microbiol **146**(5): 385-96.
Roux, V. and D. Raoult (2000). "Phylogenetic analysis of members of the genus Rickettsia using the gene encoding the outer-membrane protein rOmpB (ompB)." Int J Syst Evol Microbiol **50 Pt 4**: 1449-55.
Ruiz-Beltran, R. and J. I. Herrero-Herrero (1991). New quinolones in the treaqtment of mediterranean spotted fever (MSF) : A comparative study with other antibiotic regimens. . Rickettsiae and Rickettsial diseases. J. Kazar and D. Raoult. Bratislava, Slovak Academy of Sciences**:** 701.
Rumreich, A., R. Dyer and L. E. Badger (1931). "The typhus-Rocky Mountain spotted fever group: an epidemiological and clinical study in the eastern and southeastern states." Publ.Health Rep. **46**: 470-480.
Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis and H. A. Erlich (1988). "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase." Science **239**(4839): 487-91.
Saint, E. G., A. F. Drummond and I. O. Thorburn (1954). "Murine typhus in Western Australia." Med J Aust **2**(19): 731-7.
Sander, A. and B. Frank (1997). "Paronychia caused by Bartonella henselae." Lancet **350**(9084): 1078.
Schloderer, D., H. Owen, P. Clark, J. Stenos and S. G. Fenwick (2006). "Rickettsia felis in fleas, Western Australia." Emerg Infect Dis **12**(5): 841-3.

Schmiederer, M. and B. Anderson (2000). "Cloning, sequencing, and expression of three Bartonella henselae genes homologous to the Agrobacterium tumefaciens VirB region." DNA Cell Biol **19**(3): 141-7.

Schouls, L. M., I. Van De Pol, S. G. Rijpkema and C. S. Schot (1999). "Detection and identification of Ehrlichia, Borrelia burgdorferi sensu lato, and Bartonella species in Dutch Ixodes ricinus ticks." J Clin Microbiol **37**(7): 2215-22.

Schriefer, M. E., J. B. Sacci, Jr., J. S. Dumler, M. G. Bullen and A. F. Azad (1994). "Identification of a novel rickettsial infection in a patient diagnosed with murine typhus." J Clin Microbiol **32**(4): 949-54.

Schulein, R., A. Seubert, C. Gille, C. Lanz, Y. Hansmann, Y. Piemont and C. Dehio (2001). "Invasion and persistent intracellular colonization of erythrocytes. A unique parasitic strategy of the emerging pathogen Bartonella." J Exp Med **193**(9): 1077-86.

Serratrice, J., J. M. Rolain, B. Granel, N. Ene, J. Conrath, J. F. Avierinos, P. Disdier, D. Raoult and P. J. Weiller (2003). "[Bilateral retinal artery branch occlusions revealing Bartonella grahamii infection]." Rev Med Interne **24**(9): 629-30.

Shaked, Y., Y. Samra, M. K. Maeir and E. Rubinstein (1988). "Murine typhus and spotted fever in Israel in the eighties: retrospective analysis." Infection **16**(5): 283-7.

Shaw, S. E., M. J. Kenny, S. Tasker and R. J. Birtles (2004). "Pathogen carriage by the cat flea Ctenocephalides felis (Bouche) in the United Kingdom." Vet Microbiol **102**(3-4): 183-8.

Silverman, D. J. (1991). Ultrastructure of Rickettsiae and Rickettsia-infected cells. Rickettsiae and Rickettsial Diseases. J. Kazar and D. Raoult. Bratislava, Slovac Academy of Sciences. **17**.

Smit, F. G. A. M. (1957). Siphonaptera. London, Royal Entomological Society of London.

Smith, H. M., R. Reporter, M. P. Rood, A. J. Linscott, L. M. Mascola, W. Hogrefe and R. H. Purcell (2002). "Prevalence study of antibody to ratborne pathogens and other agents among patients using a free clinic in downtown Los Angeles." J Infect Dis **186**(11): 1673-6.

Smoller, B. R., K. T. Madhusudhan, M. A. Scott and T. D. Horn (2001). "Granuloma annulare: another manifestation of Bartonella infection?" Am J Dermatopathol **23**(6): 510-3.

Snyder, J. C. and C. M. Wheeler (1945). "The experimental infection of the human body louse, Pediculus humanus corporis, with murine and epidemic louse-borne typhus strains. ." J.Exp.Med.(82): 1-20.

Solano-Gallego, L., J. Bradley, B. Hegarty, B. Sigmon and E. Breitschwerdt (2004). "Bartonella henselae IgG antibodies are prevalent in dogs from southeastern USA." Vet Res **35**(5): 585-95.

Soliterman, R. L. (1954). "Experimental murine rickettsiosis in the cat. ." Vopr. Infekts.Patol.Immunol.,(2): 277-82.

Sorvillo, F. J., B. Gondo, R. Emmons, P. Ryan, S. H. Waterman, A. Tilzer, E. M. Andersen, R. A. Murray and R. Barr (1993). "A suburban focus of endemic typhus in Los Angeles County: association with seropositive domestic cats and opossums." Am J Trop Med Hyg **48**(2): 269-73.

Spach, D. H., K. P. Callis, D. S. Paauw, Y. B. Houze, F. D. Schoenknecht, D. F. Welch, H. Rosen and D. J. Brenner (1993). "Endocarditis caused by Rochalimaea quintana in a patient infected with human immunodeficiency virus." J Clin Microbiol **31**(3): 692-4.

Spach, D. H. and J. E. Koehler (1998). "Bartonella-associated infections." Infect Dis Clin North Am **12**(1): 137-55.

Stevenson, H. L., Y. Bai, M. Y. Kosoy, J. A. Montenieri, J. L. Lowell, M. C. Chu and K. L. Gage (2003). "Detection of novel Bartonella strains and Yersinia pestis in prairie dogs and their fleas (Siphonaptera: Ceratophyllidae and Pulicidae) using multiplex polymerase chain reaction." J Med Entomol **40**(3): 329-37.

Teysseire, N., C. Chiche-Portiche and D. Raoult (1992). "Intracellular movements of Rickettsia conorii and R. typhi based on actin polymerization." Res Microbiol **143**(9): 821-9.

Traub, R., C. L. Wisseman and A. F. Azad (1978). "The ecology of murine typhus-a critical review." Trop Dis Bull **75**(4): 237-317.

Tsujino, K., M. Tsukahara, H. Tsuneoka, K. Ichihara, T. Furuya, S. Kawauchi, A. Oga and K. Sasaki (2004). "Clinical implication of prolonged fever in children with cat scratch disease." J Infect Chemother **10**(4): 227-33.

Tsukahara, M., H. Tsuneoka, H. Iino, I. Murano, H. Takahashi and M. Uchida (2000). "Bartonella henselae infection as a cause of fever of unknown origin." J Clin Microbiol **38**(5): 1990-1.

Tyzzer, E. E. (1941). "The Isolation in Culture of Grahamellae from Various Species of Small Rodents." Proc Natl Acad Sci U S A **27**(3): 158-62.

Tzianabos, T., B. E. Anderson and J. E. McDade (1989). "Detection of Rickettsia rickettsii DNA in clinical specimens by using polymerase chain reaction technology." J Clin Microbiol **27**(12): 2866-8.

Ueno, H., T. Hohdatsu, Y. Muramatsu, H. Koyama and C. Morita (1996). "Does coinfection of Bartonella henselae and FIV induce clinical disorders in cats?" Microbiol Immunol **40**(9): 617-20.

Ueno, H., Y. Muramatsu, B. B. Chomel, T. Hohdatsu, H. Koyama and C. Morita (1995). "Seroepidemiological survey of Bartonella (Rochalimaea) henselae in domestic cats in Japan." Microbiol Immunol **39**(5): 339-41.

Walker, D. H. (1996). Advances in understanding of typhus group rickettsial infections. Rickettsiae and Rickettsial Diseases. J. Kazar and R. Toman. Bratislava, Slovac Republic, VEDA Press**:** 16-25.

Webb, L., M. Carl, D. C. Malloy, G. A. Dasch and A. F. Azad (1990). "Detection of murine typhus infection in fleas by using the polymerase chain reaction." J Clin Microbiol **28**(3): 530-4.

Wedincamp, J., Jr. and L. D. Foil (2000). "Infection and seroconversion of cats exposed to cat fleas (Ctenocephalides felis Bouche) infected with Rickettsia felis." J Vector Ecol **25**(1): 123-6.

Wedincamp, J., Jr. and L. D. Foil (2002). "Vertical transmission of Rickettsia felis in the cat flea (Ctenocephalides felis Bouche)." J Vector Ecol **27**(1): 96-101.

Weil, E. and A. Felix (1916). Zur serologischen Diagnose des Fleckfiebers (On serological analysis of spotted fever). Wien. Klin, Wochenschrift 29**:** 33-35.

Weisburg, W. G., M. E. Dobson, J. E. Samuel, G. A. Dasch, L. P. Mallavia, O. Baca, L. Mandelco, J. E. Sechrest, E. Weiss and C. R. Woese (1989). "Phylogenetic diversity of the Rickettsiae." J Bacteriol **171**(8): 4202-6.

Weiss, E. (1982). "The biology of rickettsiae." Annu Rev Microbiol **36**: 345-70.

Weiss, E. and H. R. Dressler (1960). "Selection of an erythromycin-resistant strain of Rickettsia prowazekii." Am J Hyg **71**: 292-8.

Welch, D. F., K. C. Carroll, E. K. Hofmeister, D. H. Persing, D. A. Robison, A. G. Steigerwalt and D. J. Brenner (1999). "Isolation of a new subspecies, Bartonella vinsonii subsp. arupensis, from a cattle rancher: identity with isolates found in conjunction with Borrelia burgdorferi and Babesia microti among naturally infected mice." J Clin Microbiol **37**(8): 2598-601.

White, P. C., Jr. (1970). "A brief historical review of murine typhus in Virginia and the United States." Va Med Mon (1918) **97**(1): 16-23.

WHO, Working, Group, on, Rickettsial and Diseases (1982). "Rickettsioses: a continuing disease problem. ." Bull World Health Organ **60**(2): 157-64.

Wike, D. A. and W. Burgdorfer (1972). "Plaque formation in tissue cultures by Rickettsia rickettsi isolated directly from whole blood and tick hemolymph." Infect Immun **6**(5): 736-8.

Williams, S. G., J. B. Sacci, Jr., M. E. Schriefer, E. M. Andersen, K. K. Fujioka, F. J. Sorvillo, A. R. Barr and A. F. Azad (1992). "Typhus and typhuslike rickettsiae associated with opossums and their fleas in Los Angeles County, California." J Clin Microbiol **30**(7): 1758-62.

Winkler, H. H. (1976). "Rickettsial permeability. An ADP-ATP transport system." J Biol Chem **251**(2): 389-96.

Winkler, H. H. and R. M. Daugherty (1984). "Regulatory role of phosphate and other anions in transport of ADP and ATP by Rickettsia prowazekii." J Bacteriol **160**(1): 76-9.

Wood, D. O., L. R. Williamson, H. H. Winkler and D. C. Krause (1987). "Nucleotide sequence of the Rickettsia prowazekii citrate synthase gene." J Bacteriol **169**(8): 3564-72.

Woodward, T. E. (1949). "Chloromycetin and Aureomycin. Therapeutic results." Ann. Intern. Med. **31**: 53.

Yamamoto, K., B. B. Chomel, R. W. Kasten, C. C. Chang, T. Tseggai, P. R. Decker, M. Mackowiak, K. A. Floyd-Hawkins and N. C. Pedersen (1998). "Homologous protection but lack of heterologous-protection by various species and types of Bartonella in specific pathogen-free cats." Vet Immunol Immunopathol **65**(2-4): 191-204.

Yamamoto, K., B. B. Chomel, R. W. Kasten, C. M. Hew, D. K. Weber, W. I. Lee, S. Droz and J. E. Koehler (2002). "Experimental infection of domestic cats with Bartonella koehlerae and comparison of protein and DNA profiles with those of other Bartonella species infecting felines." J Clin Microbiol **40**(2): 466-74.

Yamamoto, K., B. B. Chomel, R. W. Kasten, C. M. Hew, D. K. Weber, W. I. Lee, J. E. Koehler and N. C. Pedersen (2003). "Infection and re-infection of domestic cats with various Bartonella species or types: B. henselae type I is protective against heterologous challenge with B. henselae type II." Vet Microbiol **92**(1-2): 73-86.

Ying, B., M. Y. Kosoy, G. O. Maupin, K. R. Tsuchiya and K. L. Gage (2002). "Genetic and ecologic characteristics of Bartonella communities in rodents in southern China." Am J Trop Med Hyg **66**(5): 622-7.

Zangwill, K. M., D. H. Hamilton, B. A. Perkins, R. L. Regnery, B. D. Plikaytis, J. L. Hadler, M. L. Cartter and J. D. Wenger (1993). "Cat scratch disease in Connecticut. Epidemiology, risk factors, and evaluation of a new diagnostic test." N Engl J Med **329**(1): 8-13.

Zavala-Velazquez, J. E., J. A. Ruiz-Sosa, R. A. Sanchez-Elias, G. Becerra-Carmona and D. H. Walker (2000). "Rickettsia felis rickettsiosis in Yucatan." Lancet **356**(9235): 1079-80.

Καφετζής, Α. Δ. (1994). Αντιμικροβιακά φάρμακα, πρόληψη και θεραπεία λοιμώξεων., Εκδόσεις Ζήτα**:** 306-310.

8. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Bartonella isolates στα τρωκτικά *(Rattus rattus* και *Rattus norvegicus)* από τις Ηνωμένες Πολιτείες, την Πορτογαλία [Ellis *et al.,* 1999] και τη βόρεια Ταϊλάνδη [Castle *et al.,* 2004].

Τοποθεσία	***R. norvegicus***	***R. rattus***	**Σύνολο**
ΗΠΑ			
Los Angeles	19/42 (45.2) [α]		19/42 (45.2)
Palo Alto		0/11 (0.0)	0/11 (0.0)
Riverside		3/5 (60.0) [β]	3/5 (60.0)
Orange County		0/22 (0.0)	0/22 (0.0)
Miami, Florida	0/2 (0.0)	2/19 (10.5)	2/21 (9.5)
Atlanta, Georgia	0/13 (0.0) [γ]	1/7 (14.3)	1/20 (5.0)
Spencer County, Indiana	0/16 (0.0) [γ]		0/16 (0.0)
New Orleans, Louisiana	35/62 (56.4) [α]	2/12 (16.7)	37/74 (50.0)
Baltimore, Maryland	7/66 (10.6) [γ]		7/66 (10.6)
Reno, Nevada	0/35 (0.0) [β]		0/35 (0.0)
New York, New York	0/87 (0.0) [α]		0/87 (0.0)
Kleberg, Texas		1/11 (9.1)	1/11 (9.1)

Βόρεια Ταϊλάνδη [13]		3/24	

Table II. Surveys of *Bartonella* spp. infections (bacteremia or antibodies) in domestic cats in northern and central Europe.

Country	Survey	Cat population	Bartonella	Prevalence positive/total (%)
Austria	S	Pets	B.h.	32/96 (**33.3**)
Czech Republic	B	Pets/Shelter/ Stray	B.h.	5/61 (**8**)
				M: 5/5 (**100**)
				Pets: 0/34 (**0**)
				Shelter: 1/21 (**5**)
				Stray: 4/6 (**66.6**)
Denmark	B	Pets/Shelter	B.h.	21/93 (**22.6**)
				H: 1/21 (**5**)
				M: 20/21 (**95**)
				Pets: 8/44 (**18.2**)
				Shelter: 13/49 (**26.5**)
	S	Pets/Shelter	B.h.	42/92 (**45.6**)
Denmark (North Zealand)	B	Strays	B.h.	11/25 (**44**)
				M: 11/11 (**100**)
Norway	B	Pets	B.spp.	0/100 (**0**)
	S	Pets	B.h. (EIA)	1/100 (**1**)
			B.h. (IFA)	0/100 (**0**)
Poland	S	Shelters	B.h.	31/36 (**86**)
Sweden	S	Pets	B.h.	3/292 (**1**)
Sweden (Stockholm and southern Sweden)	B	Pets	B.h.	2/91 (**2.2**)
				M: 2/2 (**100**)
Switzerland	S	Pets	B.h.	60/728 (**8.3**)
United Kingdom (Bristol and Southwest UK)	B	Pets	B.h.	34/360 (**9.4**)
				H: 2/34 (**6**)
				M: 30/34 (**88**)
				H + M: 2/34 (**6**)
United Kingdom	S	Pets	B.h.	28/69 (**40.6**)
	S	Feral	B.h.	33/79 (**41.8**)
United Kingdom	B	Pets	B.h.	40/351 (**11.4**)

S: seroprevalence, B: bacteremia prevalence, B.h.: *Bartonella henselae*, B.c.: *Bartonella clarridgeiae*, B.spp.: *Bartonella* species, EIA: ELISA, IFA: immunofluorescence, H: type I (Houston I), M: type II (Marseille).

Table III. Surveys of *Bartonella* spp. infections (bacteremia or antibodies) in domestic cats in Italy and Portugal.

Country	Survey	Cat population	Bartonella	Prevalence positive/total (%)
Italy (Lombardia)	B	Stray	B.spp.	140/769 (**18**)
(3 urban, 3 rural areas)			B.h.	H: 27/131 (**20.6**)
				M: 80/131 (**61.1**)
				H + M: 24/131 (**18**)
	S	Stray	B.h.	207/540 (**38**)
Italy (northern)	B	Stray	B.h.	361/1585 (**23**)
				Not given (**26**)
				Not given (**52**)
			B.c.	Not given (**5**)
	S	Stray	B.h.	553/1416 (**39**)
Italy (Tuscany)	B	Pets/catteries	B.spp.	0/28 (**0**)
	S	Pets/catteries	B.h.	98/427 (**23**)
Italy (Reggio Emilia)	B	Pets	B.h.	24/248 (**9.7**)
Portugal	S	Pets	B.h.	1/14 (**6.7**)

S: seroprevalence, B: bacteremia prevalence, B.h.: *Bartonella henselae*, B.c.: *Bartonella clarridgeiae*, B.spp.: *Bartonella* species, H: type I (Houston I), M: type II (Marseille).

Table IV. Surveys on *Bartonella* spp. infections (bacteremia or antibodies) in domestic cats in Asia and Oceania.

Country	Survey	Cat Population	Bartonella	Prevalence positive/total (%)
Australia	B	Pets/Feral	B.h.	27/77 (**35**)
(Sydney)				Pets: 3/18 (**16**)
				Feral: 24/59 (**40**)
Australia	B	Pets	B.h.	45/342 (**13.2**)
(Melbourne)				
New Zealand	B	Pets	B.h.	8/48 (17)
(Auckland)				
Japan	S	Pets	B.h.	30/199 (**15.1**)
Japan	S	Pets	B.h.	43/471 (**9.1**)
(Kanagawa, Saitama Prefectures)				
Japan	S	Pets	B.h.	128/1447 (**8.8**)
Japan	B	Pets/Pound	B.h.	3/33 (**9.1**)
Japan	B	Pets	B.spp.	50/690 (**7.2**)
			B.h.	H: 43/45 (**95.5**)
				M: 1/45 (**2.2**)
			B.c.	4/50 (**8**)
			B.c. + B.h.	1/50 (**2**)
Indonesia	B	Stray	B.h.	6/14 (**43**)
(Jakarta)			B.c.	3/14 (**21**)
	S	Stray	B.h.	40/74 (**54**)
Philippines	B	Stray	B.spp.	19/31 (**61**)
(Manilla)			B.h.	H: 13/19 (**68.4**)
			B.c.	2/19 (**10.5**)
			B.h. + B.c.	4/19 (**21**)
	S	Stray	B.h.	73/107 (**68**)
			B.c.	70/107 (**65**)
Singapore	S	Stray	B.h.	38/80 (**47.5**)
Thailand	B	Pets/Stray	B.spp.	76/275 (**27.6**)
			B.h.	63/76 (**83**)
			B.c.	9/76 (**11.8**)
			B.h. + B.c.	4/76 (**5.3**)
			B.h.	H: 48/67 (**71.6**)
				M: 13/67 (**19.4**)

S: seroprevalence, B: Bacteremia prevalence, B.h.: *Bartonella henselae*, B.c.: *Bartonella clarridgeiae*, B.spp.: *Bartonella* species, H: type I (Houston I), M: type II (Marseille).

Table V. Surveys on *Bartonella* spp. infections (bacteremia or antibodies) in domestic cats in the Americas.

Country	Survey	Cat population	Bartonella	Prevalence positive/total (%)
Brazil	S	Pets?	B.h.	Not given (**46**)
Chile (Valdivia)	S	Pets	B.h.	54/76 (**71**)
			B.c.	Not given (**18.6**)
Canada	S	Pets	B.h.	43/242 (**17.8**)
USA/Canada	S	Pets	B.h.	175/628 (**27.9**)
USA	S	Pets/Shelter	B.h.	370/1314 (**28.2**)
USA (Baltimore)	S	Stray/Vet. Hosp.	B.h.	77/592 (**13**)
USA (North Carolina)	S	Pets	B.h.	46/114 (**40.4**)
USA (Florida)	S	Feral/Stray	B.h.	186/553 (**33.6**)
USA	S	Feral	B.h.	93/100 (**93**)
(North Carolina)	S	Pets	B.h	57/76 (**75**)
USA (California)	B	Pets/Stray	B.h.	81/205 (**39.5**)
				Pets: 24/112 (**21.4**)
				Stray: 57/93 (**61.3**)
	S	Pets/Stray	B.h.	165/205 (**81**)
USA	B	Pets	B.h.	65/271 (**24**)
				H: 14/49 (**28.6**)
				M: 32/49 (**65.3**)
				H + M: 3/49 (**6.1**)
			B.c.	(**0**)
	S	Pets	B.h.	138/271 (**51**)

S: seroprevalence, B: Bacteremia prevalence, B.h.: *Bartonella henselae*, B.c.: *Bartonella clarridgeiae*, B.spp.: *Bartonella* species, H: type I (Houston I), M: type II (Marseille).

Table VI. Serosurveys on *Bartonella* spp. infection in domestic cats in Africa and the Middle East.

Country	Survey	Cat population	Bartonella	Prevalence positive/total (%)
Egypt	S	Pets	B.h.	5/42 (**12**)
Israel	S	Pets	B.h.	45/114 (**39.5**)
Israel	B	Stray	B.h.	40/48 (**83**)
			B.c.	7/48 (**15**)
			B.k.	1/48 (**2**)
Jordan	S	Pets	B.h.	55/153 (**36**)
				true prevalence (**32**)
South Africa	S	Shelter	B.h.	11/52 (**21**)
	B	Pets	B.h.	1/31 (**3.2**) (H: 1/1)
Zimbabwe	S	Pets/Shelter	B.h.	28/119 (**24**)
	B	Pets	B.h.	2/25 (**8**)

S: seroprevalence, B: Bacteremia prevalence, B.h.: *Bartonella henselae*, B.c.: *Bartonella clarridgeiae*, B.k.: *Bartonella koehlerae*, B.spp.: *Bartonella* species, H: type I (Houston I), M: type II (Marseille).