



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ

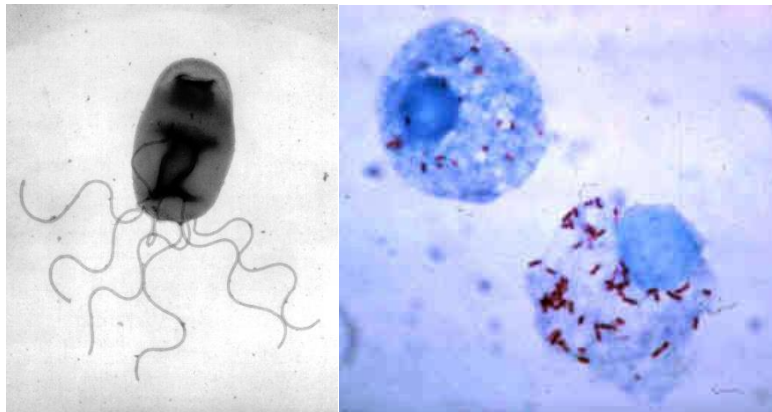
Εθνικόν και Καποδιστριακόν  
Πανεπιστήμιον Αθηνών

— ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837 —

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ  
ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ  
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΑΘΑΝΑΣΙΟΣ ΤΣΑΚΡΗΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΩΝ ΠΑΘΟΓΟΝΩΝ *BARTONELLA* ΚΑΙ *RICKETTSIA*  
ΣΕ ΔΙΑΒΙΒΑΣΤΕΣ ΚΑΙ ΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ ΣΤΗΝ ΑΤΤΙΚΗ



ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΔΟΥΓΑΣ  
ΚΤΗΝΙΑΤΡΟΣ

ΑΘΗΝΑ, 2021

## **ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ**

Ημερομηνία Ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 3-6-2015

### **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

Ιωσήφ Παπαπαρασκευάς, Αναπ. Καθηγητής, Τμήμα Ιατρικής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών (Επιβλέπων)

Αθανάσιος Τσακρής, Καθηγητής, Τμήμα Ιατρικής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Χαράλαμπος Μπιλλίνης, Καθηγητής Ιολογίας – Ιογενών Νοσημάτων, Τμήμα Κτηνιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Ημερομηνία κατάθεσης θέματος και πρωτοκόλλου: 22-7-2015

Ημερομηνία κατάθεσης Διδακτορικής Διατριβής: 7-12-2020

Ημερομηνία ορισμού Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής 18-12-2020

### **ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

Αθανάσιος Τσακρής, Καθηγητής Μικροβιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, ΕΚΠΑ

Χαράλαμπος Μπιλλίνης, Καθηγητής Ιολογίας- Ιογενών Νοσημάτων, Τμήμα Κτηνιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Ιωσήφ Παπαπαρασκευάς, Αναπ. Καθηγητής Μικροβιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, ΕΚΠΑ

Γεωργία Βρυώνη, Αναπ. Καθηγήτρια Μικροβιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, ΕΚΠΑ

Βασιλική Σπύρου, Καθηγήτρια Παθολογίας με Έμφαση στα Λοιμώδη Νοσήματα, Γενικό Τμήμα, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Γεώργιος Παναγιωτακόπουλος, Επικ. Καθηγητής Γενικής Φαρμακολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Πατρών

Πολυχρόνης Κωστούλας, Επικ. Καθηγητής Κτηνιατρικής Επιδημιολογίας, Τμήμα Κτηνιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

## ΟΡΚΟΣ ΤΟΥ ΙΠΠΟΚΡΑΤΗ

Ὅμνυμι Ἀπόλλωνα ἰητρὸν, καὶ Ἀσκληπιὸν, καὶ Ὑγίαν, καὶ Πανάκειαν, καὶ θεοὺς πάντας τε καὶ πάσας, ἴστορας ποιούμενος, ἐπιτελέα ποιήσῃν κατὰ δύναμιν καὶ κρίσιν ἐμὴν ὄρκον τόνδε καὶ ξυγγραφὴν τήνδε.

Ἦγήσασθαι μὲν τὸν διδάξαντά με τὴν τέχνην ταύτην ἴσα γενέτησιν ἐμοῖσι, καὶ βίου κοινώσασθαι, καὶ χρεῶν χηρίζοντι μετάδοσιν ποιήσασθαι, καὶ γένος τὸ ἐξ ωυτέου ἀδελφοῖς ἴσον ἐπικρινέειν ἄρρεσι, καὶ διδάξῃν τὴν τέχνην ταύτην, ἣν χηρίζωσι μαθάνειν, ἄνευ μισθοῦ καὶ ξυγγραφῆς, παραγγελίης τε καὶ ἀκροήσιος καὶ τῆς λοιπῆς ἀπάσης μαθήσιος μετάδοσιν ποιήσασθαι υἱοῖσι τε ἐμοῖσι, καὶ τοῖσι τοῦ ἐμῆ διδάξαντος, καὶ μαθηταῖσι συγγεγραμμένοις τε καὶ ὠρκισμένοις νόμῳ ἰητρικῷ, ἄλλῳ δὲ οὐδενί.

Διαιτήμασί τε χρῆσομαι ἐπ' ὠφελείῃ καμνόντων κατὰ δύναμιν καὶ κρίσιν ἐμὴν, ἐπὶ δηλήσει δὲ καὶ ἀδικίῃ εἴρξῃν.

Οὐ δώσω δὲ οὐδὲ φάρμακον οὐδενὶ αἰτηθεὶς θανάσιμον, οὐδὲ ὑφηγήσομαι ξυμβουλίην τοιήνδε. Ὅμοίως δὲ οὐδὲ γυναικὶ πεσσὸν φθόριον δώσω. Ἀγνῶς δὲ καὶ ὁσίως διατηρήσω βίον τὸν ἐμὸν καὶ τέχνην τὴν ἐμὴν.

Οὐ τεμέω δὲ οὐδὲ μὴν λιθιῶντας, ἐκχωρήσω δὲ ἐργάτησιν ἀνδράσι πρήξιος τῆσδε.

Ἐς οἰκίας δὲ ὀκόσας ἂν ἐσίω, ἐσελεύσομαι ἐπ' ὠφελείῃ καμνόντων, ἐκτὸς ἐὼν πάσης ἀδικίης ἐκουσίης καὶ φθορίας, τῆς τε ἄλλης καὶ ἀφροδισίων ἔργων ἐπὶ τε γυναικείων σωμαίων καὶ ἀνδρῶν, ἐλευθέρων τε καὶ δούλων.

Ἄ δ' ἂν ἐν θεραπείῃ ἢ ἴδω, ἢ ἀκούσω, ἢ καὶ ἄνευ θεραπείης κατὰ βίον ἀνθρώπων, ἃ μὴ χρή ποτε ἐκλαλέεσθαι ἔξω, σιγήσομαι, ἄρρήτα ἠγεύμενος εἶναι τὰ τοιαῦτα.

Ὅρκον μὲν οὖν μοι τόνδε ἐπιτελέα ποιέοντι, καὶ μὴ ξυγγέοντι, εἴη ἐπαύρασθαι καὶ βίου καὶ τέχνης δοξαζομένῳ παρὰ πᾶσιν ἀνθρώποις ἐς τὸν αἰεὶ χρόνον. παραβαίνοντι δὲ καὶ ἐπιορκοῦντι, τάναντία τουτέων.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Βιογραφικό σημείωμα Γεωργίου Δουγά.....	- 7 -
Πρόλογος.....	- 12 -
Περίληψη .....	- 16 -
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ .....	- 18 -
Ιστορική αναδρομή .....	- 18 -
Ψύλλοι κατοικιδίων ζώων συντροφιάς .....	- 20 -
<i>Bartonella spp.</i> 1.1 Βακτηριολογία.....	- 21 -
<i>Bartonella spp.</i> 1.2 Μηχανισμοί παθογένεσης .....	- 25 -
<i>Bartonella spp.</i> 1.3 Παράγοντες λοιμικότητας .....	- 29 -
<i>Bartonella spp.</i> 1.4 Γονιδίωμα.....	- 37 -
<i>Bartonella spp.</i> 1.5 Μοριακές μέθοδοι διάγνωσης .....	- 39 -
<i>Bartonella spp.</i> 1.6 Ευαισθησία στα αντιβιοτικά.....	- 45 -
<i>Bartonella spp.</i> 1.7 Κλινικές εκδηλώσεις .....	- 48 -
<i>Bartonella spp.</i> 1.8 Επιδημιολογία .....	- 49 -
<i>Rickettsia felis</i> 2.1 Βακτηριολογία .....	- 51 -
<i>Rickettsia felis</i> 2.2 Μηχανισμοί παθογένεσης .....	- 52 -
<i>Rickettsia felis</i> 2.3 Παράγοντες λοιμικότητας .....	- 55 -
<i>Rickettsia felis</i> 2.4 Γονιδίωμα.....	- 56 -
<i>Rickettsia felis</i> 2.5 Μοριακές μέθοδοι διάγνωσης .....	- 59 -
<i>Rickettsia felis</i> 2.6 Ευαισθησία στα αντιβιοτικά.....	- 61 -
<i>Rickettsia felis</i> 2.7 Κλινικές εκδηλώσεις .....	- 61 -
<i>Rickettsia felis</i> 2.8 Επιδημιολογία .....	- 62 -
<i>Rickettsia typhi</i> 3.1 Βακτηριολογία.....	- 66 -
<i>Rickettsia typhi</i> 3.2 Μηχανισμοί παθογένεσης .....	- 66 -
<i>Rickettsia typhi</i> 3.3 Παράγοντες λοιμικότητας .....	- 69 -

<i>Rickettsia typhi</i>	3.4 Γονιδίωμα.....	- 70 -
<i>Rickettsia typhi</i>	3.5 Μοριακές μέθοδοι διάγνωσης.....	- 72 -
<i>Rickettsia typhi</i>	3.6 Ευαισθησία στα αντιβιοτικά.....	- 72 -
<i>Rickettsia typhi</i>	3.7 Κλινικές εκδηλώσεις.....	- 73 -
<i>Rickettsia typhi</i>	3.8 Επιδημιολογία.....	- 73 -
<b>ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b> .....		- 75 -
Ειδικό μέρος	2.1 Εισαγωγή.....	- 75 -
Ειδικό μέρος	2.2 Υλικό – μέθοδος.....	- 75 -
	2.2.1 Συλλογή πρωτογενούς υλικού.....	- 75 -
	2.2.1.1 Ψύλλοι ζώων συντροφιάς.....	- 75 -
	2.2.1.2 Οροί αίματος ανθρώπων.....	- 76 -
	2.2.2 Εργαστηριακές τεχνικές.....	- 77 -
	2.2.2.1 Εκχύλιση του DNA των ψύλλων.....	- 77 -
	2.2.2.2 Συμβατικές και Real-Time PCR.....	- 78 -
	2.2.2.3 16S metagenomics.....	- 83 -
	2.2.2.4 Επιβεβαίωση γένους <i>Rickettsia</i> , <i>R. felis</i> και <i>R. typhi</i> .....	- 83 -
	2.2.2.5 Χαρακτηρισμός γένους και ειδών <i>Bartonella</i> .....	- 84 -
	2.2.2.6 Σύγκριση μοριακών τεχνικών για την επιβεβαίωση <i>Rickettsia</i> spp. και <i>R. felis</i> .....	- 84 -
	2.2.2.7 Μελέτη μικροβιώματος ψύλλων για δυνητικά παθογόνα βακτήρια.....	- 84 -
	2.2.2.8 Φορεία IgG αντισωμάτων.....	- 85 -
	2.2.2.9 Στατιστικές αναλύσεις.....	- 86 -
Ειδικό μέρος	2.3 Αποτελέσματα.....	- 86 -
	2.3.1 Ανίχνευση <i>Bartonella</i> spp., <i>R. felis</i> και <i>R. typhi</i> σε ψύλλους ζώων συντροφιάς.....	- 86 -
	2.3.1.1 Ζώα-ξενιστές και συλλεχθέντες ψύλλοι.....	- 86 -
	2.3.1.2 Ανίχνευση βακτηριακού DNA.....	- 88 -
	2.3.1.3 <i>R. felis</i> και <i>R. typhi</i> σε ψύλλους ζώων συντροφιάς.....	- 88 -

2.3.1.4 <i>Bartonella</i> spp. σε ψύλλους ζώων συντροφιάς .....	- 92 -
2.3.2 Σύγκριση των μοριακών μεθόδων για ταυτοποίηση <i>R. felis</i> και <i>R. typhi</i> .....	- 95 -
2.3.3 Βακτήρια με υγειονομική σημασία στο μικροβίωμα ψύλλων .....	- 97 -
2.3.4 IgG αντισώματα κατά <i>B. henselae</i> , <i>B. quintana</i> και <i>R. typhi</i> σε ανθρώπινους ορούς αίματος .....	- 101 -
<i>Ειδικό μέρος</i> 2.4 Συζήτηση & Συμπεράσματα.....	- 105 -
2.4.1 Ανίχνευση <i>Bartonella</i> spp., <i>R. felis</i> και <i>R. typhi</i> σε ψύλλους ζώων συντροφιάς .....	- 105 -
<i>Bartonella</i> spp. ....	- 105 -
<i>Rickettsia felis</i> .....	- 106 -
<i>Rickettsia typhi</i> .....	- 107 -
2.4.2 Σύγκριση των μοριακών μεθόδων για ταυτοποίηση <i>R. felis</i> και <i>R. typhi</i> .....	- 108 -
2.4.3 Βακτήρια με υγειονομική σημασία στο μικροβίωμα ψύλλων .....	- 109 -
2.4.4 IgG αντισώματα κατά <i>B. henselae</i> , <i>B. quintana</i> και <i>R. typhi</i> σε ανθρώπινους ορούς αίματος .....	- 110 -
<i>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ</i> .....	- 113 -

## Βιογραφικό σημείωμα Γεωργίου Δουγά

1. ΕΠΩΝΥΜΟ:	ΔΟΥΓΑΣ
2. ΟΝΟΜΑ:	ΓΕΩΡΓΙΟΣ
3. ΕΤΟΣ / ΠΕΡΙΟΧΗ. ΓΕΝΝΗΣΗΣ	1968 / ΣΕΡΡΕΣ

6. ΤΡΕΧΟΥΣΑ ΑΠΑΣΧΟΛΗΣΗ :	Εθνικός Οργανισμός Δημόσιας Υγείας (ΕΟΔΥ) / Τμήμα Επιδημιολογικής Επιτήρησης και Παρέμβασης / Τμήμα Ζωοανθρωπονόσων
-----------------------------	--

7. ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ ΕΡΓΑΣΙΑΣ:	Κτηνίατρος του Τμήματος Ζωοανθρωπονόσων/ ΕΟΔΥ.
-----------------------------	--

### Α. Τίτλοι Σπουδών

<i>a/a</i>	<i>Τίτλος</i>	<i>Ίδρυμα</i>	<i>Βαθμός</i>	<i>Έτος κτήσης</i>
A1	Πτυχίο Κτηνιατρικής	Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσ/νίκης	7	1995
A2				
A3				

### Β. Μεταπτυχιακοί Τίτλοι

<i>a/a</i>	<i>Ίδρυμα</i>	<i>Έτος κτήσης</i>	<i>Ειδικότητα/εξειδίκευση/τίτλος</i>
B1			
B2			
B3			

### Γ. Διδακτορικοί Τίτλοι

<i>a/a</i>	<i>Ίδρυμα</i>	<i>Έτος κτήσης</i>	<i>Ειδικότητα/εξειδίκευση/τίτλος</i>
Γ1	Ιατρική Σχολή Εθνικού Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών	2021	Διδάκτωρ Ιατρικής Σχολής Εθνικού Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών
Γ2			

### Δ. Εμπειρία

<i>α/α</i>	<i>Από</i>	<i>Έως</i>	<i>Μήνες απασχό- ρησης</i>	<i>Φορέας/Εργοδότης</i>	<i>Ειδικότητα - Καθήκοντα (συνοπτικά)</i>
Δ1	1997	2005		Αυτοαπασχολούμενος	Κτηνίατρος ζώων συντροφιάς
Δ2	2005	2020		2005-2019 ΚΕΕΛΠΝΟ, από 2019- ΕΟΔΥ	<p>Τμήμα Ζωοανθρωπονόσων, Δ/νση Επιδημιολογικής Επιτήρησης &amp; Παρέμβασης για Λοιμώδη Νοσήματα, ΕΟΔΥ</p> <p>Επιστημονική συμβουλή σε επαγγελματίες υγείας και κοινό σχετικά με θέματα μετάδοσης, πρόληψης, διάγνωσης ζωνοσόων, παρακολούθηση-ανάλυση εισερχόμενων δεδομένων για ανθρώπινα κρούσματα, εκπαίδευση σε μέσα ατομικής προστασίας, συμμετοχή σε επιστημονικές συναντήσεις, διερεύνηση συρροών-επιδημιών ή μεμονωμένων κρουσμάτων σχετιζόμενων με ζωοανθρωπονόσους, συγγραφή οδηγιών για επαγγελματίες υγείας και κοινό, επικοινωνία με Κτηνιατρικές Υπηρεσίες – Διευθύνσεις Υγείας, μέλος της Επιτροπής για τη Λύσσα του Υπουργείου Αγροτικής Ανάπτυξης &amp; Τροφίμων, μέλος ομάδων εργασίας για τη λύσσα που συντονίζονται από τον ΕΟΔΥ</p>

#### **Ε. Γλωσσομάθεια**

<i>α/α</i>	<i>Γλώσσα</i>	<i>Επίπεδο</i>	<i>Τίτλος Πιστοποιητικού</i>	<i>Φορέας που το εξέδωσε</i>
E1	Αγγλικά	Proficiency	Certificate of Proficiency in English	University of Michigan, U.S.A.

#### **Ζ. Γνώση χρήσης Η/Υ**

Z1	Advanced Microsoft Office
Z2	EpiData
Z3	SPSS IBM
Z4	Quantum GIS

#### **Η. Άλλα πιστοποιητικά ή βεβαιώσεις**

H1	Βεβαίωση παρακολούθησης ενέργειας κατάρτισης «Δημόσια Υγεία και Παρασιτικά Τροπικά Νοσήματα» 150 ώρες (2006), Εθνική Σχολή Δημόσιας Υγείας, Αθήνα, Ελλάδα
----	---



H2	Βεβαίωση παρακολούθησης ενέργειας κατάρτισης «Μεθοδολογία Επιδημιολογικής Έρευνας και εφαρμογή στη Δημόσια Υγεία» 150 ώρες (2006), Εθνική Σχολή Δημόσιας Υγείας, Αθήνα, Ελλάδα
H3	Certificate of Attendance ,10 <sup>th</sup> European Programme for Intervention Epidemiology Training (Epiet) Scientific Seminar (13-15 October 2005), Minorca, Spain
H4	Certificate of attendance for the training on managerial skills for outbreak investigation coordinators (13-18 April 2008), ECDC, Sweden
H5	Certificate “Introduction in Food Safety and HACCP Systems” (5-9 March 2007), WHO EURO/WHO MZCP, Athens, Greece
H6	Certificate of attendance to Inter-Country Training Course on Zoonotic and Foodborne Diseases (2-6 September 2007) WHO EMRO/ WHO MZCP, Cairo, Egypt

### Θ. ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ – ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ

#### ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΙΑΤΡΙΚΑ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ

Δ1	<b>Douglas G</b> , Konte V, Mitrou K, Georgakopoulou T, Baka A, Liona A, Tatsiou D, Metallidis S, Istikoglou I, Christodoulou E, Stavrakakis M, Pargiana C, Tsalikoglou F, Tzani M, Korou LM, Tasioudi K, Mavrouli M, Vrioni G, Tsiodras S. Surveillance of Rabies Postexposure Prophylaxis in Greece: 4 Years Experience. <i>Vector Borne Zoonotic Dis.</i> 2019 Apr;19(4):295-301. doi: 10.1089/vbz.2018.2344
Δ2	<b>Douglas G</b> , Mavrouli M, Vrioni G, Lytras T, Mellou K, Metallidis S, Istikoglou I, Mitrou K, Tzani M, Georgopoulou I, Tsalikoglou F, Garetsou E, Poulakou G, Giannitsioti E, Moschopoulos C, Baka A, Georgakopoulou T, Tsiodras S, Tsakris A. Antibody Response Following Pre-Exposure Immunization Against Rabies in High-Risk Professionals. <i>Vector Borne Zoonotic Dis.</i> 2019 Dec 2. doi: 10.1089/vbz.2019.2526
Δ3	<b>Douglas G</b> , Tsakris A, Beleri S, Patsoula E, Billinis C, Papaparaskevas J. Evidence of <i>Brucella melitensis</i> DNA in the Microbiome of <i>Ctenocephalides felis</i> from Pet Cats in Greece. <i>Vector Borne Zoonotic Dis.</i> 2020 Jan 6. doi: 10.1089/vbz.2019.2510
Δ4	<b>Douglas G</b> , Mellou K, Kostoulas P, Billinis C, Georgakopoulou T, Tsiodras S. Brucellosis underreporting in Greece: assessment based on aggregated laboratory data of culture-confirmed cases from public hospitals. <i>Hippokratia.</i> 2019;23(3):106-110.
Δ5	<b>Douglas G</b> , Mavrouli M, Tsakris A, Billinis C, Papaparaskevas J. Serosurvey of IgG Antibodies against <i>Bartonella henselae</i> and <i>Rickettsia typhi</i> in the Population of Attica, Greece. <i>Trop Med Infect Dis.</i> 2020 Sep 16;5(3):E145. doi: 10.3390/tropicalmed5030145.
Δ6	<b>Douglas G</b> , Tsakris A, Billinis C, Beleri S, Patsoula E, Papaparaskevas J. Molecular detection of <i>Rickettsia felis</i> in common fleas in Greece and comparative evaluation of genotypic methods. <i>J Microbiol Methods.</i> 2020: 106104 doi.org:10.1016/j.mimet.2020.106104
Δ7	<b>Douglas G</b> , Tsakris A, Beleri S, et al. Molecular Evidence of a Broad Range of Pathogenic Bacteria in <i>Ctenocephalides</i> spp.: Should We Re-Examine the Role of Fleas in the Transmission of Pathogens? <i>Trop Med Infect Dis.</i> 2021;6(1):37. doi:10.3390/tropicalmed6010037
Δ8	Tsiodras S, <b>Douglas G</b> , Baka A, Billinis C, Doudounakis S, Balaska A, Georgakopoulou T, Rigakos G, Kontos V, Tasioudi KE, Tzani M, Tsarouxa P, Iliadou P, Mangana-Vougiouka O, Iliopoulos D, Sapounas S, Efstathiou P, Tsakris A, Hadjichristodoulou C, Kremastinou J. Re-emergence of animal rabies in northern Greece and subsequent human exposure, October 2012 - March 2013. <i>Euro Surveill.</i> 2013 May 2;18(18):20474

Δ9	Vorou R, <b>Douglas G</b> , Gkolfinopoulou K, Mellou K. Gastroenteritis Outbreaks in Greece. <i>The Open Infectious Diseases Journal</i> . 2009;3(1):99-105. doi:10.2174/1874279300903010099.
Δ10	Papaventsis D, <b>Douglas G</b> , Kalkouni O, Karabela S, Manika K. Occupational Exposure to Zoonotic Tuberculosis Caused by <i>Mycobacterium caprae</i> , Northern Greece, 2019. <i>Emerg Infect Dis</i> . 2021;27(7):1997-1999. doi:10.3201/eid2707.204399
Δ11	Danis K, Papa A, Papanikolaou E, <b>Douglas G</b> , Terzaki I, Baka A, Vrioni G, Kapsimali V, Tsakris A, Kansouzidou A, Tsiodras S, Vakalis N, Bonovas S, Kremastinou J. Ongoing outbreak of West Nile virus infection in humans, Greece, July to August 2011. <i>Euro Surveill</i> . 2011 Aug 25;16(34)
Δ12	Danis K, Papa A, Theocharopoulos G, <b>Douglas G</b> , Athanasiou M, Detsis M, Baka A, Lytras T, Mellou K, Bonovas S, Panagiotopoulos T. Outbreak of West Nile virus infection in Greece, 2010. <i>Emerg Infect Dis</i> . 2011 Oct;17(10):1868-72. doi: 10.3201/eid1710.110525.
Δ13	Danis K, Baka A, Lenglet A, Van Bortel W, Terzaki I, Tseroni M, Detsis M, Papanikolaou E, Balaska A, Gewehr S, <b>Douglas G</b> , Sideroglou T, Economopoulou A, Vakalis N, Tsiodras S, Bonovas S, Kremastinou J. Autochthonous Plasmodium vivax malaria in Greece, 2011. <i>Euro Surveill</i> . 2011 Oct 20;16(42)
Δ14	Gkolfinopoulou K, Bitsolas N, Patrinos S, Veneti L, Marka A, <b>Douglas G</b> , Pervanidou D, Detsis M, Triantafyllou E, Georgakopoulou T, Billinis C, Kremastinou J, Hadjichristodoulou C. Epidemiology of human leishmaniasis in Greece, 1981-2011. <i>Euro Surveill</i> . 2013 Jul 18;18(29):20532
Δ15	Tsiodras S, Korou LM, Tzani M, Tasioudi KE, Kalachanis K, Mangana-Vougiouka O, Rigakos G, <b>Douglas G</b> , Seimenis AM, Kontos V. Rabies in Greece; historical perspectives in view of the current re-emergence in wild and domestic animals. <i>Travel Med Infect Dis</i> . 2014 Nov-Dec;12(6 Pt A):628-35. doi: 10.1016/j.tmaid.2014.10.013
Δ16	Pervanidou D, Detsis M, Danis K, Mellou K, Papanikolaou E, Terzaki I, Baka A, Veneti L, Vakali A, <b>Douglas G</b> , Politis C, Stamoulis K, Tsiodras S, Georgakopoulou T, Papa A, Tsakris A, Kremastinou J, Hadjichristodoulou C. West Nile virus outbreak in humans, Greece, 2012: third consecutive year of local transmission. <i>Euro Surveill</i> . 2014 Apr 3;19(13):20758. doi: 10.2807/1560-7917.es2014.19.13.20758. Erratum in: <i>Euro Surveill</i> . 2014;19(14):pii/20766

#### ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΙΑΤΡΙΚΑ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

A1	<b>Douglas G</b> , Baka A, Mitrou K, Georgakopoulou T, Liona A, Meligonis G, Hadjichristodoulou Ch, Tsiodras S “Surveillance of rabies post-exposure prophylactic treatments, Greece, November 2012 - September 2015” 26th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 9-12 April 2016, Amsterdam, Netherlands
A2	<b>Douglas G</b> , Tsakris A, Beleri S, Priftis A, Mageropoulou A, Billinis Ch, Papaparaskevas J “16S metagenomics for the detection of <i>Rickettsia</i> spp. and <i>Bartonella</i> spp. in fleas of pet animals” 29th ECCMID 2019, 13 - 16 April 2019, Amsterdam, Netherlands
A3	<b>Douglas G</b> , Tsakris A, Mageropoulou A, Priftis A, Lytras Th, Beleri S, Patsoula E, Linou M, Billinis Ch, Papaparaskevas J “Molecular evidence of bacteria with medical relevance in fleas parasitizing cats and dogs” 30th ECCMID 2020, 19-21 April 2020, Paris, France
A4	<b>Douglas G</b> , Mellou K, Mitrou K, Kontopidou F, Georgakopoulou T, <b>Tsiodras S</b> . “Surveillance of Variant Creutzfeldt Jakob Disease, Based on the Non-confirmatory Diagnostic Criteria of the EU Case Definition, Greece, 2014–2018” IDWeek 2019, 2-6 October 2019, Washington DC, USA. Published in <i>Open Forum Infect Dis</i> . 2019;6(Suppl 2):S515. Published 2019 Oct 23. doi:10.1093/ofid/ofz360.1277
A5	<b>Douglas G</b> , Konte V, Mitrou K, Christodoulou E, Stavrakakis M, Baka A, Georgakopoulou T, Metallidis S, Istikoglou I, Pargiana Ch, Liona A, Tsalikoglou F, Tzani M, Korou M, Tasioudi K, Mavrouli M, Vrioni G, <b>Tsiodras S</b> “Surveillance of Rabies Prophylactic Treatments after Exposure to Animals: 5 years Experience” IDWeek 2018, 3-7 October 2018, San Francisco, USA
A6	<b>Politis C</b> , Soulakis V, Kakari C, Antonaki G, <b>Douglas G</b> , Georgakopoulou T, Tzani M, Vgontza N, Papaparaskevas J “Occurrence Of Transfusion-Transmitted Brucellosis In Greece A Case Report” 36th International Congress of the International Society of Blood Transfusion, June 6 - 10, 2020, Barcelona, Spain

A7	<u>Gkolfinopoulou, K.</u> , Vorou R, <b>Douglas G</b> et al “Cystic Echinococcosis (Hydatidosis) in Humans, Greece, 2002-2006” 22 <sup>nd</sup> International Congress of Hydatidology, 15-19 May 2007, Athens, Greece
A8	<u>Mellou K.</u> , Papamichail D, <b>Douglas G</b> et al “Hepatitis A among children, Greece, 2004-2006” 25 <sup>th</sup> Annual Meeting of the European Society for Paediatric Infectious Diseases, 2-4 May 2007, Porto, Portugal

#### ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΙΑΤΡΙΚΑ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

A1	<b><u>Δουγιάς Γ</u></b> «Λύσσα: Η Εισβολή Και Η Αντιμετώπιση Στην Ελλάδα» 10 <sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Δημόσιας Υγείας & Υπηρεσιών Υγείας, 31 Μαρτίου - 2 Απριλίου 2014, Αθήνα
A2	<b><u>Δουγιάς Γ</u></b> , Μήτρου Κ, Γεωργακοπούλου Θ, Μπάκα Α, Λιόνα Κ, Μελιγκώνης Γ, Αστρίτη Μ, Τσιόδρας Σ «Επιτήρηση Της ν-Cjd, Με Βάση Τα Κριτήρια Του Ευρωπαϊκού Ορισμού Κρούσματος Για Ενδεχόμενο Η Πιθανό Κρούσμα» 11 <sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Δημόσιας Υγείας & Υπηρεσιών Υγείας 21-23 Μαρτίου, Αθήνα
A3	<b><u>Δουγιάς Γ</u></b> , Μαυρούλη Μ, Χριστάκη Ε, Μήτρου Κ, Μπάκα Α, Λιόνα Κ, Μελιγκώνης Γ, Γεωργακοπούλου Θ, Τσιόδρας Σ, Βρυώνη Γ «Πρόγραμμα Προληπτικού Αντιλυσσικού Εμβολιασμού Για Το Προσωπικό Του Εθνικού Προγράμματος Επιτήρησης Και Καταπολέμησης Της λύσσας Στα Ζώα» 11 <sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Δημόσιας Υγείας & Υπηρεσιών Υγείας 21-23 Μαρτίου, Αθήνα
A4	<b><u>Δουγιάς Γ</u></b> , Μήτρου Κ, Γεωργακοπούλου Θ, Τσιόδρας Σ «Επιτήρηση Της Νέας Παραλλαγής Της Creutzfeldt-Jakob, Με Βάση Τα Κριτήρια Του Ευρωπαϊκού Ορισμού Κρούσματος» 30 <sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Νευρολογίας, 16-19 Μαΐου 2019, Χαλκιδική
A5	<b><u>Δουγιάς Γ</u></b> , Τσακρής Α, Μπελερή Σ, Πρίφτης Α, Μαγεροπούλου Α, Μπιλλίνης Χ, Παπαπαρασκευάς Ι «16s Metagenomics Για Την Διερεύνηση <i>Bartonella</i> Και <i>Rickettsia</i> Spp. Σε Ψύλλους Απο Ζώα Συντροφιάς Στην Αττική» 9 <sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Κλινικής Μικροβιολογίας, 21-23 Φεβρουαρίου 2019, Αθήνα
A6	<b><u>Δουγιάς Γ</u></b> , Τσακρής Α, Μπελερή Σ, Μαγεροπούλου Α, Πρίφτης Α, Λύτρας Θ, Μπελερή Σ, Πατσουλά Ε, Λινού Μ, Μπιλλίνης Χ, Παπαπαρασκευάς Ι «Ανίχνευση κλινικώς σημαντικών βακτηρίων στο μικροβίωμα ψύλλων που παρασιτούν σε κατοικίδια ζώα» 1 <sup>ο</sup> Πανελλήνιο Διαδικτυακό Συνέδριο Ιατρικής Βιοπαθολογίας, 11-13 Δεκεμβρίου 2020
A7	Ρηγάκος Γ, <b><u>Δουγιάς Γ</u></b> , Μπάκα Α, Καραγεώργου Α, Ηλιόπουλος Δ, Λιόνα Α, Μελιγκώνης Γ, Γεωργακοπούλου Θ, Χατζηχριστοδούλου Χ «Διαχείριση Περιστατικών Με Πιθανή Μετάδοση λύσσας» 1 <sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Διαχείρισης Κρίσεων στον Τομέα της Υγείας, Αθήνα 8-10 Νοεμβρίου 2013
A8	Ρηγάκος Γ, <b><u>Δουγιάς Γ</u></b> , Μπάκα Α, Τσιόδρας Σ, Καραγεώργου Αικ,3, Ηλιόπουλος Δ, Λιόνα Αικ, Τόλια Α, Μελιγκώνης Γ, Γεωργακοπούλου Θ, Χατζηχριστοδούλου Χ. «Δράσεις Κε.Ελ.Π.Νο. Που Αφορούν Τη Διαχείριση Περιστατικών Με Πιθανή Έκθεση Σε Λύσσα, Για Την Προάσπιση Της Δημοσίας Υγείας» 10 <sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Δημόσιας Υγείας & Υπηρεσιών Υγείας, 31 Μαρτίου - 2 Απριλίου 2014, Αθήνα

Η παρούσα Διδακτορική Διατριβή αφιερώνεται  
στον Πατέρα, στη Μητέρα και στον Αδελφό μου

## Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Μικροβιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών (ΕΚΠΑ), Αθανάσιο Τσακρή, ο οποίος μου ανέθεσε την εκπόνηση της παρούσας διατριβής και άκουγοντας με προσοχή τις εισηγήσεις μου, με κατεύθυνε με ηρεμία και ευθυκρισία στις πιο ορθές επιλογές και μου παρείχε στήριξη και βοήθεια σε όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της διατριβής.

Ιδιαίτερος ευχαριστώ τον επιβλέποντά μου, αναπληρωτή Καθηγητή του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας της Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ, Ιωσήφ Παπαπαρασκευά, για όλες τις γνώσεις που μου μετέδωσε και την ακούραστη, επιστημονικά άρτια αλλά και φιλική καθοδήγηση σε όλα τα στάδια της μελέτης.

Είμαι ευγνώμων στον Καθηγητή του Τμήματος Μικροβιολογίας και Παρασιτολογίας της Κτηνιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, Χαράλαμπο Μπιλλίνη, μέλος της Τριμελούς Επιτροπής, ο οποίος με υποστήριξε ενεργά και με τον οποίον είχα άψογη και στενή συνεργασία.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ απευθύνω και στους Αθανάσιο Πρίφτη και Αναστασία Μαγεροπούλου, Τεχνολόγους-Παρασκευαστές του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας της Ιατρικής Σχολής, που με βοήθησαν να φέρω εις πέρας το εργαστηριακό – τεχνικό κομμάτι της διατριβής, για την αστείρευτη ενέργεια, τη θέληση για μετάδοση γνώσεων, την ικανότητα να διεκπεραιώνουν και τα πιο δύσκολα εγχειρήματα και τις εύστοχες παρατηρήσεις τους.

Χωρίς την βοήθεια των ιδιωτών Κτηνιάτρων των κλινικών μικρών ζώων της Αττικής στη συλλογή δειγμάτων ψύλλων και στην καταγραφή των απαιτούμενων επιδημιολογικών πληροφοριών δεν θα ήταν δυνατή η μελέτη. Τους ευχαριστώ ιδιαίτερα που παρά τη δυσκολία της καθημερινότητας της κτηνιατρικής κλινικής πράξης, βρήκαν τον χρόνο και διέθεσαν την απαραίτητη προσοχή να συλλέξουν τα δείγματα. Τους ευχαριστώ ακόμα για την επιστημονική συμβολή, την ηθική υποστήριξη αλλά και για το γεγονός ότι πίστεψαν στην αξία της μελέτης.

Ευχαριστώ ακόμα τους Ιατρούς Μαργαρίτα Νικολάκη, Κωνσταντίνο Λαδιά, Γεώργιο Κολοβό, Αθανάσιο Κολοβό, Χρήστο Κατριβέση και Ελένη Τζουμακίδου για την ιδιαίτερη συμβολή τους στη συλλογή ανθρώπινων δειγμάτων ορού αίματος προκειμένου να πραγματοποιηθεί οροεπιδημιολογική μελέτη για IgG αντισώματα κατά *Bartonella* spp. και *Rickettsia typhi* σε δείγμα του πληθυσμού της Αττικής.

Θα ήταν παράλειψη να μην απευθύνω ευχαριστία στην Ηλέκτρα Λευτάκη η οποία συνέδραμε με την πολύτιμη καθοδήγησή της στο διοικητική διαδικασία της υποβολής της διατριβής.

Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω τους γονείς μου Μαργαρίτα και Χαρίσιο, τον αδελφό μου Νίκο και τα άτομα του στενού μου φιλικού περιβάλλοντος για την υπομονή, την καλοσύνη και τη στήριξη που μου παρείχαν κατά τη διάρκεια της ενασχόλησής με τη διατριβή.

## Πρόλογος

Μόνο σχετικά πρόσφατα διαπιστώθηκε ότι βακτήρια του γένους *Bartonella* όσο και ορισμένα είδη *Rickettsia* μπορεί να έχουν παθογόνο δράση σε διαφορετικά επίπεδα η οποία μάλιστα μπορεί να εκδηλώνεται σε ικανό βάθος χρόνου. Τα τελευταία χρόνια η *Bartonella* συνδέθηκε με την ανάπτυξη επιπλοκών που μπορεί να οδηγήσουν σε βλάβη καρδιακών βαλβίδων, καρδιακή ανεπάρκεια και ανάγκη χειρουργικής αντιμετώπισης ενώ ταυτόχρονα αυξήθηκε σημαντικά η γνώση γύρω από τη βιολογία του βακτηρίου. Η εμμένουσα παρουσία του βακτηρίου στα κύτταρα του ενδοθηλίου αποτελεί τη βάση για την εμπλοκή του σε χρόνιες βλάβες που μπορεί να εμφανίζονται τόσο στο ίδιο το αγγειακό σύστημα όσο και σε άλλα συστήματα, π.χ. στο νευρικό. Η ενδοκυτταρική εντόπιση, η δυσκολία καλλιέργειας, η βραδύτητα της διαίρεσης του βακτηρίου και η ποικίλη παθολογία που μπορεί να εμφανιστεί και σε μεγάλο χρονικό διάστημα από την αρχική μόλυνση ήταν παράγοντες που δυσχέραιναν την αναγνώριση της *Bartonella*. Τα τελευταία ωστόσο χρόνια έχει ενταθεί η μελέτη γύρω από το βακτήριο καθώς έρχονται στο φως νέα ευρήματα για τις επιπτώσεις του στην ανθρώπινη υγεία. Διάφορα έντομα μπορούν να μεταδώσουν το παθογόνο στον άνθρωπο, ωστόσο οι κοινοί ψύλλοι των κατοικιδίων ζώων *Ctenocephalides* spp. αποτελούν τους κυριότερους διαβιβαστές για τα περισσότερα είδη παθογόνων *Bartonella* spp.

Οι ρικέτσιες είναι μια ευρεία ομάδα παθογόνων που «κλασικά» χωρίζεται σε δύο κατηγορίες, αυτά που ανήκουν στην ομάδα του τύφου (Typhus Group -TG) και τα ανήκοντα στην ομάδα των κηλιδωδών πυρετών (Spotted Fever Group -SFG).

Η *Rickettsia felis* είναι από τα πιο πρόσφατα ανακαλυφθέντα βακτήρια στο οποίο αποδίδεται η νοσολογική οντότητα flea-borne spotted fever (FBSF) και σύμφωνα με ορισμένους ανήκει σε μια ξεχωριστή μεταβατική κατηγορία (Transitional Group – TRG). Οι ρικέτσιες εμφανίζουν μεγάλη ποικιλομορφία και στενές συγγενικές σχέσεις ανάμεσα στους διάφορους φυλογενετικούς τύπους. Η κατάταξη των βακτηρίων *Rickettsia* καθίσταται σε ορισμένες περιπτώσεις προβληματική καθώς η εξέλιξη των μοριακών μελετών ανιχνεύει ολόένα και μικρότερες γενετικές διαφορές και επομένως προκύπτουν καινούργια στελέχη, υπότυποι και υποψήφια προς ταξινόμηση είδη (candidate species). Οι ψύλλοι αποτελούν ικανούς διαβιβαστές της *R. felis* και φυλογενετικά κοντινών ρικετσιών (*Rickettsia felis*-like organisms). Σε αυτά τα έντομα ενώ περιγράφεται ότι είναι δυνατή σε ποικίλο βαθμό η κάθετη μετάδοση του παθογόνου και η διατήρησή του κατά τα στάδια μεταμόρφωσης άρα τους αποδίδεται και ιδιότητα αποθήκης των βακτηρίων (reservoir).

Η *Rickettsia typhi*, ο αιτιολογικός παράγοντας του ενδημικού τύφου, ανήκει στην ομάδα TG και συνδέεται με την ανάπτυξη γενικευμένης νόσου με συχνή εμφάνιση εξανθήματος και κλασικά συνδέεται με την έκθεση σε ψύλλους αρουραίων (*Rattus* spp.). Μελέτες όμως έδειξαν ότι υπάρχει και κύκλος μετάδοσης στον οποίο συμμετέχουν κοινοί ψύλλοι κατοικιδίων ζώων συντροφιάς,

ιδιαίτερα ο «ψύλλος της γάτας» (*C. felis*), και ζώα όπως το opossum (μικρά μαρσιποφόρα θηλαστικά της οικογένειας *Didelphidae*) αλλά και η γάτα.

Σε όλα τα παραπάνω παθογόνα, κοινός παρονομαστής αποτελεί ο ψύλλος.

Η παρούσα διδακτορική διατριβή επικέντρωσε στη μελέτη της μικροβιακής χλωρίδας κοινών ψύλλων κατοικιδίων ζώων από την Αθήνα και την ευρύτερη περιοχή της Αττικής με έμφαση στα *Bartonella* spp., *R. felis* και *R. typhi*. Χρησιμοποιήθηκαν συμβατικές και Real-Time PCR καθώς και 16S Metagenomics και συγκρίθηκαν οι τεχνικές ως προς την ευαισθησία και ειδικότητα. Παράλληλα αποκαλύφθηκε μεγάλη βιοποικιλότητα στο βακτηριακό DNA του εσωτερικού μικροβιώματος των ψύλλων. Από την μεγάλη ποικιλία γενών και ειδών βακτηρίων που ανιχνεύθηκαν διαχωρίστηκαν αυτά που συνδέονται με βλαπτική επίδραση στην ανθρώπινη υγεία, μελετήθηκε η κατανομή τους ανά ζωικό είδος ξενιστή (σκύλος, γάτα) και διερευνήθηκαν πιθανοί παράγοντες κινδύνου για την παρουσία τους στους ψύλλους. Η μελέτη ανέδειξε την παρουσία στους ψύλλους βακτηρίων με δυνητική παθογόνο δράση. Η συνύπαρξη ψύλλων και ανθρώπων δημιουργεί και ερωτήματα για την πιθανή εμπλοκή των εντόμων αυτών σε μεταδοτικά νοσήματα.

## Περίληψη

Η παρούσα διατριβή επικεντρώθηκε στην περιοχή της Αττικής, εστιάζοντας στη μοριακή διερεύνηση κοινών ψύλλων ζώων συντροφιάς για παθογόνα βακτήρια και στην εκτίμηση της φορέας IgG αντισωμάτων στον πληθυσμό έναντι των *Rickettsia typhi*, *Bartonella henselae* και *B. quintana*.

Τα δείγματα ψύλλων προήλθαν από κτηνιατρικές κλινικές και τα δείγματα ανθρώπων από ιδιωτικά μικροβιολογικά εργαστήρια στην Αττική. Για την μοριακή διερεύνηση των ψύλλων χρησιμοποιήθηκαν συμβατικές και real-time PCR και αλληλούχιση επόμενης γενεάς του γονιδίου 16S rDNA. Οι ορολογικές δοκιμές έγιναν με έμμεσο ανοσοφθορισμό (Vircell™, Santa Fé, Spain), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Ο χαρακτηρισμός των βακτηρίων με δυνητική υγειονομική σημασία βασίστηκε στο International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems by WHO (ICD-11, 2019 version).

Από τα δείγματα ψύλλων, 100 αποτελούμενα μόνο από θηλυκούς ψύλλους επιλέχθηκαν για ανάλυση, στα οποία περιλαμβάνονταν 96 δείγματα με *Ctenocephalides felis*, δύο δείγματα με *Ctenocephalides canis* και δύο δείγματα με *Pulex irritans*, που συλλέχθηκαν από 67 γάτες και 33 σκύλους.

Επιβεβαιωμένα για το γένος *Rickettsia* βρέθηκαν 16 δείγματα εκ των οποίων 14 επιβεβαιώθηκαν για *R. felis* εκ των οποίων οκτώ ανήκαν σε γάτα και έξι σε σκύλο.

*Bartonella* spp. ανιχνεύθηκε σε 32 δείγματα. Από αυτά σε 27 ανιχνεύθηκε το είδος: 12 είχαν *B. clarridgeiae*, επτά *B. henselae*, ένα *B. koehlerae* ενώ τα υπόλοιπα επτά είχαν μικτή μόλυνση με περισσότερα από ένα είδη *Bartonella*. Όλα τα θετικά δείγματα προήλθαν από γάτα εκτός από ένα στο οποίο δεν ταυτοποιήθηκε το είδος.

Η ευαισθησία των μοριακών μεθόδων για το γένος *Rickettsia* κυμάνθηκε από 62,5% έως 93,8% και η ειδικότητα από 65,0% έως 100%. Οι ειδικές για *R. felis* μοριακές δοκιμές εμφάνισαν 92,9% έως 100% ευαισθησία ενώ η ειδικότητα κυμάνθηκε από 65,0% έως 100%.

Δυνητική υγειονομική σημασία στο μικροβίωμα των ψύλλων είχαν 33 γένη βακτηρίων και συγκεκριμένα τα *Acinetobacter*, *Actinomyces*, *Bacillus*, *Bacteroides*, *Bartonella*, *Bifidobacterium*, *Brucella*, *Campylobacter*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Coxiella*, *Enterococcus*, *Fusobacterium*, *Haemophilus*, *Kingella*, *Klebsiella*, *Legionella*, *Leptotrichia*, *Moraxella*, *Morganella*, *Mycobacterium*, *Neisseria*, *Nocardia*, *Pasteurella*, *Propionibacterium*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Rickettsia*, *Salmonella*, *Serratia*, *Staphylococcus*, *Stenotrophomonas* και *Streptococcus*. Η κατανομή αυτών των γενών δεν διέφερε ανά είδος ζώου ξενιστή παρά μόνο στην *Bartonella* spp. η οποία ανευρέθηκε συχνότερα σε ψύλλους από γάτες (OR=27,6,  $p<0,001$ ). Τα γένη *Coxiella*, *Campylobacter*, *Legionella*, *Spirochaeta*, *Salmonella*, *Brucella* ανευρέθησαν



μόνο σε γάτες χωρίς όμως να στοιχειοθετείται στατιστική σημαντικότητα. Τα βακτηριακά είδη υγειονομικής σημασίας ήταν 40 και περιλάμβαναν τα εξής: *Acinetobacter baumannii*, *Bacteroides fragilis*, *Clostridium perfringens*, *Enterococcus faecalis*, *E. mundtii*, *Fusobacterium nucleatum*, *Haemophilus aegyptius*, *Kingella kingae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Leptotrichia buccalis*, *L. hofstadii*, *Moraxella lacunata*, *Pasteurella multocida*, *Propionibacterium acnes*, *P. propionicum*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Rickettsia australis*, *R. hoogstraalii*, *Salmonella enterica*, και διάφορα είδη *Bartonella*, *Staphylococcus* και *Streptococcus*.

IgG αντισώματα για *B. henselae* ανιχνεύθηκαν σε 14,3% και για *R. typhi* σε 1,0% ενώ IgG και για τα δύο παθογόνα σε 3,5% των συμμετεχόντων (N=202). Εντοπίστηκε θετική συσχέτιση οροθετικότητας για IgG έναντι *B. henselae* με κατοίκηση σε παραλιμάνια περιοχή ( $\chi^2(6)=17,737$ ,  $p=0,009$ ).

Από τα ευρήματα της διατριβής προκύπτει ότι οι ψύλλοι των ζώων συντροφιάς στην Αττική φέρουν σε σημαντικό ποσοστό παθογόνα βακτήρια ενώ οι ψύλλοι από γάτες είναι συχνότερα μολυσμένοι με *Bartonella*. Η πληθώρα βακτηρίων υγειονομικής σημασίας στους ψύλλους και η αυξημένη και πολύπτυχη διεπαφή του εντόμου αυτού με τον άνθρωπο, ωθούν σε εκτενέστερη διερεύνηση του το κατά πόσο και πως ο ψύλλος σχετίζεται με τη μετάδοση λοιμωδών παραγόντων στον άνθρωπο πέρα από τα γνωστά παθογόνα. Ο πληθυσμός της Αττικής εμφανίζει σε ένα ποσοστό έκθεση σε *Bartonella* και *Rickettsia* ενώ ιδιαίτερα για το βακτήριο της *Bartonella* η πιθανότητα έκθεσης είναι υψηλότερη στην περιοχή του μεγαλύτερου εμπορικού/επιβατικού λιμανιού της χώρας. Συνεπώς, θα πρέπει να ενισχυθεί η επιδημιολογική επιτήρηση και η εργαστηριακή δυνατότητα διάγνωσης για λοιμώξεις οφειλόμενες σε *Rickettsia* και *Bartonella*. Παράλληλα θα πρέπει να δοθεί ιδιαίτερη προσοχή σε βλάβες στο καρδιαγγειακό σύστημα που προκαλεί το βακτήριο της *Bartonella* σε βάθος χρόνου.

## ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### Ιστορική αναδρομή

Η *Bartonella* spp. αποτελεί γένος Gram ασθενώς αρνητικών, βραδέως αναπτυσσόμενων και απαιτητικών, ενδοκυτταρικών βακτηρίων και το μόνο γένος της οικογένειας *Bartonellaceae*<sup>1</sup>. Περιλαμβάνει παθογόνα που μπορούν να μεταδοθούν είτε με απευθείας ενοφθαλμισμό (π.χ. γρατσούνισμα γάτας) ή μέσω αιματοφάγων εντόμων σε θηλαστικά και να προκαλέσουν λοίμωξη<sup>1</sup>. Το πρώτο καταγεγραμμένο κρούσμα, οφειλόμενο στα βακτήρια αυτά, σημειώθηκε το 1885 στον Daniel Carrión, ένα Περουβιανό φοιτητή ιατρικής, ο οποίος κατά την προσπάθειά του να αποδείξει τη μολυσματική φύση του «Πυρετού Οroya» (Oroya fever) ενοφθάλμισε στον εαυτό του αίμα από ασθενή, νόσησε και κατέληξε<sup>2</sup>. Η νόσος ονομάστηκε προς τιμή του “Carrión disease”. Ο «πυρετός των χαρακωμάτων» (Trench fever), μια άλλη νοσολογική οντότητα οφειλόμενη σε *Bartonella* spp., μεταδίδεται μέσω ψειρών (*Pediculus humanus corporis*) και περιγράφηκε για πρώτη φορά κατά τον πρώτο παγκόσμιο πόλεμο (1915-1918) σε στρατιώτες που παρέμεναν καθηλωμένοι στα χαρακώματα υπό φτωχές συνθήκες υγιεινής, το δε παθογόνο ονομάστηκε *Bartonella quintana* λόγω του χαρακτηριστικού πενθήμερου πυρετού (quintan fever)<sup>3</sup>. Το όνομα *Bartonella* προέρχεται από τον Alberto Barton που πρώτος ανακάλυψε το 1909 το βακτήριο που αργότερα αποδείχθηκε ότι επρόκειτο για την *B. bacilliformis*. Τα μετέπειτα χρόνια και ειδικότερα τις τελευταίες δύο δεκαετίες, η μοριακή διερεύνηση της αλληλούχησης γενετικού υλικού των βακτηρίων με την τεχνική 16s rRNA έδειξε ότι το γένος *Rochalimaea* ανήκει φυλογενετικά στο γένος *Bartonella* και ότι τα βακτήρια του γένους *Bartonella* από την τάξη *Rickettsiales* που βρισκόταν, ταξινομήθηκαν εκ νέου στην τάξη *Rhizobiales*<sup>4,5</sup>.

Η *B. henselae* απομονώθηκε και περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1990 σε HIV+ ασθενή από τους Regnery et al.<sup>6</sup> Ο Didier Rault από το 1996 συνέδεσε την *Bartonella* spp. με την πρόκληση ενδοκαρδίτιδας και εκβλαστήσεων στις καρδιακές βαλβίδες<sup>7</sup>. Το παραπάνω σε συνδυασμό με νεώτερες περιγραφές για την κρυπτική φύση και την αργή ανάπτυξη του βακτηρίου που έχει ως αποτέλεσμα την παραμονή του ακόμη και επί δεκαετίες, στους ιστούς τροπισμού – κυρίως το ενδοθήλιο - και την κλινική εικόνα ποικίλης βαρύτητας, η οποία δεν μπορεί να συνδεθεί εύκολα με την αρχική μόλυνση η οποία μπορεί να έλαβε χώρα πολλά χρόνια πριν<sup>1</sup>, γέννησαν νέο ενδιαφέρον για την *Bartonella* spp.

Η *Rickettsia felis*, είναι ένα είδος που πρόσφατα ανακαλύφθηκε και μαζί με τη *R. typhi*, αποτελούν τις μοναδικές ρικέτσιες που διαπιστωμένα μεταδίδονται μέσω ψύλλων. Η *R. felis* αρχικά ταξινομήθηκε στην ομάδα κηλιδωδών πυρετών (Spotted Fever Group, SFG) υπάρχουν ωστόσο ισχυρές ενδείξεις που ανατοποθετούν το είδος σε μία μεταβατική ομάδα (Transitional Group, TRG) καθώς με βάση τα χαρακτηριστικά του δεν είναι σαφής η κατάταξή του σε μία από τις δύο «κλασσικές» ομάδες ρικετσιών, τη SFG και την ομάδα του τύφου (Typhus Group, TG)<sup>8</sup>. Η *R. felis* είναι το αίτιο του Κηλιδώδους από Ψύλλους Πυρετού (Flea-Borne Spotted Fever, FBSF). Η σύνδεση του βακτηρίου με ανθρώπινη νόσο έγινε από τους Schriefer et. al. το 1994 όπου περιγράφηκε για πρώτη φορά κρούσμα FBSF σε άνθρωπο<sup>9</sup> ενώ το βακτήριο περιγράφηκε σαν ξεχωριστό είδος από τον Higgins et al. το 1996<sup>10</sup> και ακολούθησε ο Bouyer et al. το 2001 που το καθιέρωσε και το τοποθέτησε στο International Code of Nomenclature of Bacteria<sup>11</sup>. Η πρώτη απομόνωση του βακτηρίου έγινε από τους La Scola et al. το 2002<sup>12</sup> και εν πολλοίς το στέλεχος που απομονώθηκε (Marseille-URRWXCal2) αποτελεί σημείο αναφοράς μέχρι και σήμερα. Ενώ οι ψύλλοι θεωρούνται οι κλασσικοί διαβιβαστές του βακτηρίου, και μάλιστα με δυνατή κάθετη και διασταδιακή μετάδοση<sup>13</sup>, έχουν περιγραφεί και άλλα αρθρόποδα που μπορεί να συμμετέχουν στο κύκλο μετάδοσης π.χ. ανιχνεύθηκε σε ανωφελείς κώνωπες στη υποσαχάρια Αφρική. Το γεγονός ότι η νόσος δεν μπαίνει στη διαφορική διάγνωση, η απουσία δυνατότητας εργαστηριακής ανίχνευσης, ο αυτοπεριοριζόμενος χαρακτήρας των συμπτωμάτων και η μη συστηματική καταγραφή των κρουσμάτων, οδηγούν σε υποδιάγνωση και υποδήλωση της πραγματικής επίπτωσης. Ωστόσο υπάρχουν ενδείξεις ότι μπορεί να είναι το αίτιο σε μεγάλο ποσοστό περιστατικών με πυρετό αγνώστου αιτιολογίας ή σε άλλες παθολογικές καταστάσεις<sup>14</sup>. Από την άλλη, ορισμένοι έχουν αμφισβητήσει την παθογόνικότητα του βακτηρίου στον άνθρωπο λόγω της συχνής ανίχνευσής του σε ασυμπτωματικούς φορείς. Όλα τα παραπάνω και πολλές ακόμα ανεξερεύνητες πτυχές του βιολογικού του κύκλου όσο και των επιπτώσεών του στην ανθρώπινη υγεία, δημιουργούν αυξημένο ενδιαφέρον για αυτό το νεοανακαλυφθέν είδος βακτηρίου.

Η *R. typhi* είναι το αίτιο του ενδημικού τύφου ή τύφου προκαλούμενου από τρωκτικά “murine typhus” και ο κλασσικός διαβιβαστής του παθογόνου είναι ο ψύλλος των αρουραίων και άγριων τρωκτικών, *Xenopsylla cheopis*. Ο όρος «τύφος» προέρχεται από τα αρχαία Ελληνικά και σημαίνει καπνός, ομίχλη ή θολότητα, για να περιγράψει το παραληρηματική κατάσταση που βιώνουν οι ασθενείς. Ο ενδημικός τύφος που οφείλεται στη *R. typhi* έχει πιο ήπια κλινική εικόνα

από τον επιδημικό τύφο που μεταδίδεται μέσω των ψειρών και οφείλεται στη *R. prowazekii*, ωστόσο χωρίς τη λήψη της κατάλληλης αντιβιοτικής αγωγής ένα ποσοστό των ασθενών μπορεί να καταλήξει<sup>15</sup>. Για αιώνες οι δύο μορφές τύφου δεν είχαν γίνει αντιληπτές και η πρώτη αναφορά για τύφο οφειλόμενο σε διαβιβαστή διαφορετικό από τις ψείρες έγινε από τον Brill το 1898, με αναφορά για διαφορετική κλινική και εργαστηριακή εικόνα από τον τύφο που σχετίζεται με ψείρες. Ωστόσο ο Maxcy το 1920 ήταν αυτός που καθιέρωσε τον διαχωρισμό του τύφου στις μορφές που ισχύουν και σήμερα, τον επιδημικό και τον ενδημικό, και επιβεβαίωσε ότι η μετάδοση του ενδημικού τύφου γίνεται επι απουσίας ψειρών και με τη μεσολάβηση άλλου αιματοφάγου αρθρόποδου και των αρουραίων. Η πλήρης χαρτογράφηση του γονιδιώματος της *R. typhi* έγινε από τον McLeod et al.<sup>16</sup> (2004).

### Ψύλλοι κατοικιδίων ζώων συντροφιάς

Οι ψύλλοι των κατοικιδίων ζώων (*Ctenocephalides* spp.) είναι εξαιρετικά διαδεδομένοι και απαντώνται σε πολλά και διαφορετικά περιβάλλοντα<sup>17</sup>. Τα αρθρόποδα αυτά πρέπει να λαμβάνουν υποχρεωτικώς αιματούχα γεύματα από θηλαστικά, και ενώ προτιμούν το σκύλο ή τη γάτα για να τραφούν, επί απουσία αυτών ή και συγκυριακά, επιτίθενται και σε ανθρώπους. Το δήγμα από ψύλλο μπορεί να προκαλέσει κνησμώδη βλατίδα που μπορεί να συνοδεύεται από εκτεταμένη και έντονη δερματική αντίδραση αν ο εκτεθείς πάσχει από αλλεργική από ψύλλους δερματίτιδα, συνήθως όμως η δερματική αλλοίωση είναι εστιασμένη και αυτοπεριοριζόμενη<sup>18</sup>.

Είναι άγνωστο το μέρος του πληθυσμού που έχει δηχθεί μία ή περισσότερες φορές από ψύλλους κατά τη διάρκεια της ζωής του ενώ η ήπια εικόνα της δερματικής αντίδρασης και ο αυτοπεριοριζόμενος χαρακτήρας της οδηγεί σε δυσκολία ανάκλησης του συμβάντος. Όπως έχει παρατηρηθεί, συχνά, ασθενείς με ενδημικό τύφο δεν μπορούν να ανακαλέσουν επαφή με ψύλλους<sup>19</sup>.

Από την επαφή με τον ψύλλο ή τα περιττώματά του, μπορούν να μεταδοθούν στον άνθρωπο βακτήρια που οι κλινικές τους εκδηλώσεις μπορεί να εμφανιστούν σύντομα, μπορεί όμως και να έχουν παρατεταμένο χρόνο επώασης και οι επιπτώσεις τους να εκδηλωθούν ακόμα και πολλά χρόνια μετά την αρχική έκθεση<sup>20</sup>. Ένα τέτοιο παράδειγμα είναι οι ενδοκαρδίτιδες και βαλβιδοπάθειες που προκαλούνται από την *B. henselae*<sup>21</sup>. Ταυτόχρονα παραμένουν αρκετά κενά στις γνώσεις μας για τον φυσικό κύκλο των *Rickettsia* και *Bartonella* spp., και τον ακριβή ρόλο των ψύλλων και των ζώων-ξενιστών τους στη μόλυνση του ανθρώπου όσο και για τις μακροχρόνιες επιπτώσεις στην υγεία του πληθυσμού.

Επιπλέον, ενώ τα είδη βακτηρίων που θεωρούνται ως παθογόνα και μεταδίδονται από τους ψύλλους στον άνθρωπο είναι συγκεκριμένα, το συνολικό βακτηριακό φορτίο των ψύλλων

(μικροβίωμα) μπορεί να περιλαμβάνει ένα τεράστιο αριθμό μικροβίων. Το γεγονός της συνύπαρξης των αρθρόποδων αυτών με τον άνθρωπο και η συγκυριακή λήψη αιματούχων γευμάτων από αυτόν δημιουργεί ένα ενδιαφέρον για τη συνολική μελέτη των βακτηρίων που βρίσκονται στο εσωτερικό του εντόμου.

*Bartonella spp.*

## 1.1 Βακτηριολογία

Το γένος *Bartonella* ανήκει στην οικογένεια *Bartonellaceae* της τάξης των Rhizobiales και της κλάσης των Alphaproteobacteria και περιλαμβάνει βακτήρια Gram αρνητικά, ενδοκυτταρικά, αερόβια απαιτητικά στην καλλιέργεια και αρνητικά στις αντιδράσεις της οξειδάσης, της καταλάσης και της ουρεάσης<sup>22</sup>. Η ανάπτυξη σε καλλιέργειες είναι δύσκολη και απαιτεί κατάλληλο αξενικό υπόστρωμα προσομοιάζον στα κύτταρα και το περιβάλλον του ξενιστή, σε θερμοκρασία 37 °C και ατμόσφαιρα 5% CO<sub>2</sub> και απαιτεί περίπου δύο εβδομάδες κατ' ελάχιστο για την μακροσκοπική ανίχνευση αποικιών, διάστημα που μπορεί να φτάσει και τον ενάμιση μήνα<sup>23</sup>. Λόγω ατελούς μεταβολικού μηχανισμού το βακτήριο δεν μπορεί να χρησιμοποιήσει γλυκόζη ως πηγή ενέργειας, μπορεί όμως για το σκοπό αυτό να μεταβολίσει αμινοξέα, γλουταμίνη, γλουταμινικό οξύ, σουκινικό οξύ ή πυροσταφυλικό οξύ<sup>24 25</sup>.

Σημαντική πρόοδος στην καλλιέργεια *Bartonella* σημειώθηκε από την εργασία των Maggi et al. με τη δημιουργία του *Bartonella-Alphaproteobacteria* growth medium (BAPGM) που στηρίχθηκε σε προϋπάρχον ζωμό ανάπτυξης εντόμων σε συνθήκες 35°C και ατμόσφαιρα 5% CO<sub>2</sub>, υπερκορεσμένη σε νερό, με εκκίνηση της λογαριθμικής φάσης ανάπτυξης σε 48 με 72 ώρες και πλήρη ανάπτυξη σε 7 με 10 ημέρες<sup>26</sup>.

Η ανάπτυξη όταν γίνεται σε αξενικό μέσο εξαρτάται από την παρουσία αιμίνης και το άγαρ θα πρέπει να εμπλουτίζεται με αίμα κατά προτίμηση κουνελιού ή αλόγου, ωστόσο όλες οι *Bartonella* αναπτύσσονται αργά, σε απλό αιματούχο άγαρ (τουλάχιστον 12 ημέρες έως 45), όμως σε ανακαλλιέργειες (subcultures) μπορεί να εμφανιστούν αποικίες σε 3-5 ημέρες.

Στον **Πίνακα 1** φαίνονται τα θρεπτικά υποστρώματα, οι συνθήκες καλλιέργειες και η αναμενόμενη ανάπτυξη *B. henselae*.

**Πίνακας 1** Θρεπτικά υποστρώματα, συνθήκες ανάπτυξης και αποτέλεσμα της καλλιέργειας, για *B. henselae* (Πηγή: Didi et al. 2013).

Υπόστρωμα	Συνθήκες ανάπτυξης	Αποτέλεσμα
Διφασικό μέσο	37 °C, 5% CO <sub>2</sub> υψηλή υγρασία	Στον ζωμό: άφθονη ανάπτυξη, πυκνή κοκκιωματώδης θολερότητα, απουσία χρώματος Στο στερεό υπόστρωμα: κυκλικές, υπεγειρμένες, λείες, λευκές με διαφάνεια, 1-3 mm αποικίες
Ζωμός τρυπτόνης-σόγιας	37 °C, 5% CO <sub>2</sub> υψηλή υγρασία	Άφθονη ανάπτυξη, πυκνή κοκκιωματώδης θολερότητα, απουσία χρώματος
Άγαρ τρυπτόνης-σόγιας με 5% αίμα προβάτου	37 °C, 5% CO <sub>2</sub> υψηλή υγρασία	Αποικίες διαμέτρου 1-3 mm, κυκλικές, λείες, υπόκυρτες, όχι με διείσδυση στο υπόστρωμα, όχι αιμολυτικές, ιριδίζουσες, όχι γαλακτωματοποιήσιμες αποικίες
Άγαρ με εκχύλισμα καρδιάς και εγκεφάλου με 5% αίμα προβάτου	37 °C, 5% CO <sub>2</sub> υψηλή υγρασία	Όπως στο άγαρ τρυπτόνης-σόγιας
Αιματούχο άγαρ με 5% αίμα προβάτου	37 °C, 3% CO <sub>2</sub>	Απουσία ανάπτυξης
McConkey άγαρ	37 °C	Απουσία ανάπτυξης

Έχει ανακαλυφθεί πληθώρα ειδών *Bartonella*, τουλάχιστον 45, ιδιαίτερα μετά την καθιέρωση των μοριακών τεχνικών 16S Next Generation Sequencing (16S NGS) και Whole Genome Sequencing (WGS)<sup>21</sup> (Πίνακας 2).

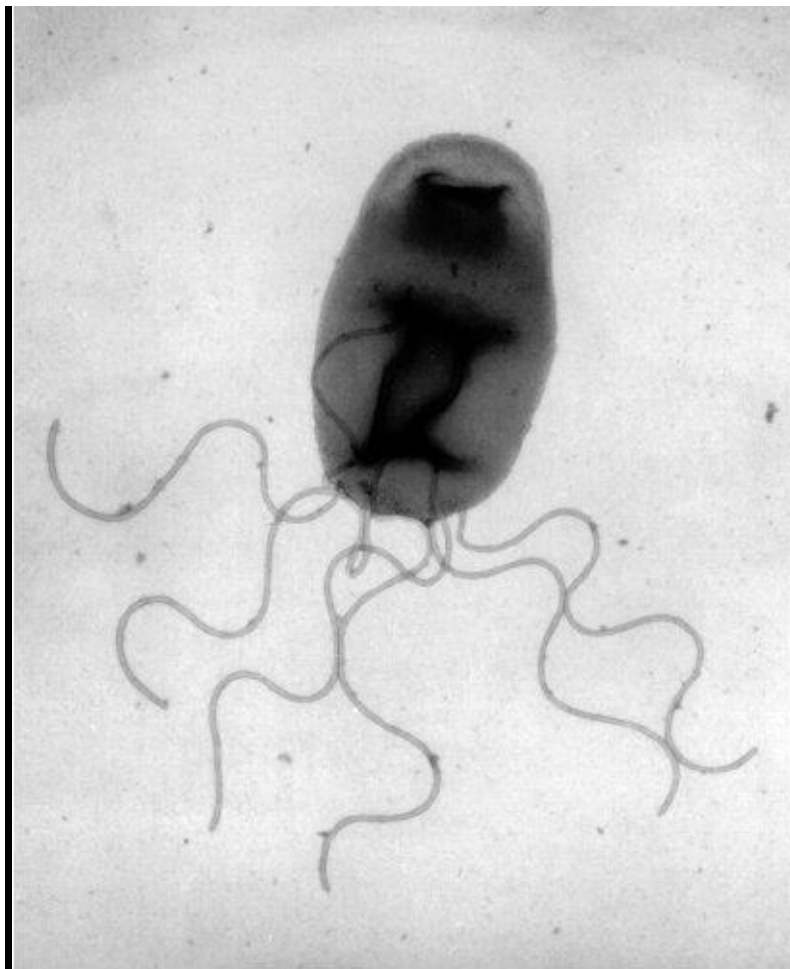
**Πίνακας 2** Γνωστά είδη *Bartonella* spp., κύριοι ξενιστές και παθογόνος δράση στον άνθρωπο. (Πηγή: Okaro et al. 2017, τροποποιημένο).

Είδη <i>Bartonella</i>	Ξενιστές	Ανθρώπινη νόσος που συσχετίζεται
<i>B. acomydis</i>	Τρωκτικά ( <i>Acomys russatus</i> )	
<i>B. alsatica</i>	Κόνικλος	Ενδοκαρδίτιδα
<i>B. ancashensis</i>	Άνθρωπος	Verruga peruana
<i>B. apis</i>	Μέλισσα	
<i>B. australis</i>	Καγκουρώ	
<i>B. bacilliformis</i>	Άνθρωπος	Πυρετός Oroya, verruga peruana, νόσος του Carrion
<i>B. birtlesii</i>	Ποντικός	
<i>B. bovis</i>	Αγελάδα	
<i>B. callosciuri</i>	Σκίουρος	
<i>B. capreoli</i>	Ελάφι	
<i>B. chomelii</i>	Βοοειδές	

<i>B. clarridgeiae</i>	Γάτα	Λυμφαδενοπάθεια, πυρετός, βλατίδες, νόσος εξ αμυχών γαλής
<i>B. coopersplainsensis</i>	Αρουραίος	
<i>B. doshiae</i>	Τυφλοπόντικας	
<i>B. dromedarii</i>	Καμήλα	
<i>B. elizabethae</i>	Αρουραίος	Ενδοκαρδίτιδα, νευρορετινίτιδα
<i>B. florenciae</i>	Ποντικός	
<i>B. fuyuanensis</i>	Ποντικός	
<i>B. grahamii</i>	Τρωκτικά, τυφλοπόντικας	Νευρορετινίτιδα, νόσος εξ αμυχών γαλής
<i>B. heixiaziensis</i>	Τυφλοπόντικας	
<i>B. henselae</i>	Γάτα	Νόσος εξ αμυχών γαλής, ενδοκαρδίτις, βακτηριακή αγγειομάτωση, βακτηριαμία
<i>B. jaculi</i>	Τρωκτικά ( <i>Jaculus orientalis</i> )	
<i>B. japonica</i>	Ποντικός	
<i>B. koehlerae</i>	Γάτα	Ενδοκαρδίτιδα
<i>B. koehlerae</i> subsp. <i>bothieri</i>	Αγριόγατα	
<i>B. koehlerae</i> subsp. <i>boulouisii</i>	Λιοντάρι του βουνού	
<i>B. mayotimonensis</i>	Νυχτερίδα	Ενδοκαρδίτιδα
<i>B. melophagi</i>	Πρόβατο	
<i>B. naantaliensis</i>	Νυχτερίδα	
<i>B. peromysci</i>	Ποντικός	
<i>B. pachyuromydis</i>	Τρωκτικά ( <i>Pachyuromys duprasi</i> )	
<i>B. phoceensis</i>	Αρουραίος	
<i>B. queenslandensis</i>	Αρουραίος	
<i>B. quintana</i>	Άνθρωπος	Πυρετός των χαρακωμάτων, ενδοκαρδίτις, βακτηριαμία, βακτηριακή αγγειομάτωση
<i>B. rattaaustraliani</i>	Αρουραίος	
<i>B. rattimassiliensis</i>	Αρουραίος	
<i>B. rochalimae</i>	Αλεπού, ρακούν, κογιότ	Βακτηριαμία, σπληνομεγαλία
<i>B. silvatica</i>	Ποντικός	
<i>B. schoenbuchensis</i>	Ελάφι	
<i>B. senegalensis</i>	Κρότωνας	
<i>B. talpae</i>	Τυφλοπόντικας	
<i>B. tamiiae</i>	Τρωκτικά, άνθρωπος	Πυρετός
<i>B. taylorii</i>	Αρουραίος	
<i>B. tribocorum</i>	Αρουραίος	

<i>B. vinsonii</i> subsp. <i>arupensis</i>	Ποντικός	Ενδοκαρδίτιδα
<i>B. vinsonii</i> subsp. <i>berkhoffii</i>	Σκύλος, κογιότ	Ενδοκαρδίτιδα
<i>B. vinsonii</i> subsp. <i>vinsonii</i>	Τυφλοπόντικας	
<i>B. vinsonii</i> subsp. <i>yucatanensis</i>	Τρωκτικά	
<i>B. weissii</i>	Γάτα	
<i>B. washoensis</i>	Σκύλος	

Οι *B. bacilliformis*, *B. clarridgeiae*, *B. rochalimae* και *B. schoenbuchii* έχουν πολικά μαστίγια και είναι ιδιαίτερα κινητικές<sup>21 23 27</sup> (Εικόνα 1). Ωστόσο κάποια περιορισμένη κινητικότητα, έστω και χωρίς την παρουσία μαστιγίου, έχει περιγραφεί και σε άλλα είδη όπως στην *B. henselae* όταν βρίσκεται σε υγρά μέσα, που έχει αποδοθεί στην παρουσία εξωτερικών τριχιδίων<sup>28</sup>.



**Εικόνα 1** Μαστίγια (flagellae) σε *Bartonella clarridgeiae*. Παρόμοια μαστίγια εμφανίζονται και σε άλλες *Bartonella* (Πηγή: Harms & Dehio 2007)



Ένα από τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά της *Bartonella spp.* είναι ότι διαφεύγει από το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή παραμένοντας για μακρό διάστημα, μπορεί και επί πολλά έτη, κατά κύριο λόγο εντός των ενδοθηλιακών κυτάρων του εσωτερικού τοιχώματος των αγγείων, όπου δημιουργεί μία χρόνια υποκλινική φλεγμονή, ή εντός των ερυθρών αιμοσφαιρίων.

Η αναγνώριση των παθογόνων από το ανοσοποιητικό σύστημα γίνεται μέσω παθογενετικών μοριακών μοτίβων (Pathogen Associated Molecular Patterns, PAMPs), διαφορετικών για κάθε παθογόνο. Υποδοχείς αναγνώρισης τέτοιων μοτίβων βρίσκονται στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος και σε αυτούς συμπεριλαμβάνονται οι διαμεμβρανικοί πρωτεϊνικοί υποδοχείς τύπου Toll (Toll-like receptor, TLR). Κατά την πρωτολοίμωξη με *Bartonella spp.* τα κύτταρα του ανοσοποιητικού αδυνατούν να αναγνωρίσουν τα βακτήρια ως εισβολείς διότι δεν μπορούν να ταυτοποιήσουν τον βλεννοπολυσακχαρίτη της κυτταρικής μεμβράνης του βακτηρίου ως PAMP λόγω της μειωμένης ενδοτοξικότητας που εμφανίζει<sup>29</sup>.

Τα διάφορα είδη *Bartonella* χρησιμοποιούν πρόσθετους μηχανισμούς μείωσης της αντίδρασης του ανοσοποιητικού συστήματος.

Η *B. quintana* διεγείρει την παραγωγή ιντερλευκίνης 10 (IL-10) που καταστέλλει τους παράγοντες φλεγμονής και διαθέτει μηχανισμούς μείωσης της δράσης του TLR-4<sup>30</sup>.

Η *B. bacilliformis* έχει μια χημική δομή στο μαστίγιό της (flagella) με τέτοια σύνθεση αμινοξέων που το βοηθά να μη γίνεται αντιληπτό από το ανοσοποιητικό σύστημα<sup>31</sup>.

Έτσι, μετά το στάδιο της βακτηριαιμίας, κατά το πιθανότερο τα βακτήρια εγκαθίστανται στα κύτταρα του ενδοθηλίου των αγγείων, και δεν ανευρίσκονται πια ελεύθερα στο αίμα. Εκεί διαιρούνται με βραδύ ρυθμό και κατά διαστήματα απελευθερώνονται στο αίμα (seeding) όπως έχει περιγραφεί σε ορισμένα ζωικά μοντέλα<sup>32,33</sup>.

Το ενδοθήλιο των αγγείων θεωρείται ο κύριος και κοινός ιστός τροπισμού για όλα τα είδη *Bartonella* και όλους τους ξενιστές-θηλαστικά του βακτηρίου<sup>33</sup>, πρέπει ωστόσο να αναφερθεί ότι δεν έχει διαπιστωθεί αυτή η εντόπιση in vivo<sup>34</sup>. Άλλος ιστός τροπισμού είναι τα ερυθροκύτταρα, στο εσωτερικό των οποίων παρατηρείται επίμονη αποίκιση<sup>1,35</sup> Επιπλέον και αρχέγονα κύτταρα του μυελού των οστών (progenitor cells) έχουν προταθεί ως ιστός καταφυγίου του βακτηρίου<sup>36</sup>.

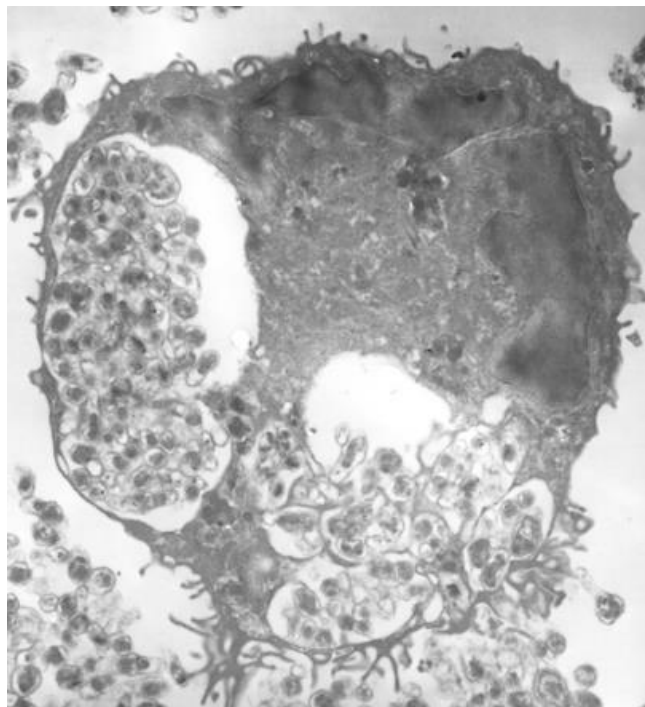
Ένα στοιχείο που ενισχύει τη θεωρία της ενδοκυτταρικής in vivo εντόπισης είναι η υπερπλασία των κυττάρων του ενδοθηλίου με χαρακτηριστικές νεοπλασίες υπό μορφή όγκων (*Verruga peruana*) στην προσβολή από *B. bacilliformis* που έχει μελετηθεί in vivo<sup>37</sup> και in vitro<sup>38</sup>.

Μια θεωρία υποστηρίζει ότι τα βακτήρια απαντώνται συσσωματωμένα υπό μορφή εξωκυτταρικής βιομεμβράνης (biofilm) σε θέσεις προτίμησης, προστατευμένα κατά αυτόν τον τρόπο από το ανοσοποιητικό σύστημα και από εκεί διασπείρονται στο αίμα κατά διαλείποντα

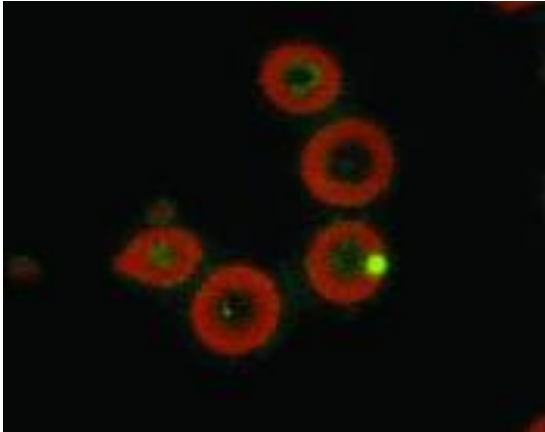
τρόπο. Τέτοιες βιομεμβράνες έχουν βρεθεί σε δείγματα από ασθενείς με νόσο εξ ονύχων γαλής<sup>39</sup> και βακτηριακή αγγειωμάτωση<sup>40</sup> ενώ έχουν περιγραφεί και σε πειραματικά ζωικά μοντέλα<sup>41</sup>.

Η εισβολή της *B. henselae* στα κύτταρα του ενδοθηλίου έχει περιγραφεί in vitro και έχει συνδεθεί με μηχανισμούς που σχετίζονται ή όχι με το σύστημα VirB/VirD4 (T4SS). Το σύστημα αυτό είναι ένα από τα πολλά συζευκτικά / εκκριτικά συστήματα των βακτηρίων που χωροταξικά βρίσκεται μεταξύ του κυτταροπλάσματος και της εξωτερικής μεμβράνης του βακτηρίου, και είναι δυνατό να μεταφέρει πρωτεΐνες ή γενετικό υλικό διαμέσου των παρεμβαλλόμενων μεμβρανών, από το βακτήριο σε ένα άλλο βακτήριο ή σε κύτταρο ξενιστή. Η μεταφορά γίνεται μέσω ενός σωληνωτού τριχιδίου (pilus), το εκτεταμένο τμήμα του οποίου αποτελείται κυρίως από πρωτεΐνες της κλάσης VirB.

Χρησιμοποιώντας κατάλληλους μηχανισμούς τα βακτήρια (*B. henselae*) δημιουργούν ένα συσσωμάτωμα (invasome) στην επιφάνεια του ενδοθηλιακού κυττάρου. Το συσσωμάτωμα είναι αποτέλεσμα της προσκόλλησης του βακτηρίου στην κυτταρική μεμβράνη του κυττάρου ξενιστή, του πολλαπλασιασμού του και της εκκρίσεως ορισμένων πρωτεϊνών. Το συσσωμάτωμα στο τέλος εγκολπώνεται από το κύτταρο ξενιστή<sup>42</sup> (Εικόνες 2, 3).



**Εικόνα 2** Φωτογραφία με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (X 12.000). Συσσωματώματα (invasomes) *B. henselae* εντός ενδοθηλιακού κυττάρου (Πηγή: Okaro et al. 2017)



**Εικόνα 3** Ενδοερυθροκυτταρική εντόπιση *Bartonella quintana* σεσημασμένη με φθορίζοντα αντισώματα (IFA) (Πηγή: Foucault et al. 2006)

Η ιντεγκρίνη β1, μια διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη, τροποποιείται μέσω της επίδρασης του βακτηρίου και με τη σειρά της ενεργοποιεί την F-ακτίνη, ενδοκυτταρική πρωτεΐνη υπό μορφή μικρονηματίων από πολυμερισμένη ακτίνη, η οποία στη συνέχεια διευκολύνει την ολοκλήρωση της διείσδυσης του συσσωματώματος στο ενδοθηλιακό κύτταρο<sup>43</sup>. Όμως και το T4SS έχει ως αποτέλεσμα την έκκριση ορισμένων πρωτεϊνών (*Bartonella* effector proteins, Beps, BepA-G) που τροποποιούν τη συμπεριφορά του ενδοθηλιακού κυττάρου και τη διαδικασία πρόσληψης του συσσωματώματος<sup>44 45</sup>.

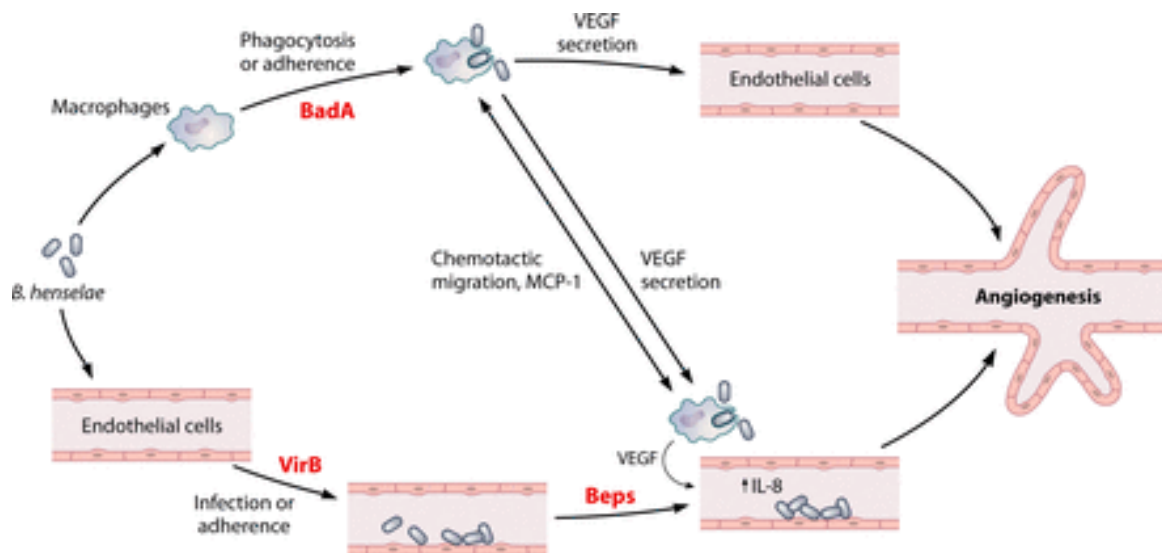
Το αποτέλεσμα της παρουσίας του βακτηρίου είναι μία αντίδραση του ενδοθηλίου με χαρακτηριστικά υπερπλασίας και στοιχεία αγγειογένεσης η οποία παρατηρείται και στα τρία είδη με τη πιο αναγνωρισμένη παθογονικότητα για τον άνθρωπο, τα *B. henselae*, *B. bacilliformis* και *B. quintana*. Η αγγειογένεση που παρατηρείται στη *B. henselae* προκαλείται λόγω της παραγωγής του ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (vascular endothelial growth factor - VEGF) που προκαλεί έντονη μιτογόνο δράση, πολλαπλασιασμό των κυττάρων και μείωση της απόπτωσης, ενώ ο ίδιος παράγοντας ανευρίσκεται και σε αγγειογένεση που σχετίζεται με νεοπλασίες. Η παραγωγή αυτού του παράγοντα έχει περιγραφεί ότι σχετίζεται με ενεργοποίηση μέσω της τριμερούς αυτομεταφερόμενης προσκολλητίνης (Trimeric Autotransporter Adhesin - TAA), που ονομάζεται και προσκολλητίνη A της *Bartonella* (*Bartonella* adhesin A - BadA), του επαγόμενου από την υποξία μεταγραφικού παράγοντα (hypoxia-inducible factor, Hif-1)<sup>46</sup>. Ο Hif-1 είναι ένας παράγοντας που συνδεέεται στο DNA του κυττάρου και ενεργοποιεί πολλά γονίδια που συνδέονται με την αντίδραση προσαρμογής σε συνθήκες υποξίας. Επιπλέον από την *B. henselae* έχει περιγραφεί επίδραση στη δραστηριότητα των πρόδρομων ενδοθηλιακών κυττάρων (endothelial progenitor cell) που οδηγεί επίσης σε υπερπλασία.

Η *B. bacilliformis* φαίνεται ότι προκαλεί την υπερπλασία του ενδοθηλίου τόσο σε κλινικά δείγματα όσο και σε *in vitro* μελέτες.

Στην *B. quintana* παρόμοια αγγειογενετική δράση επιτυγχάνεται μέσω των προσκολλητικών πρωτεϊνών της εξωτερικής μεμβράνης πολυμεταβλητής έκφρασης (variably expressed outer membrane proteins -Vomps) οι οποίες φαίνεται ότι σχετίζονται με την ικανότητα προσκόλλησης στο ενδοθηλιακό κύτταρο<sup>47</sup> αν και έχει διατυπωθεί ότι έχουν ως αποτέλεσμα μόνο την υπερπλασία του ενδοθηλίου<sup>48</sup>. Παράλληλα με την προδιάθεση για υπερπλασία, εκδηλώνεται και μία αντι-αποπτωτική επίδραση μέσω των Beps πρωτεϊνών που παράγει το βακτήριο που διακινούνται μέσω του συστήματος T4SS και έτσι τουλάχιστον όσο αφορά τη *B. henselae*, φαίνεται ότι και οι δύο μηχανισμοί, (T4SS, BadA) συντελούν στην αγγειογενετική δράση.

Στη *B. bacilliformis*, ο μηχανισμός T4SS φαίνεται να απουσιάζει ενώ δεν έχουν καταγραφεί οι ίδιες Beps με τη *B. henselae*, υπάρχουν όμως ενδείξεις ότι διαφορετικοί μηχανισμοί τελικά ενεργοποιούν την BadA και προκαλούν την πολύ ισχυρή μιτωτική δράση που οδηγεί στη δημιουργία ενδοθηλιακών νεοπλασμάτων, χαρακτηριστικών για αυτό το είδος *Bartonella*. Σε *in vitro* δοκιμές, διαπιστώθηκε συσχέτιση της δραστηριότητας της πρωτεΐνης GroEL της *B. bacilliformis* (κλάση σαπερονινών) με την ενδοθηλιακή αγγειογένεση.

Το αγγειογενετικό μοντέλο της *B. henselae* σύμφωνα με τους Resto-Ruiz et al. (2002)<sup>49</sup> φαίνεται στην **Εικόνα 4**.



**Εικόνα 4** Αγγειογενετικό μοντέλο για *B. henselae*. Αλληλεπίδραση VirB/VirD4 (T4SS), Beps και BadA (Πηγή: Resto-Ruiz et al. 2002)

Κάθε βακτήριο μεταφέρει παράγοντες λοιμικότητας που έχουν διαμορφωθεί μέσω της φυσικής εξέλιξης για την επιτυχή επιβίωσή του. Παρακάτω περιγράφονται αναλυτικά οι παράγοντες λοιμικότητας της *Bartonella* spp.

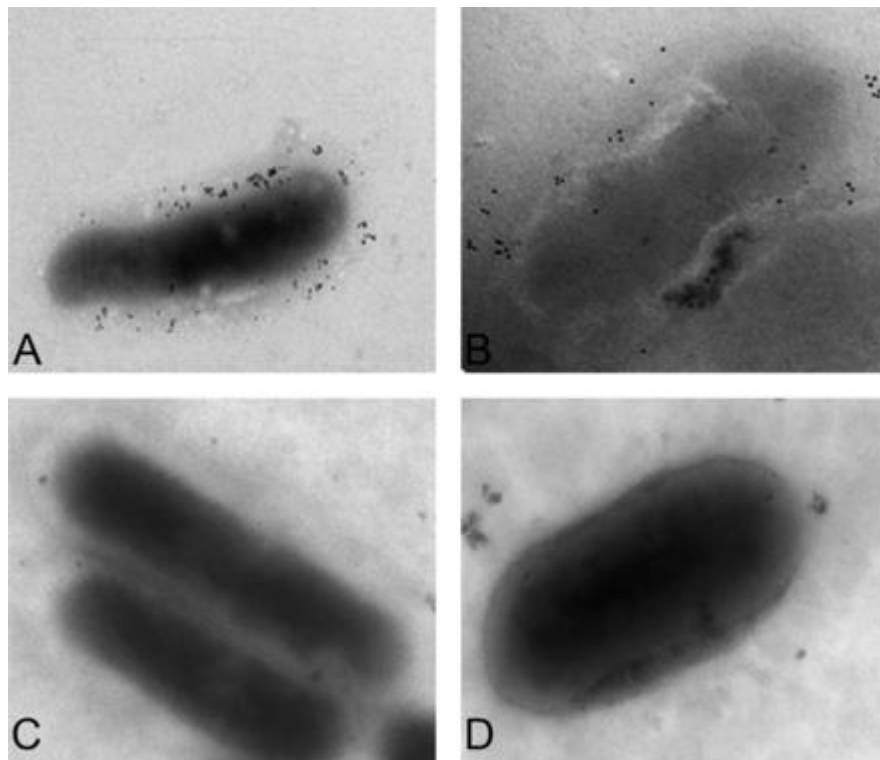
#### **Τριμερείς αυτομεταφερόμενες προσκολλητίνες**

Στην *Bartonella* spp. είναι οι τριμερείς αυτομεταφερόμενες προσκολλητίνες και το T4SS. Οι TAAs είναι διαφορετικές για κάθε είδος *Bartonella* spp. και εκφράζονται με τα αντίστοιχα γονίδια: BadA, Vomps, και πρωτεΐνες επαναλήψεων της *Bartonella* (Brps)<sup>50 51 52</sup>. Θεωρούνται μέρος του τύπου V εκκριτικού συστήματος των βακτηρίων (T5SS).

- **Προσκολλητίνη A της *Bartonella* (BadA):** είναι μεγέθος περίπου 328 kDA και βρίσκεται υπό μορφή νημάτων, μέχρι 240 nm, προεκβάλλει από την επιφάνεια της *B. henselae* και προάγει την προσκόλληση τόσο σε πρωτεΐνες του εξωκυττάριου χώρου όσο και στην επιφάνεια του ενδοθηλιακού κυττάρου (**Εικόνα 5**). Τέτοιες, «προσκολλητικού τύπου» πρωτεΐνες, ανευρίσκονται και σε άλλα Gram-αρνητικά βακτήρια, όπως στα είδη *Yersinia* και *Neisseria*. Αυτά τα νημάτια (filaments) των TAAs έχουν δομή αποτελούμενη από κεφαλή, στέλεχος και μία βάση που παρέχει τη στήριξη της πρωτεΐνης στην μεμβράνη του κυττάρου μέσω ενός πόρου που συγκρατεί την κατασκευή και μέσω του οποίου διέρχονται οι εκλυόμενες πρωτεΐνες και DNA. Η BadA λόγω της σύνθεσης και της τρισδιάστατης μορφής της στο χώρο προστατεύει το βακτήριο από τη φαγοκυττάρωση ενώ ταυτόχρονα διεγείρει τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων μέσω ενεργοποίησης του Hif1. Ανάμεσα στα διάφορα στελέχη *B. henselae*, τόσο το μέγεθος της BadA παραλλάσσει, μάλλον λόγω του διαφορετικού μεγέθους του τμήματος του «βλαστού», όσο και η πυκνότητα που απαντάται στην επιφάνεια του βακτηρίου, τόσο που σε ορισμένα στελέχη είναι μη ανιχνεύσιμη (Berlin-1) ενώ σε άλλα ανευρίσκεται σε μεγάλη ποσότητα (Marseille). Η BadA, όπως περιγράφηκε σε in vivo πειράματα, έχει ουσιώδη ρόλο στον παθογενετικό μηχανισμό και την χαρακτηριστική αγγειοπερπλαστική και φλεγμονώδη αντίδραση των κυττάρων ξενιστών. Διαπιστώθηκε ότι μεταλλαγμένο στέλεχος *B. henselae* ( $\Delta$ badA) με απουσία BadA mRNA δεν εκδήλωσε παθολόγο in vivo δράση σε έμβryo zebra fish, σε αντίθεση με άγρια στελέχη του βακτηρίου<sup>53</sup>.
- **Προσκολλητικές πρωτεΐνες της εξωτερικής μεμβράνης πολυμεταβλητής έκφρασης:** είναι δομικά παρόμοιες με τις BadA (κεφαλή, βλαστός, άγκυρα) και με αντίστοιχη

δράση. Υπάρχει η VomprA, VomprB, VomprC και VomprD. Η κάθε μία από τις Vomprs θα λέγαμε ότι εξειδικεύεται, π.χ. η VomprA προάγει τη συσσωμάτωση των βακτηρίων ενώ η VomprC τη σύνδεση με το κολλαγόνο. Η γονιδιακή έκφραση που ελέγχει τις Vomprs ποικίλει ανάλογα με τις ανάγκες προσαρμογής στον οργανισμό του ξενιστή.

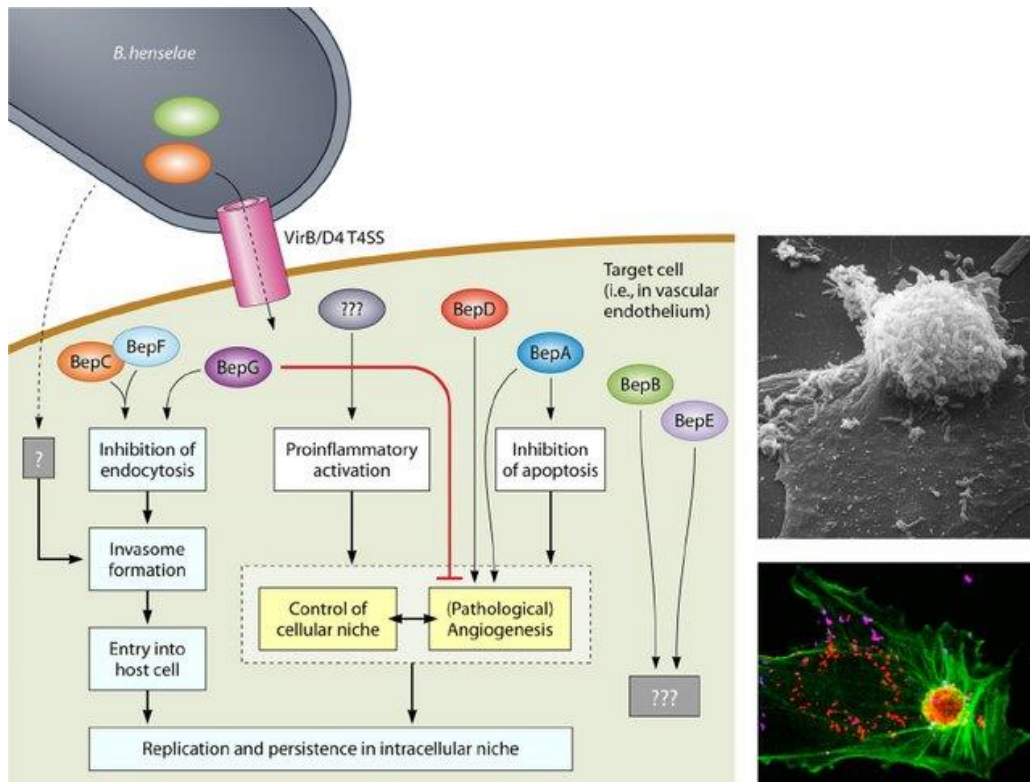
- **Πρωτεΐνες επαναλήψεως της *Bartonella***: χαρακτηρίζονται από την επαναληπτικότητα τμημάτων αποτελούμενων από αμινοξέα και το μεγάλο μέγεθος. Είναι άγνωστος ο ακριβής ρόλος αλλά φαίνεται πιθανό να έχουν αντίστοιχη λειτουργία με τις BadA και Vomprs. Αποτελούν σχετικά αδιερεύνητες πρωτεΐνες<sup>51</sup>.



**Εικόνα 5** Επιφανειακή εντόπιση BadA σε φυσικά στελέχη *Bartonella henselae* Houston-1 (A) και marseille (B) και σε μεταλλαγμένα χωρίς το γονίδιο που κωδικοποιεί την BadA, Houston-1 ΔbadA mutant (C) και Marseille ΔbadA mutant (D). Τα βακτήρια επώασησαν με αντισώματα anti-BadA από κόνικλο και στη συνέχεια με ορό αίγας κατά IgG κόνικλου. Η παρουσία BadA γίνεται ορατή μέσω κολλοειδών νανοσωματιδίων χρυσού που συνδέονται με τον ορό αίγας (Πηγή: Okaro et al. 2017).

### **Το σύστημα VirB/VirD4-T4SS**

Αυτό είναι ένα σύστημα που απαντάται και σε άλλα Gram αρνητικά βακτήρια όπως στα *Helicobacter* spp. *Coxiella* spp. και *Legionella* spp. Στην ουσία είναι ένα πολυπρωτεϊνικό σύστημα (VirB2-VirB11, VirD4) που σκοπό έχει να εισαγάγει τις Beps (BerA-BerG) στο κύτταρο στόχο<sup>1</sup> (Εικόνα 6).



**Εικόνα 6** VirB/D4 T4SS και Beps της *B. henselae*. Αριστερά: οι διαφορετικοί φαινότυποι λοιμκότητας του συστήματος VirB/D4 T4SS και οι Beps συνοψίζονται σε σχηματικά. Όλοι οι μηχανισμοί συγκλίνουν στην εδραίωση της ενδοκυτταρικής προσβολής και παραμονής. Δεξιά: invasome επί ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων όπως φαίνεται με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (επάνω) και συμβατικό μικροσκόπιο και ανοσοιστοχημική κατάδειξη (κάτω). Τα ενδοκυτταρικά βακτήρια εμφανίζονται ερυθρά, τα εξωκυτταρικά μωβ, και ο κυττοσκελετός από ακτίνη (actin cytoskeleton) πράσινος. Εντυπωσιακός ο σχηματισμός από ακτίνη γύρω από το invasome. (Πηγή: Harms & Dehio 2007)

Η *B. henselae* εισάγεται ενδοθηλιακά είτε με τον μηχανισμό VirB/VirD4 T4SS σαν συσσωμάτωμα, είτε με άλλο μηχανισμό ως μεμονωμένο βακτήριο<sup>54</sup>. Οι Beps προάγουν την είσοδο του συσσωματώματος στο κύτταρο ξενιστής. Η παρουσία του βακτηρίου ενεργοποιεί τον πυρηνικό παράγοντα ενίσχυσης της κ-ελαφράς αλυσίδας των ενεργοποιημένων Β κυττάρων (Nuclear Factor NF-κB) και άλλους παράγοντες φλεγμονής όπως τον παράγοντα νέκρωσης όγκων α (tumor necrosis factor alpha - TNF-α) διεγείροντας κατ' αυτόν τον τρόπο την έκκριση της ιντερλευκίνης-8 και τη δραστηριότητα του διακυτταρικού μορίου προσκόλλησης 1 (intercellular adhesion molecule 1 - ICAM-1) και της Ε-σελεκτίνης (E-selectin)<sup>21</sup>.

### Το σύστημα Trw-T4SS

Το Trw είναι ένας άλλος τύπος μεταφοράς του συστήματος T4SS που σχετίζεται με την εισβολή στα ερυθροκύτταρα και συγκεκριμένα με την προσκόλληση και είσοδο των βακτηρίων σε αυτά. Το σύστημα αυτό δημιουργεί πολλά τριχίδια που μάλλον δεν έχουν την δυνατότητα μεταφοράς παραγόντων αλλά προάγουν per se την προσκόλληση και την είσοδο στο εσωτερικό των αιμοσφαιρίων. Η παρουσία του Trw συστήματος έδειξε ότι συσχετίζεται με την απώλεια του μαστιγίου που ίσως αποτελεί σημαντικό δείκτη παθογενετικότητας<sup>55 56</sup>.

### **Hbps**

Η αίμη σε υψηλές συγκεντρώσεις ασκεί τοξικότητα έναντι των βακτηρίων. Ο ρόλος των συνδετικών, ενδοκυττάρων και ενδοπυρηνικών, ως προς την αιμίνη πρωτεϊνών (hemin binding proteins - Hbps) είναι να δεσμεύουν την αίμη και να ευνοούν την επιβίωση της *Bartonella* spp. μέσα στο πεπτικό σύστημα του αιματοφάγου εντόμου (π.χ. ψύλλος). Φαίνεται ότι επιπλέον έχουν ρόλο πρόσκτησης του σιδήρου από την αίμη και ακόμη βοηθούν στην προσκόλληση στο ερυθροκύτταρο. Ειδικά η HbpC μπορεί να έχει σημαντικό ρόλο στην επιβίωση του βακτηρίου εντός του αρθροπόδου γιατί επηρεάζεται από τη θερμοκρασία και από τη συγκέντρωση της αίμης και βρίσκεται σημαντικά αυξημένη στο πεπτικό σύστημα του εντόμου<sup>57</sup>.

### **Αιμοσυγκολλητίνες νηματοειδούς δομής**

Ακόμα ένας παράγοντας που ευνοεί τη συγκόλληση είναι οι συγκολλητίνες νηματοειδούς δομής (filamentous hemagglutinins - Fhas). Πρόκειται για πρωτεΐνες που ανήκουν στον τύπο V του συζευκτικού/εκκριτικού συστήματος (T5SS) αλλά δεν απαντώνται σε όλα τα είδη *Bartonella* spp. Fhas ανευρίσκονται και σε άλλα gram αρνητικά βακτήρια όπως *Bordetella pertussis*<sup>58</sup> και *Pasteurella multocida* όπου αποδεδειγμένα προάγουν την προσκόλληση των βακτηρίων στα κύτταρα<sup>59 60</sup>. Δεν έχει αποσαφηνισθεί όμως ο ακριβής τους ρόλος στην παθογένεση των *Bartonella* spp .

### **Άλλες συγκολλητίνες (adhesins) και πρωτεΐνες της εξωτερικής στιβάδας της μεμβράνης**

Διάφορες πρωτεΐνες εντοπισμένες στην εξωτερική στιβάδα της *B. henselae* (Outer membrane proteins – Omps) παρουσιάζουν ενδείξεις ότι συμμετέχουν στην προσκόλληση στο ενδοθηλιακό κύτταρο<sup>61</sup>. Χαρακτηριστική τέτοια είναι η Omp43 που η συγκολλητινογόνος της δράση έχει περιγραφεί και είναι ομόλογη ορισμένων πρωτεϊνών της οικογένειας Omp2 της *Brucella* spp. Στην *B. bacilliformis* έχουν επίσης εντοπιστεί τέτοιες πρωτεΐνες, ορισμένες από τις οποίες προάγουν την προσβολή των ερυθροκυττάρων. Επιπλέον, η *Bartonella* spp. φέρει και φλαζελλίνη



(flagellin) μια πρωτεΐνη που είναι ανθεκτική σε πρωτεολυτικά ένζυμα και προσδίδει κινητικότητα στο βακτήριο.

### **Ινβασίνες**

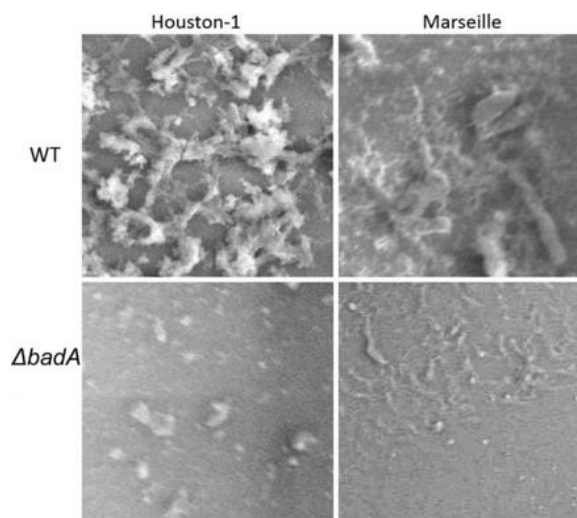
Αναφέρονται γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες (ινβασίνες) που σχετίζονται τόσο με την δυνατότητα προσβολής όσο και με τον παρασιτισμό των ερυθροκυττάρων από την *B. bacilliformis* (invasion associated locus A και B genes – ialA, ialB). Η ινβασίνη ialB, μία πρωτεΐνη εξωτερικής μεμβράνης, φαίνεται ότι είναι απαραίτητη και στην *B. henselae* για την ενδοερυθροκυτταρική βακτηριαίμια όπως και στην *B. bacilliformis*<sup>62</sup>. Η δράση μάλιστα της συγκεκριμένης πρωτεΐνης στην *B. bacilliformis* είναι θερμοεξαρτώμενη, εκφράζεται εντονότερα σε θερμοκρασία χαμηλότερη από 37°C. Η γονιδιακή ανάλυση των *B. elizabethae* και *B. grahamii* δείχνει επίσης την παρουσία ialB περιοχής.

### **Βιομεμβράνη**

Η βιομεμβράνη είναι ένα συσσωμάτωμα βακτηρίων που περιβάλλονται από μία μήτρα πολυμερούς ουσίας κατά τέτοιο τρόπο ου να είναι περισσότερο ανθεκτικά σε βλαπτικούς εξωτερικούς παράγοντες από ότι θα ήταν το κάθε βακτήριο ξεχωριστά. Η σύνδεση των βακτηρίων τόσο με την επιφάνεια- υπόστρωμα όσο και μεταξύ τους αλλά και με την ουσία που τα περιβάλλει, το εξωκυτταρικό πολυμερές (extracellular polymeric substance -EPS), γίνεται με τις συγκολλητίνες, πρωτεΐνες που βρίσκονται στην επιφάνεια των βακτηρίων.

Βακτήρια που είναι μέσα στο σύστημα της βιομεμβράνης επικοινωνούν μεταξύ τους μέσω ενός μηχανισμού διακυτταρικής χημικής επικοινωνίας (quorum sensing). Τα βακτήρια εντός της βιομεμβράνης επιβιώνουν καλύτερα τόσο από τους ανοσολογικούς μηχανισμούς του ξενιστή όσο και από βλαπτικούς παράγοντες (π.χ. αντιβιοτικά).

Μορφολογικά, η BadA εμφανίζεται σαν πολλαπλά μακριά τριχίδια που προεκβάλλουν από την επιφάνεια του βακτηρίου και φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στην δημιουργία της βιομεμβράνης<sup>63</sup>. Σε εργαστηριακά μεταλλαγμένα στελέχη όπου απουσίαζε η BadA, η δημιουργία βιομεμβράνης δεν ήταν δυνατή (**Εικόνα 7**).



**Εικόνα 7** Δημιουργία βιομεμβράνης από την *B. henselae*. Φωτογραφίες ηλεκτρονικού μικροσκοπίου για τα στελέχη Houston-1 και Marseille wild-type (WT) σε σύγκριση με μειωμένη συγκόλληση, συσσωμάτωση και εν τέλει, δημιουργία βιοφίλμ, από τα αντίστοιχα μεταλλαγμένα στελέχη με αποκλεισμό του BadA γονιδίου ( $\Delta badA$ ) (Πηγή: Okaro et al. 2017)

Η ικανότητα της *Bartonella* spp. να δημιουργεί βιομεμβράνες έχει δειχθεί τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* σε ασθενείς με βακτηριακή αγγειομάτωση (bacillary angiomatosis), Περουβιανά θηλώματα (verruca peruana), και νόσο εξ αμυχών γαλής (cat scratch disease). Η προσβολή των καρδιακών βαλβίδων πιθανότατα συνδέεται με την ικανότητα του βακτηρίου να δημιουργεί συσσωματώματα και βιομεμβράνες. Στην επιφάνεια κατεστραμμένων καρδιακών βαλβίδων με εκβλαστήσεις έχουν βρεθεί τέτοιες βιομεμβράνες *Bartonella* spp.<sup>64</sup>. Η αρχική αλλοίωση της βαλβίδας δημιουργεί το κατάλληλο υπόστρωμα για εδραίωση και περαιτέρω ανάπτυξη της βιομεμβράνης. Η διαλείπουσα απελευθέρωση βακτηρίων από τέτοια σημεία εντόπισης μπορεί να συντελεί στην εμφάνιση παροδικής βακτηριαιμίας ενώ η διατήρηση των σε καθεστώς βιομεμβράνης μπορεί να καθιστά τη λοίμωξη ανθεκτική στα αντιβιοτικά<sup>21</sup>.

Έχει περιγραφεί εργαστηριακή δημιουργία χρόνιας λοίμωξης σε ζωικό μοντέλο με διατήρηση της πρωτογενούς εστίας σε εξωκυτταρικά συσσωματώματα<sup>65</sup> ενισχύοντας μια εναλλακτική θεωρία ότι η χρόνια λοίμωξη δεν ενέχει ενδοκυτταρική παρουσία αλλά προέρχεται από βιομεμβράνες που αποτελούν εστίες παρατεταμένης παρουσίας και διασποράς βακτηρίων στο αίμα.

Η βιομεμβράνη ενδεχομένως συντελεί και στην αποτελεσματική επιβίωση και αποικισμό των βακτηρίων στους αρθρόποδους διαβιβαστές. Τέτοια βιομεμβράνη έχει προταθεί ως προστατευτικός μηχανισμός αυξημένης επιβίωσης στην περίπτωση διαφόρων ειδών *Bartonella* και ιδιαίτερα στη *B. henselae* και *B. quintana*, τόσο στο έντερο όσο και στα περιττώματα των

ψύλλων. Ιδιαίτερα όσο αφορά τα περιττώματα έχει προταθεί ότι αυξάνει τη διάρκεια μολυσματικότητας των περιττωμάτων μέχρι ότου αυτά να ενοφθαλμιστούν στον άνθρωπο μέσω των ονύχων της γάτας.

Επιπροσθέτως και ανεξαρτήτως της θεωρίας της βιομεμβράνης, έχει διατυπωθεί η υπόθεση ότι το βακτήριο διατηρείται επί μακρόν, προστατευμένο από το ανοσοποιητικό σύστημα εντός ορισμένων ιστών / κυττάρων κάτι που επιτρέπει παροδικές βακτηριαμίες ώστε να μολύνονται νέα ερυθροκύτταρα και να είναι δυνατή και η ολοκλήρωση του κύκλου μετάδοσης με την πρόσληψη από αιματοφάγο αρθρόποδο. Με βάση τα μέχρι τώρα δεδομένα φαίνεται ότι αυτόν τον ρόλο τον παίζουν τα κύτταρα του ενδοθηλίου<sup>66</sup> ή/και τα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα (CD34+ hematopoietic progenitor cells)<sup>67</sup> ή/και τα αρχέγονα ενδοθηλιακά κύτταρα (endothelial progenitor cells)<sup>68</sup> όπου στην τελευταία περίπτωση έχει προταθεί ότι η δυσμενής επίδραση στα κύτταρα αυτά οδηγεί σε μείωση του αριθμού και της λειτουργικότητάς τους και κατ' επέκταση στη δημιουργία αθηρωματώδων πλακών. Ωστόσο δεν είναι ξεκάθαρη η σχέση της *Bartonella* με τη δημιουργία αθηρωματώδους πλάκας. Η παρουσία των *Bartonella* spp. εντός των ενδοθηλιακών κυττάρων θα μπορούσε να εξηγήσει την ικανότητά τους να παραμένουν εν κρυπτώ διαφεύγοντας του ανοσοποιητικού συστήματος<sup>1</sup> και αποτελεί την επικρατέστερη θεωρία ωστόσο δεν γνωρίζουμε αν αυτό αντικατοπτρίζει την πραγματικότητα στην περίπτωση ανθρώπινης λοίμωξης ή αποτελεί εργαστηριακό artifact με περιορισμένη ή χωρίς κλινική σημασία.

Στον **Πίνακα 3** συνοψίζονται οι παράγοντες λοιμικότητας της *Bartonella* spp. σύμφωνα με τους Pulliainen & Dehio (2012)<sup>69</sup>.

**Πίνακας 3** Σύνοψη των παραγόντων παθογενετικότητας της *Bartonella* spp. (Πηγή: Pulliainen & Dehio 2012)

Παράγοντας	Ρόλος
LPS	Ασθενής TLR4 αγωνιστής
Μαστίγιο (flagella)	Ασθενής TLR5 αγωνιστής, σχετίζεται με βακτηριακή κινητικότητα και πιθανώς προσκόλληση-προσβολή ερυθροκυττάρων
BadA, BrpA, VompA, VompB, VompC, VompD	TAAs σχετίζονται με συσσωμάτωση, αντιφαγοκυτταρωτική ιδιότητα, προσκόλληση στο κύτταρο ξενιστή, ενδοερυθροκυτταρική βακτηριαμία για <i>B. tribocorum</i> (BadA), <i>B. quintana</i> (Vomps), και <i>B. birtlesii</i> (BrpA), σημαντικές για αρχική αποίκηση και για seeding στην αιματική κυκλοφορία

Παράγοντας	Ρόλος
Pap31	Συγκολλητική πρωτεΐνη (adhesin)
Hemolysin	<i>B. bacilliformis</i> , αιμολυτική δράση, συνδέεται με την ερυθροκυτταρική λύση στο τελικό στάδιο του πυρετού Oroya
VirB/VirD4-T4SS	Εκκριτικό σύστημα τύπου IV που διευκολύνει μέσω των BepB effector proteins (BepA-G) την είσοδο του invasome της <i>B. henselae</i> στα ερυθροκύτταρα και αποτρέπει την απόπτωση των ερυθροκυττάρων, επίσης απαραίτητο για την ενδοερυθροκυτταρική βακτηριαμία στα <i>B. tribocorum</i> και <i>B. birtlesii</i> , απαραίτο για την δημιουργία αρχικής εστίας-αποικίας και για την αποδέσμευση βακτηρίων (seeding) από την αρχική αποικία στην αιματική κυκλοφορία
Trw-T4SS	Εκκριτικό σύστημα τύπου IV που προάγει την προσκόλληση (adhesion) της <i>Bartonella</i> spp. στα ερυθροκύτταρα, απαραίτητη για την ενδοερυθροκυτταρική βακτηριαμία στα <i>B. tribocorum</i> και <i>B. birtlesii</i>
Deformin	Μικρό μόριο (~1.4 kDa) που δεσμεύει την αλβουμίνη, δημιουργεί αναδιπλώσεις και ανωμαλίες στην επιφάνεια των ερυθροκυττάρων (βαθουλώματα και αυλακώσεις -pits and trenches-) που μάλλον βοηθούν στην προσβολή των ερυθροκυττάρων από <i>Bartonella</i> spp.
IalA, IalB	Προάγουν την προσβολή των ερυθροκυττάρων, απαραίτητες για την ενδοερυθροκυτταρική βακτηριαμία στα <i>B. tribocorum</i> και <i>B. birtlesii</i>
HbpB-HbpE	Hemin-binding πρωτεΐνες, απαραίτητες για την ενδοερυθροκυτταρική βακτηριαμία στα <i>B. tribocorum</i> και <i>B. birtlesii</i>
HutA	Hemin receptor πρωτεΐνη, την ενδοερυθροκυτταρική βακτηριαμία στα <i>B. tribocorum</i> και <i>B. birtlesii</i>
Omp43	Πιθανώς συγκολλητική δράση στα ερυθροκύτταρα

Τα *B. quintana* και *B. henselae* έχουν αντίστοιχα 1143 και 1491 γονίδια εκ των οποίων τα 1116 κωδικοποιούν πρωτεΐνες. Το DNA της *B. quintana* και *B. henselae* έχουν τη μορφή ενός μεγάλου κυκλικού χρωμοσώματος με μέγεθος αντίστοιχα 1.581.384 bp και 1.931.047 bp, ενώ 301 γονίδια είναι μοναδικά για την *B. henselae* και μόνο 26 για την *B. quintana*<sup>70</sup>. Η *B. bacilliformis* έχει και αυτή ένα χρωμόσωμα μεγέθους 1.445.021 bp με 1164 γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες.

Η *B. koehlerae* διαθέτει γονιδίωμα ενδιάμεσου μεγέθους μεταξύ 1,7 και 1,8 εκατομμυρίων bp και όπως και η *B. quintana* διαφοροποιούνται από την *B. henselae* λόγω της απουσίας ορισμένων γονιδίων.

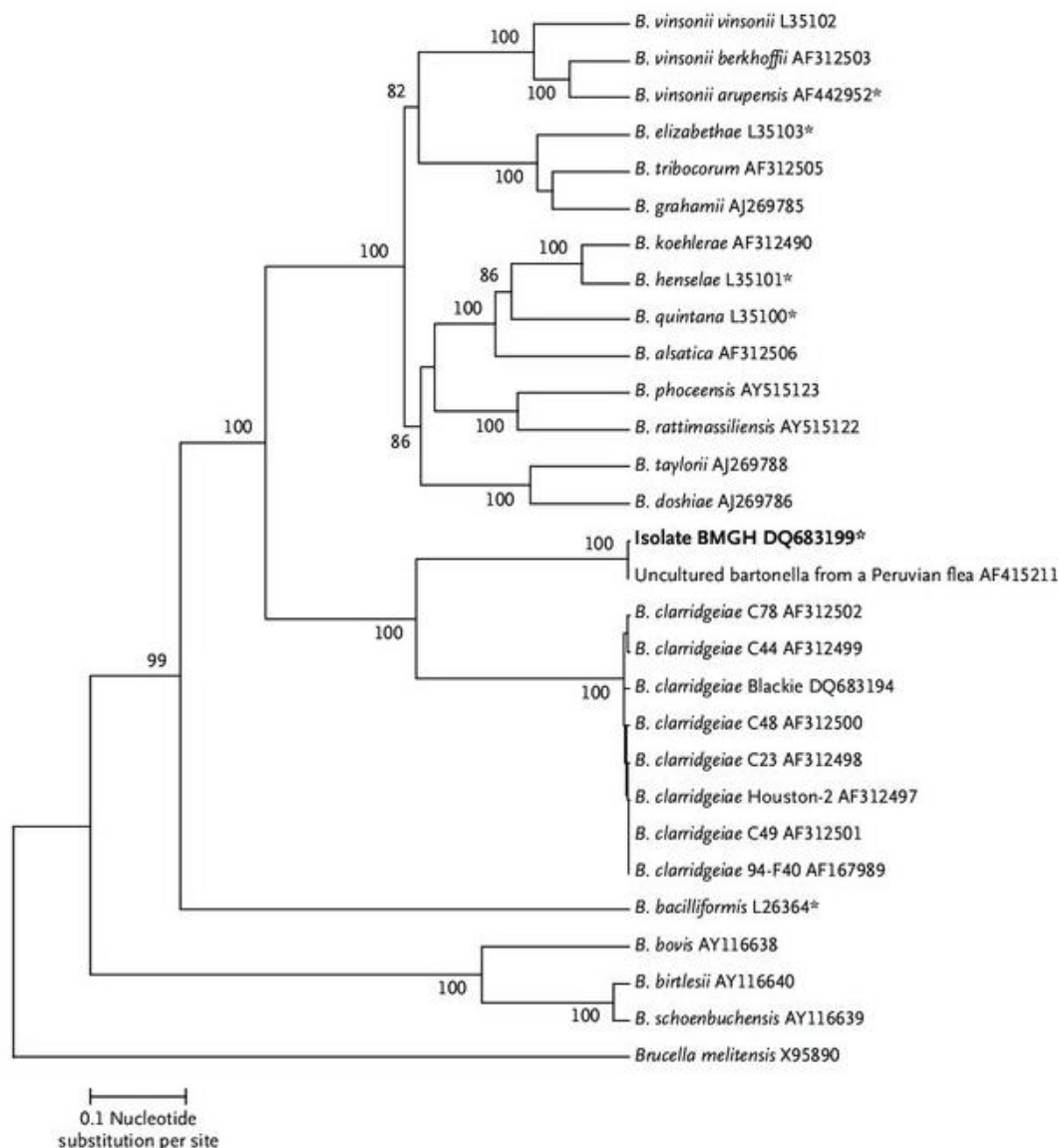
Η γενοτυπική ομολογία που εμφανίζουν τα είδη *Bartonella* είναι υψηλή (>98%)<sup>71</sup>. Στην **Εικόνα 8** φαίνεται το φυλογενετικό δένδρο ειδών *Bartonella* με βάση το 16S-23S της μη μεταγραφόμενης διαχωριστικής περιοχής (Intergenic Spacer Region). Τα καταχωρημένα γονιδιώματα *Bartonella* που βρίσκονται στη GenBank παρουσιάζονται στον **Πίνακα 4**.

**Πίνακας 4** Γονιδιώματα αναφοράς για είδη *Bartonella* στη GenBank

Γονιδίωμα αναφοράς (Reference genome)	RefSeq	INSDC <sup>1</sup>	Μέγεθος (Mb)	GC%	Γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες	rRNA	tRNA	Άλλα RNA	Γονίδια	Ψευδογονίδια
<i>Bartonella tribocorum</i> CIP 105476	<a href="#">NC_010161.1</a>	<a href="#">AM260525.1</a>	2,62	38,9	<a href="#">2091</a>	6	42	4	2299	156
<i>Bartonella elizabethae</i> 58174_F01	<a href="#">NZ_LR134527.1</a>	<a href="#">LR134527.1</a>	2,02	38,4	<a href="#">1633</a>	6	42	4	1754	69
<i>Bartonella clarridgeiae</i> 73	<a href="#">NC_014932.1</a>	<a href="#">FN645454.1</a>	1,52	35,7	<a href="#">1182</a>	6	41	4	1277	44
<i>Bartonella henselae</i> str. Houston-1	<a href="#">NC_005956.1</a>	<a href="#">BX897699.1</a>	1,93	38,2	<a href="#">1448</a>	7	43	4	1630	128
<i>Bartonella quintana</i> str. Toulouse	<a href="#">NC_005955.1</a>	<a href="#">BX897700.1</a>	1,58	38,8	<a href="#">1182</a>	6	42	4	1335	101
<i>Bartonella bacilliformis</i> KC583	<a href="#">NC_008783.1</a>	<a href="#">CP000524.1</a>	1,45	38,2	<a href="#">1164</a>	6	44	4	1256	38

<sup>1</sup> International Nucleotide Sequence Database Collaboration

Πηγή: NCBI <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (επίσκεψη στον δικτυακό τόπο: 16-05-2020).



**Εικόνα 8** Φυλογενετικό δένδρο με βάση το 16S-23S Intergenic Spacer Region σε είδη *Bartonella* με τονισμένο το νέο είδος *B. rochalimae* (BMGH) που περισσότερο συγγενεύει με τη *B. clarridgeiae*. Τα νούμερα στις διακλαδώσεις απεικονίζουν τα ποσοστά επί 1000 ανασυνδυασμένων δειγματοληψιών (bootstrap replications). Μόνο ποσοστά άνω του 80% αναφέρονται. Δίπλα στα είδη αναγράφονται τα Genbank accession numbers των νουκλεοτιδιακών αλληλουχιών. Η *Brucella melitensis* (Genbank accession X95890) χρησιμοποιήθηκε σαν outgroup. Τα είδη *Bartonella* που φέρουν αστερίσκο έχουν απομονωθεί από ανθρώπους (Πηγή: Ereemeeva et al. 2007).

## *Bartonella* spp.

### 1.5 Μοριακές μέθοδοι διάγνωσης

Η καλλιέργεια *Bartonella* spp. εμφανίζει υψηλή ειδικότητα αλλά χαμηλή ευαισθησία ενώ οι ειδικές απαιτήσεις και το αυξημένο χρονικό διάστημα επώασης έως και 6 εβδομάδες την

καθιστούν μη πρακτική για την άμεση διάγνωση, αλλά κυρίως για επιδημιολογική επιτήρηση και ερευνητικές μελέτες. Εκτός των ιδιόμορφων απαιτήσεων ανάπτυξης, τα διάφορα είδη αναπτύσσονται βέλτιστα σε διαφορετικές θερμοκρασίες (27°C έως 37°C)<sup>72</sup>.

Οι ορολογικές μέθοδοι, κυρίως ο έμμεσος ανοσοφθορισμός (Indirect Fluorescent Antibody, IFA), είναι σαφώς πιο πρακτικές από την απομόνωση, ωστόσο εμφανίζουν διαφορές τόσο μεταξύ των εμπορικών κιτς όσο και λόγω του υποκειμενικής αξιολόγησης της παρουσίας ανοσοφθορισμού κατά την μικροσκοπική εξέταση των αραιώσεων του ορού.

Οι μοριακές τεχνικές προτιμούνται για τον ταυτοποίηση του γένους *Bartonella* όσο και για τον διαχωρισμό των ειδών *Bartonella* μεταξύ τους, ωστόσο ένας συνδυασμός τεχνικών που περιλαμβάνουν μοριακό έλεγχο μαζί με καλλιέργεια ή/και ορολογικές δοκιμές αποτελούν την πιο αξιόπιστη διαγνωστική προσέγγιση<sup>72</sup>.

Τα διάφορα είδη *Bartonella* δεν διαφέρουν μεταξύ τους φαινοτυπικά παρά ίσως σε επίπεδο ηλεκτρονικής μικροσκόπησης κάτι που καθιστά τον γενετικό έλεγχο απαραίτητο για την ταυτοποίηση του είδους<sup>73</sup>. Θα πρέπει να ληφθούν υπόψη ορισμένα εμπόδια στην επιτυχή πραγματοποίηση της PCR όπως οι αναστολείς της πολυμεράσης (PCR inhibitors) που μπορεί να αφθονούν σε κλινικά δείγματα (ιστοί η αίμα)<sup>74</sup>. Για το λόγο αυτό πολλά κιτς εκχύλισης DNA περιέχουν εξουδετερωτές αυτών των αναστολέων. Επιπλέον μπορεί η ποσότητα βακτηρίου να είναι μικρή και να βρίσκεται στην περίπτωση δείγματος αίματος ενδοερυθροκυτταρικά ή αν πρόκειται για αρθρόποδο διαβιβαστή στο εντερικό του σύστημα και εν γένει στο εσωτερικό του εντόμου. Θα πρέπει να δοθεί ιδιαίτερη προσοχή επομένως στην επαρκή λύση του εξωσκελετού και των ποικίλων οργανικών δομών, με συνδυασμούς βιοχημικών και μηχανικών μεθόδων ή στην χρονική παράταση του σταδίου λύσης προκειμένου να απελευθερωθούν τα βακτήρια.

Ορισμένοι υποστηρίζουν ότι πριν το στάδιο της λύσης ειδικά όσο αφορά δείγματα αίματος, η παρεμβολή ενός σταδίου εμπλουτισμού σε υγρή καλλιέργεια με χρήση του *Bartonella* alpha-Proteobacteria growth medium (BAPGM) μπορεί να αυξήσει την πιθανότητα ανίχνευσης DNA<sup>75</sup>. Ειδικά σε δείγματα αρθροπόδων είναι σημαντικό να προηγείται της λύσης ένας εξωτερικός καθαρισμός των εντόμων ώστε να αποφευχθεί η επιμόλυνση του δείγματος με εξωγενές DNA και ενδεχομένως αναστολείς των ενζύμων της PCR. Το παραπάνω βεβαίως εξαρτάται και από τον σχεδιασμό της μελέτης καθώς σε ορισμένες επιζητείται και η διερεύνηση της βακτηριακής χλωρίδας της εξωτερικής επιφάνειας των αρθροπόδων.

Οι συμβατικές PCR είναι υψηλής ειδικότητας όμως έχουν το μειονέκτημα της χαμηλής ευαισθησίας κάτι που αντιμετωπίζεται με τη χρήση nested PCR ή qPCR. Οι qPCR είναι πολύ πιο ευαίσθητες όμως μπορεί να έχουν χαμηλότερη ειδικότητα λόγω του μικρού μεγέθους των προϊόντων πολλαπλασιασμού γιαυτό και πρέπει να πραγματοποιείται και δεύτερη επιβεβαιωτική qPCR που στοχεύει σε άλλη περιοχή του DNA ή συμβατική PCR που παράγει μεγαλύτερα προϊόντα πολλαπλασιασμού και έτσι είναι αυξημένης ειδικότητας.



Διάφορες περιοχές DNA έχουν χρησιμοποιηθεί ως στόχοι για την ανίχνευση μπαρτονελλών, ανάμεσά τους οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες είναι το γονίδιο της κιτρικής συνθάσης (*gltA*) και το γονίδιο της RNA polymerase b-subunit (*rpoB*) γιατί είναι δομικά γονίδια (housekeeping genes), ειδικά για το γένος, με υψηλή διακριτική ισχύ και πολλές σχετικές καταχωρήσεις (accessions) στην GenBank<sup>71</sup>.

Θα πρέπει να ληφθεί υπόψη ότι υπάρχει διαφορά στην μελέτη καλλιεργημάτων και άμεσων δειγμάτων. Στα τελευταία, οι εναρκτήριες αλληλουχίες μπορεί να είναι συμβατές με DNA είτε του ξενιστή είτε άλλων παρόντων στο δείγμα βακτηρίων με αποτέλεσμα να μειώνεται η ειδικότητα και να εμφανίζονται ψευδώς θετικά αποτελέσματα όπως π.χ. έχει περιγραφεί με ενίσχυση της ενδομεταγραφόμενης περιοχής του γονιδιώματος μεταξύ των 16S και 23S rRNA γονιδίων (Internal Transcribed Spacer, ITS) του σαπροφυτικού βακτηρίου *Mesorhizobium*<sup>76</sup>. Για το λόγο αυτό αφενός είναι σημαντικό να γίνεται sequencing στα παραγόμενα προϊόντα πολλαπλασιασμού για να συγκριθεί με τις αναμενόμενες αλληλουχίες και αφετέρου να χρησιμοποιούνται πολλαπλές PCR με διαφορετικά γονίδια στόχους<sup>72</sup>.

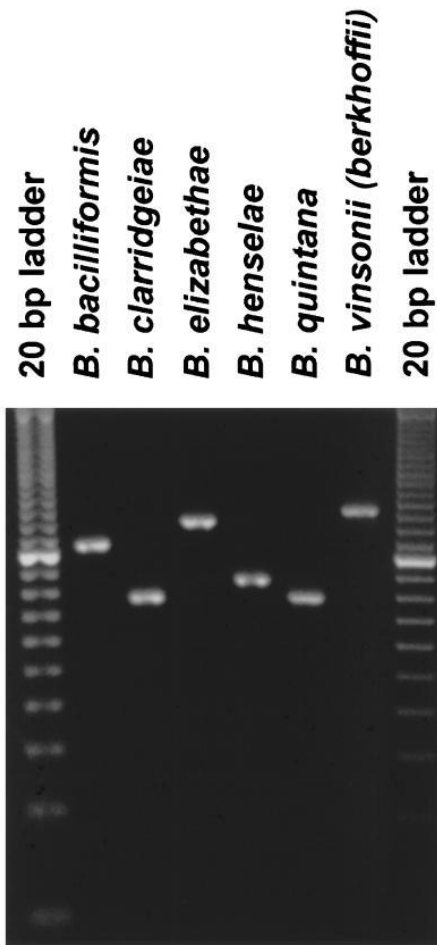
Ένα σημαντικό γονίδιο στόχος για διάκριση του γένους *Bartonella*., αν και με μικρή διακριτική δύναμη για τα είδη, είναι αυτό που κωδικοποιεί το 16S rRNA<sup>71</sup>.

Στον **Πίνακα 5** φαίνονται στόχοι στο DNA για διάκριση *Bartonella* σε επίπεδο γένους για καλλιεργήματα και άμεσα δείγματα.

**Πίνακας 5** Περιοχές στόχοι και αντίστοιχες εναρκτήριες αλληλουχίες/εναρκτήριες αλληλουχίες για την ανίχνευση *Bartonella* spp. σε καλλιεργήματα και σε άμεσα κλινικά ή περιβαλλοντικά δείγματα (Πηγή: Gutiérrez et al. 2017).

Γονιδιακοί στόχοι που ενδείκνυνται για καλλιεργήματα					
<i>Bartonella</i> locus	Σντμ.	Εναρκτήριες αλληλουχίες	Κατά προσέγγιση μέγεθος (bp)	Συμβατική ή Real Time PCR	Reference
Citrate synthase	<i>gltA</i>	443F and 1210R; Bhcs.781p and Bhcs.1137n	340–370	Συμβατική PCR	Norman et al. (1995); Birtles and Raoult (1996)
b subunit of the RNA polymerase	<i>rpoB</i>	1400F and 2300R	825	Συμβατική PCR	Renesto et al. (2001)
16S-23S Internal transcribed spacer	ITS	321s and 983as	621–704	Συμβατική PCR	Maggi et al. (2005)
16S ribosomal RNA gene	16S	p24E and p12B	280	Συμβατική PCR	Bergmans et al. (1995)
Riboflavin synthase	<i>ribC</i>	Barton-1 and Barton-2	588	Συμβατική PCR	Johnson et al. (2003)
NADH dehydrogenase gamma subunit	<i>nuoG</i>	F and R	346	Συμβατική PCR / Real Time PCR	Colborn et al. (2010)
Cell division protein 60 kDa Heat shock protein	<i>ftsZ</i> <i>groEL</i>	Bfp1 and Bfp2 Hs233 and Hs1630	900 720	Συμβατική PCR Συμβατική PCR	Zeaiter et al. (2002) Marston et al. (1999)
Γονιδιακοί στόχοι που ενδείκνυνται για άμεσα δείγματα, ανθρώπινα ή από αρθρόποδα					
mtRNA	<i>ssrA</i>	<i>ssrAF</i> and <i>ssrAR</i>	350	Real-time PCR	Diaz et al. (2012)
16S-23S Internal transcribed spacer	ITS	321s and H493as	200	Real-time PCR	Maggi et al. (2005); conditions for real-time PCR described in Gutiérrez et al. (2013)
b subunit of the RNA polymerase	<i>rpoB</i>	600F and 800R	200	Real-time PCR	Morick et al. (2009)

Ανάμεσα στις μεθόδους ταυτοποίησης είδους ξεχωριστή θέση έχει η κλασσική εργασία των Jensen et al. (2000)<sup>77</sup> όπου στοχεύεται η ιδιαίτερος μακρά σε σχέση με άλλα βακτήρια, ITS περιοχή μεταξύ των 16S-23S rRNA γονιδίων<sup>78</sup> της *Bartonella* spp. Από την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR προκύπτουν διαφορετικά μεγέθη προϊόντων πολλαπλασιασμού τα οποία αντιστοιχούν σε έξι από τα πιο βασικά παθογόνα για τον άνθρωπο είδη: *B. henselae*, *B. quintana*, *B. bacilliformis*, *B. elizabethae*, *B. clarridgeiae* και *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii* (Εικόνα 9).

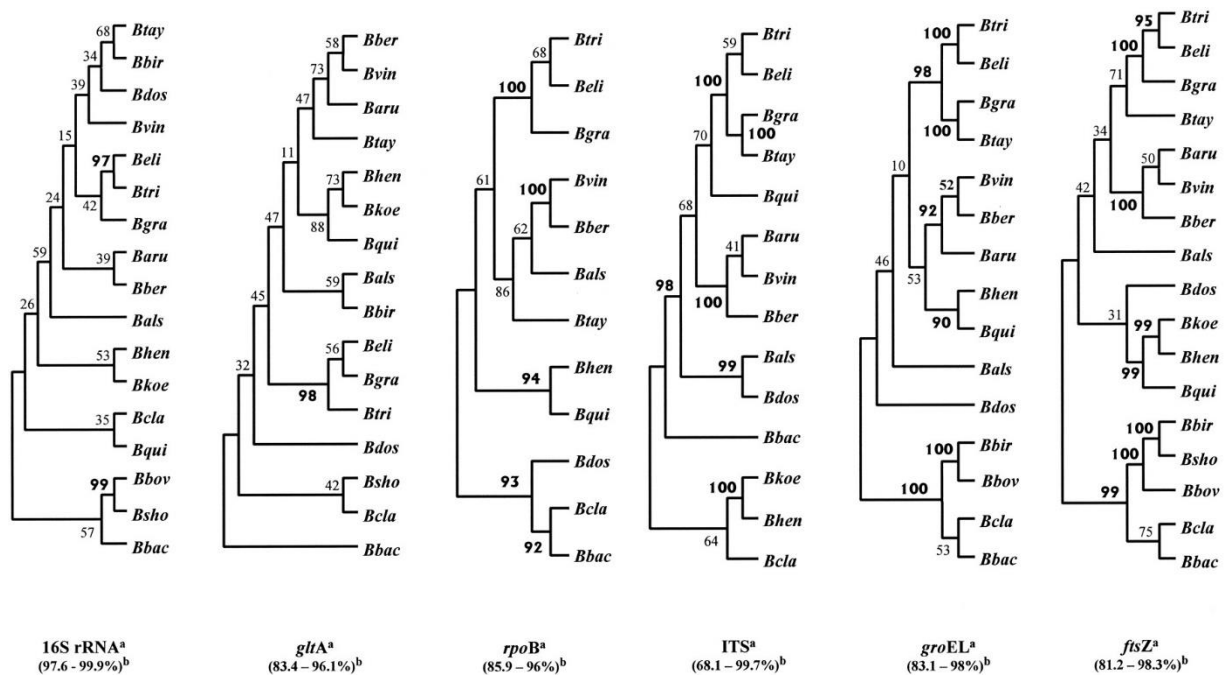


**Εικόνα 9** Ηλεκτροφόρηση σε 3% γελή αгарόζης προϊόντων PCR με στόχευση της ITS περιοχής σε δείγματα από καλλιέργηματα *B. bacilliformis*, *B. clarridgeiae*, *B. elizabethae*, *B. henselae*, *B. quintana* και *B. vinsonii* (*berkhoffii*) (Πηγή: Jensen et al. 2000).

Αρχικά αποδόθηκαν προϊόντα πολλαπλασιασμού μεγέθους 147 bp (*B. henselae*), 132 bp (*B. quintana*), 186 bp (*B. bacilliformis*) και 216 bp (*B. elizabethae*) όμως με τα αρχικά χρησιμοποιούμενες εναρκτήριες αλληλουχίες η περιγραφόμενη μέθοδος δεν κατόρθωσε να αποδώσει τα αναμενόμενα για την *B. clarridgeiae* και τη *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii*. Μέσω αλληλούχισης της 16S-23S ITS περιοχής αποκαλύφθηκε ότι σε αυτά τα είδη υπήρχαν διαφοροποιήσεις και τροποποιώντας ανάλογα τους εναρκτήριες αλληλουχίες και συγκεκριμένα χρησιμοποιώντας τα 5'-CTCTTTCTTCAGATGATGATCC-3' και 5'-AACCAACTGAGCTACAAGCCCT-3', παράχθηκαν προϊόντα πολλαπλασιασμού με τα εξής μεγέθη: 172 bp (*B. henselae*), 157 bp (*B. quintana*), 211 bp (*B. bacilliformis*), 241 bp (*B. elizabethae*), 154 bp (*B. clarridgeiae*) και 260 bp (*B. vinsonii* subsp. *berkhoffii*) και με μικρή τροποποίηση του μέσου ηλεκτροφόρησης (γέλη αгарόζης αυξημένης περιεκτικότητας 4,5%) ήταν όλα διακριτά μεταξύ τους με χρήση κλίμακας (ladder) διακριτικότητας 20-bp.

Παρόμοια λογική ταυτοποίησης είδους και χαρακτηρισμού γενοτύπων χρησιμοποιήθηκε με αλληλούχιση στα προϊόντα πολλαπλασιασμού με στόχο το γονίδιο της κιτρικής συνθάσης

(*gltA*)<sup>75</sup> ή άλλα γονίδια όπως το *ssrA*<sup>79</sup> ή το *ftsZ*<sup>73</sup>. Διαφορετικά φυλογενετικά δέντρα δημιουργούνται από τα αποτελέσματα του sequencing των παραγόμενων προϊόντων αναλόγως της περιοχής που στόχευαν οι εναρκτήριες αλληλουχίες (Εικόνα 10).

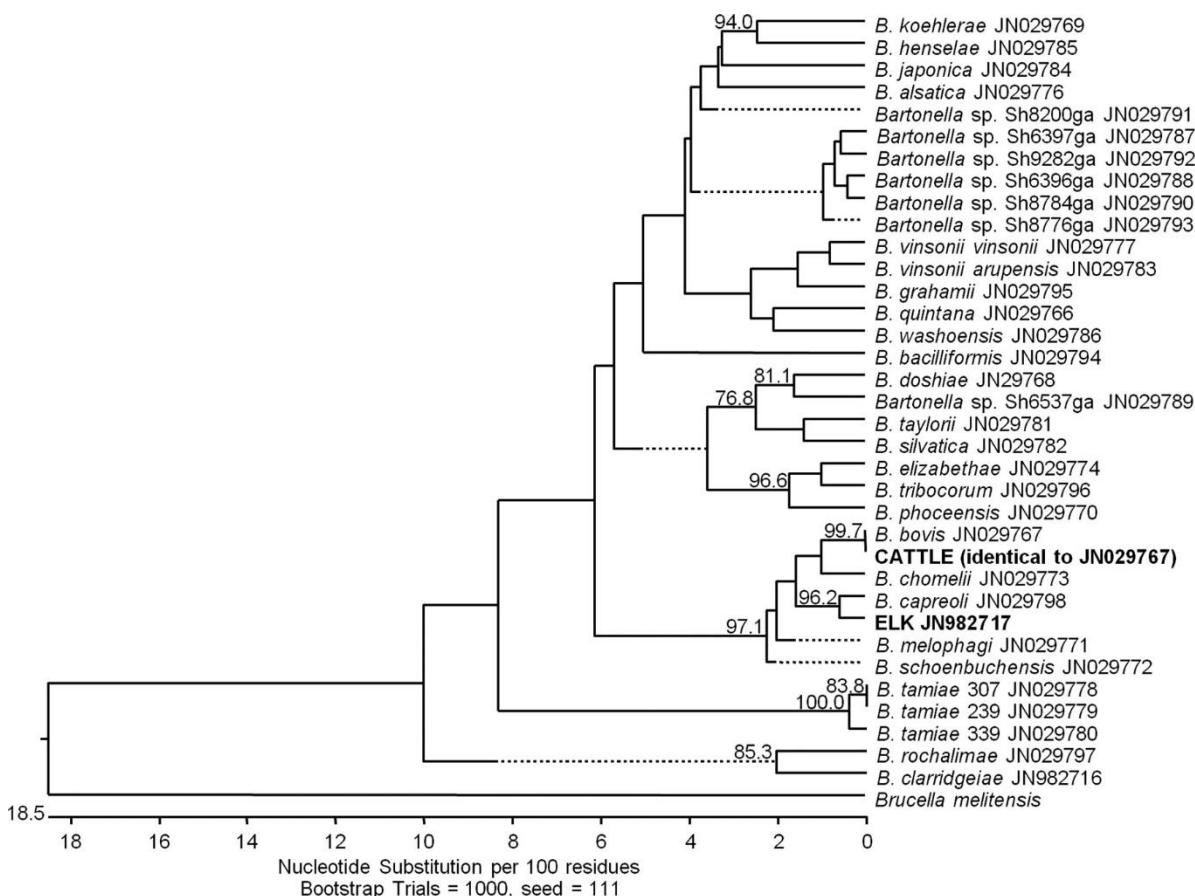


**Εικόνα 10** Σύγκριση φυλογενετικών δένδρων βασισμένα στο sequencing των PCR προϊόντων από 16S rDNA, *gltA*, *rpoB*, ITS, *groEL*, and *ftsZ*. Το bootstrapping έγινε με 100 pseudoreplicates και τιμές άνω του 90 είναι με έντονα νούμερα. Το γένος *Bartonella* υποδηλώνεται με το γράμμα B ενώ χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθες συντομεύσεις για τα είδη: ber=vinsonii subsp. berkhoffii/ vin=vinsonii subsp. vinsonii/ aru=vinsonii subsp. arupensis/ tri=tribocorum/ eli, elizabethae/ gra=grahamii/ tay=taylorii/ als=alsatica/ dos=doshiae/ hen=henselae/ qui=quintana/ koe=koehlerae/ cla=clarridgeiae/ bir=birtlesii/ sho=schoenbuchensis/ bac=bacilliformis/ bov=bovis (Πηγή: Zeaiter et al., 2002).

Ο La Scola πρότεινε ότι για να χαρακτηριστεί ένα βακτήριο ως νέο είδος *Bartonella* οι προϋποθέσεις θα πρέπει να περιλαμβάνουν δύο γονιδιακές αλληλουχίες, μια 327 βάσεων από το γονίδιο *gltA* καθώς και μια 825 βάσεων από το γονίδιο *rpoB* οι οποίες πρέπει να έχουν λιγότερο από 96.0% και 95.4% ομοιότητα από τα αναγνωρισμένα είδη<sup>70</sup>. Ωστόσο, σήμερα δεν υπάρχει κοινή παραδοχή ως προς το τι απαιτείται για να θεωρηθεί ένα στέλεχος *Bartonella* ως νέο είδος ή υποείδος.

Για την αναγνώριση ειδών *Bartonella* έχει περιγραφεί μία μέθοδος που εφαρμόστηκε σε άμεσα δείγματα και βασίζεται αρχικά στην στόχευση με qPCR του γονιδίου *ssrA* (γνωστό και ως transfer-mRNA, tmRNA) που περιλαμβάνει μια κοινή για το γένος περιοχή 301-bp και στη συνέχεια αλληλούχιση των παραγόμενων προϊόντων<sup>80</sup>. Σύμφωνα με τους συγγραφείς η μέθοδος αυτή μπορεί να διακρίνει όλα τα γνωστά είδη *Bartonella* και παρέχει φυλογενετικό διαχωρισμό

που συμβαδίζει με αυτόν που προκύπτει από την στόχευση και sequencing των προϊόντων του γονιδίου *gltA*, που αποτελεί συχνό στόχο για διαχωρισμό είδους με τις προϋπάρχουσες μεθόδους. Από την εφαρμογή της παραπάνω μεθοδολογίας προέκυψαν 34 διαφορετικά προϊόντα αλληλουχίσεων για το *ssrA* που κατατέθηκαν στην GenBank και αντιστοιχούν σε ισάριθμα είδη και στελέχη *Bartonella* spp. (Εικόνα 11).



**Εικόνα 11** Φυλογενετικό δένδρο με βάση τις *ssrA* ακολουθίες (sequences) για τα είδη *Bartonella*. Οι καταχωρήσεις στην GenBank (accessions) αναγράφονται δίπλα στα είδη (Πηγή: Diaz et al. 2012).

## *Bartonella* spp.

### 1.6 Ευαισθησία στα αντιβιοτικά

Η *Bartonella* spp. εμφανίζει *in vitro* ευαισθησία σε πολλά αντιβιοτικά όπως πενικιλίνη, κεφαλοσπορίνη, αμινογλυκοσίδες, χλωραμφενικόλη, τετρακυκλίνες, μακρολίδες, ριφαμπικίνη, φθοροκινολόνες και κοτριμοξαζόλη<sup>81</sup> (Πίνακας 6).

**Πίνακας 6** In vitro δράση αντιβιοτικών κατά *Bartonella* spp. Σντμ: MIC: Ελάχιστη Ανασταλτική Συγκέντρωση, Άγνωστο: δεν υπάρχουν δεδομένα, TMP-SMX: Τριμεθοπρίμη-σουλφαμεθοξαζόλη. Σημειώνεται ότι η επιλογή και η δοσολογία αντιβιοτικού δεν θα πρέπει να βασίζεται μόνο στη MIC γιατί η τελευταία δεν συμβαδίζει καλά με την in vivo δραστικότητα σε ασθενείς (Πηγή: Rolain et al. 2004).

Κλάση αντιβιοτικών & αντιβιοτικό	MIC (µg/ml)				
	<i>B. henselae</i>	<i>B. quintana</i>	<i>B. bacilliformis</i>	<i>B. vinsonii</i>	<i>B. elizabethae</i>
<b>Aminoglycosides</b>					
Amikacin	2-4	4-8	2-8	4	1
Gentamicin	0.12-0.25	0.12-2	1-2	0.5	0.12
Streptomycin	Άγνωστο	Άγνωστο	4	Άγνωστο	Άγνωστο
Tobramycin	0.5-1	0.5-4	2-4	2	0.25
<b>Cephalosporins</b>					
Cefotaxime	0.12-0.25	0.12-0.25	0.03-0.12	0.12	0.06
Cefotetan	0.25-0.5	0.12-0.5	2	1	1
Ceftazidime	0.25-0.5	0.25-0.5	0.12-0.25	0.25	0.5
Ceftriaxone	0.12-0.25	0.06-0.25	0.003-0.006	0.06	0.12
Cephalothin	8-16	8-16	4-8	16	8
<b>Macrolides</b>					
Azithromycin	0.006-0.015	0.006-0.03	0.015	0.015	0.006
Clarithromycin	0.006-0.03	0.006-0.03	0.015-0.03	0.03	0.015
Erythromycin	0.06-0.25	0.06-0.12	0.06	0.25	0.12
Roxithromycin	0.015-0.03	0.015-0.06	0.03	0.12	0.06
Telithromycin	0.003	0.006	0.015	Άγνωστο	Άγνωστο
<b>Penicillins</b>					
Amoxicillin	0.6-0.12	0.03-0.06	0.03-0.06	0.06	0.03

Κλάση αντιβιοτικών & αντιβιοτικό	MIC (µg/ml)				
	<i>B. henselae</i>	<i>B. quintana</i>	<i>B. bacilliformis</i>	<i>B. vinsonii</i>	<i>B. elizabethae</i>
Oxacillin	1-2	1-4	0.25-0.5	1	4
Penicillin G	0.03-0.06	0.03	0.015-0.03	0.03	0.015
Ticarcillin	0.25	0.06-0.25	0.06-0.12	0.25	0.12
<b>Quinolones</b>					
Ciprofloxacin	0.25-1	0.5-2	0.25-0.5	1	0.5
Pefloxacin	4-8	2-8	1-2	4	2
Sparfloxacin	0.06	0.06-0.12	0.25	0.06	0.06
<b>Tetracyclines</b>					
Doxycycline	0.12	0.06-0.25	0.03-0.06	0.25	0.06
<b>Άλλες κλάσεις</b>					
Clindamycin	2-4	4-16	32-64	8	8
Colistin	4-16	4-16	16	8	4
Fosfomycin	16-32	32-64	8-16	16	16
Imipenem	0.5	0.25-1	0.5-1	2	0.25
Rifampin	0.03-0.06	0.06-0.25	0.003	0.12	0.03
TMP-SMX	1/5	0.25/1.25-1/5	0.4/2-0.8/4	1/5	0.5/2.5
Vancomycin	2-8	8-16	4-8	8	8

Ωστόσο η *in vivo* δραστηριότητα είναι μικρότερη. Επιπλέον τα περισσότερα αντιβιοτικά έχουν βακτηριοστατική και όχι βακτηριοκτόνο δράση έναντι της *Bartonella spp.* Το βακτήριο έχει διαπιστωθεί ότι είναι ευαίσθητο στις βήτα-λακτάμες με εξαίρεση την οξακιλίνη και κεφαλοθίνη, στις μακρολίδες, στην αμινογλυκοσίδες και στις τετρακυκλίνες<sup>82</sup>. Οι αμινογλυκοσίδες και η ριφαμπικίνη φαίνεται ότι μπορεί να πετύχουν σε κάποιο βαθμό βακτηριοκτόνο δράση. Συγκεκριμένα η γενταμικίνη όταν φθάσει σε συγκέντρωση 4 µg/mL είναι βακτηριοκτόνος όπως και η ριφαμπικίνη ωστόσο βρέθηκε ότι ενδοερυθροκυτταρικά η

συγκέντρωση μπορεί να ανέλθει με βραδύ ρυθμό μέχρι τα 0,26μg/mL που δεν αποτελεί ικανή βακτηριοκτόνο συγκέντρωση. Το παραπάνω ενισχύει τη θεωρία ότι τα αντιβιοτικά είναι δραστικά έναντι των συγκεκριμένων βακτηρίων μόνο κατά τη φάση που βρίσκονται εκτός ερυθροκυττάρων ή ενδοθηλιακών κυττάρων αλλά όχι σε αυτά που εντοπίζονται ενδοκυτταρικά<sup>83</sup>.

Στο μοντέλο της γάτας έχει περιγραφεί ότι η χορήγηση αντιβιοτικών όπως τετρακυκλίνη, ερυθρομυκίνη, δοξυκυκλίνη και αμοξικιλίνη, μειώνει το βακτηριακό φορτίο του αίματος όμως δεν εκριζώνει το βακτήριο. Σε κάποιο ποσοστό η χορήγηση ενροφλοξασίνης ή δοξυκυκλίνης είχε σαν αποτέλεσμα την πλήρη εξαφάνιση του βακτηρίου από γάτες με χρόνια λοίμωξη: σε 9 από 14 γάτες (64%) που χορηγήθηκε enrofloxacin και σε 2 από 8 γάτες (25%) που χορηγήθηκε doxycycline<sup>84</sup>.

Γενικότερα, θεωρείται ότι συνδυασμός αντιβιοτικών που μπορεί να επιτύχουν ικανή εξω- και ενδο- κυττάρια συγκέντρωση μπορεί να μειώσει το φορτίο του μικροβίου όμως όχι αποδεδειγμένα να εξαλείψει το βακτήριο. Σε γάτες χωρίς κλινική νόσο έστω και αν έχουν ενδείξεις φορέας *Bartonella* spp., δε συστήνεται θεραπεία τόσο επειδή δεν επιτυγχάνεται εκρίζωση του βακτηρίου όσο και για την αποφυγή ανάπτυξης αντοχής<sup>85</sup>. Θεωρείται επίσης ότι πρωτολοίμωξη και οξεία νόσος σε γάτες έχει καλύτερη προοπτική θεραπείας και εξάλειψης του βακτηρίου από ότι σε χρόνιες μολύνσεις, κάτι που παρατηρείται και στον άνθρωπο αναφορικά με την *B. quintana*<sup>86</sup>.

## *Bartonella* spp.

### 1.7 Κλινικές εκδηλώσεις

Έχει υποστηριχθεί ότι κάθε είδος *Bartonella* δυνητικά μπορεί να προσβάλει και να προκαλέσει νόσο στον άνθρωπο<sup>87</sup>, ωστόσο τα είδη που συνδέονται συχνότερα και με αδιαμφισβήτητο τρόπο με ανθρώπινη νόσο είναι τα *B. bacilliformis*, *B. henselae*, or *B. quintana*. Εκτός όμως αυτών έχει αναφερθεί σύνδεση με νόσο και σε αρκετά άλλα είδη όμως με λιγότερη βιβλιογραφική υποστήριξη ή ακόμα και ως αναφορές μεμονωμένων περιστατικών ενώ η εργαστηριακή επιβεβαίωσή τους ποικίλλει και μπορεί να πρόκειται για καλλιέργεια/απομόνωση, ή για μοριακά ή ορολογικά ευρήματα που συνδέουν το βακτήριο με τη νόσο<sup>21</sup> (Πίνακας 7).

Η απόκλιση στην κλινική εικόνα που παρατηρείται ανάμεσα στα διαφορετικά είδη όπως ακόμα και σε λοιμώξεις οφειλόμενες στο ίδιο είδος *Bartonella*, ενώ οι μηχανισμοί παθογένεσης δεν διαφέρουν ιδιαίτερα, αποτελεί αντικείμενο ερεύνης. Η κλινική μαρτυρία δεν έχει κάποιο ιδιαίτερο παθογνωμονικό χαρακτηριστικό, ωστόσο συχνότερος κοινός παρονομαστής είναι η αγγειακή, νευρολογική ή/και οφθαλμική προσβολή<sup>88</sup>.



**Πίνακας 7** Είδη *Bartonella* spp. με παθογόνο δράση στον άνθρωπο και κύριοι ξενιστές. (Πηγή: Okaro et al. 2017, τροποποιημένο).

Είδος <i>Bartonella</i>	Κύριος ξενιστής	Συσχετιζόμενη νόσος στον άνθρωπο
<i>B. alsatica</i>	Κόνικλος	Ενδοκαρδίτιδα
<i>B. ancashensis</i>	Άνθρωπος	Verruga peruana
<i>B. bacilliformis</i>	Άνθρωπος	Πυρετός Oroya, verruga peruana, νόσος του Carrion
<i>B. clarridgeiae</i>	Γάτα	Λυμφαδενοπάθεια, πυρετός, βλατίδες, νόσος εξ αμυχών γαλής
<i>B. elizabethae</i>	Αρουραίος	Ενδοκαρδίτιδα, νευρορετινίτιδα
<i>B. grahamii</i>	Τρωκτικά, τυφλοπόντικας	Νευρορετινίτιδα, νόσος εξ αμυχών γαλής
<i>B. henselae</i>	Γάτα	Νόσος εξ αμυχών γαλής, ενδοκαρδίτις, βακτηριακή αγγειομάτωση, βακτηραιμία
<i>B. koehlerae</i>	Γάτα	Ενδοκαρδίτιδα
<i>B. mayotimonensis</i>	Νυχτερίδα	Ενδοκαρδίτιδα
<i>B. quintana</i>	Άνθρωπος	Πυρετός των χαρακωμάτων, ενδοκαρδίτις, βακτηραιμία, βακτηριακή αγγειομάτωση
<i>B. rochalimae</i>	Αλεπού, raccoon, coyote	Βακτηραιμία, σπληνομεγαλία
<i>B. tamiae</i>	Τρωκτικά, άνθρωπος	Πυρετός
<i>B. vinsonii</i> subsp. <i>arupensis</i>	Μυς	Ενδοκαρδίτιδα
<i>B. vinsonii</i> subsp. <i>berkhoffii</i>	Σκύλος, coyotes	Ενδοκαρδίτιδα

Η μπαρτονέλλωση μπορεί ακόμα να εμπλέκεται σε εμπύρετα αγνώστου αιτιολογίας σε HIV+ άτομα<sup>89</sup> ενώ εύκολα συγχέεται η βακτηριακή αγγειομάτωση με το σάρκωμα Kaposi<sup>90</sup>.

## *Bartonella* spp.

### 1.8 Επιδημιολογία

Κατά την εξελικτική πορεία τα είδη *Bartonella* spp. προσαρμόστηκαν σε ποικίλους ξενιστές και γίνονται παθογόνα όταν τυχαία εισάγονται σε νέους ξενιστές. Τουλάχιστον 45 είδη *Bartonella* έχουν διαπιστωθεί και τα περισσότερα συνδέονται με θηλαστικά-ξενιστές (reservoirs)<sup>21</sup> ενώ όλα συνδέονται με κάποιο διαβιβαστή (αρθρόποδο). *Bartonella* spp. έχει ανιχνευθεί σε γάτες, σκύλους, μηρυκαστικά άγρια και ήμερα, τρωκτικά, αιλουροειδή, άγρια κυνοειδή και νυχτερίδες<sup>91 92 93</sup> ενώ για πολλά από τα είδη του βακτηρίου που ανιχνεύθηκαν δεν είναι γνωστή η παθογονικότητά στον άνθρωπο<sup>94</sup>.

Οι *B. taylorii*, *B. elizabethae*, *B. tribocorum* και *B. birtlesii* έχουν απομονωθεί από αρουραίους, οι *B. grahamii*, *Bartonella vinsonii* subsp. *vinsonii* και *B. doshiae* από

τυφλοπόντικες, η *B. vinsonii* subsp. *arupensis* από ποντικούς, η *B. alsatica* από κουνέλια, η *B. koehlerae*, *B. clarridgeiae*, *B. henselae*, και η *B. bovis* έχουν βρεθεί σε γάτες, η *B. bovis* έχει βρεθεί σε βοοειδή. Η *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii* απομονώθηκε από σκύλους και κοϋότς, η *B. quintana* και *B. bacilliformis* απομονώθηκαν από ανθρώπους, ενώ οι *B. schoenbuchensis* και *B. capreoli* από ελάφια<sup>73 82</sup>.

Τα τρωκτικά συνδέονται με περισσότερα από 20 είδη *Bartonella* και έτσι αντιπροσωπεύουν σημαντική μερίδα ξενιστών του βακτηρίου και φιλοξενούν αρκετά παθογόνα για τον άνθρωπο είδη.

Τα *B. elizabethae*, *B. tribocorum*, *B. grahamii*, *B. rochalimae*, *B. vinsonii* και *B. washoensis* έχουν απομονωθεί από διάφορα είδη τρωκτικών<sup>95</sup>.

Ακόμα και σε νυχτερίδες έχει διαπιστωθεί φορεία *Bartonella* spp. και μάλιστα με είδος που έχει συνδεθεί με ενδοκαρδίτιδα σε άνθρωπο (*B. mayotimonensis*)<sup>96</sup>.

Οι πιο σημαντικοί διαβιβαστές για τη διατήρηση και τη μετάδοση ειδών *Bartonella* spp. είναι οι ψύλλοι που παρασιτούν θηλαστικά όπως γάτες, σκύλους, τρωκτικά, εντομοφάγα θηλαστικά και κουνέλια. Στην Ευρώπη, ο κρότωνας *Ixodes Ricinus* έχει βρεθεί να φέρει *Bartonella* spp. σε ποσοστό από 0,1- 6,9% και μάλιστα συχνά ως διπλή φορεία και με *Borrelia burgdorferi*<sup>97</sup>. Η *B. bacilliformis* έχει ως διαβιβαστή ένα είδος σκνίπας (*Lutzomyia verrucarum*) που ενδημεί σε συγκεκριμένες περιοχές των άνδρων στη Λατινική Αμερική.

Η *B. bacilliformis* είναι ενδημική στις Άνδεις (Λατινική Αμερική) και είναι ο αιτιολογικός παράγοντας της Carrion's disease. Οι *B. quintana* και *B. henselae* έχουν συνδεθεί με ενδοκαρδίτιδα και βακτηριακή αγγειομάτωση σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς. Αυξημένη συχνότητα ανίχνευσης *B. henselae* και *B. quintana* έχει παρατηρηθεί σε εμπύρετους ασθενείς όπως και σε ανοσοκατεσταλμένους HIV<sup>+</sup><sup>98</sup>, υψηλότερος δε ορολογικός επιπολασμός έχει περιγραφεί σε κτηνιάτρους, ιδιοκτήτες γατών, αλκοολικούς και χρήστες ενδοφλέβιων ουσιών<sup>99</sup>.

Ορολογική μελέτη σε άστεγους στη Λατινική Αμερική έδειξε ότι 13,1% είχαν IgG και 28% από τις ψείρες που τους παρασιτούσαν είχαν φορεία *Bartonella* spp.<sup>100</sup>, ωστόσο η συγκεκριμένη μελέτη δεν επεκτάθηκε και σε μη άστεγους για να μπορέσει να προσδιορισθεί ο λόγος πιθανοτήτων για οροθετικότητα σε άτομα που διαβιούν ως άστεγοι.

Μια άλλη μελέτη δεν ανίχνευσε διαφορά στην οροθετικότητα ανάμεσα σε αγρότες, δασικούς υπαλλήλους και μη ανήκοντες στις παραπάνω ομάδες όσο αφορά IgG κατά της *Bartonella* spp.<sup>101</sup>.

Σε μελέτη σε 500 υγιείς αιμοδότες στη Βραζιλία, που διερευνήθηκαν με καλλιέργεια, και μοριακές τεχνικές για την παρουσία *Bartonella* spp. σαν παράγοντες κινδύνου χαρακτηρίστηκαν η επαφή με γάτες και ιστορικό δήγματος κρότωνα<sup>102</sup>.

Στη Σουηδία σε μελέτη επί 498 ορολογικών δειγμάτων από αιμοδότες, 16,1% βρέθηκε με IgG αντισώματα κατά *Bartonella* spp. με επικρατή τα *B. elizabethae* (14,1%), *B. grahamii*

2,6%, *B. henselae* (Houston-1) 1,2%, *B. henselae* (Marseille) 1,8% και *B. quintana* 0,2%. Με την οροθετικότητα κατά *B. elizabethae* υπήρχε στατιστική σύνδεση με συχνές δράσεις στην ύπαιθρο, με επαφή με γάτες, και ταξίδια στην ανατολική Ευρώπη, ενώ εντοπίστηκε και συσχέτιση με την περιοχή κατοικίας<sup>103</sup>.

Σε μελέτη στην Ισπανία σε εργαζόμενους σε κτηνιατρικές κλινικές (N=89), 73,0% βρέθηκαν οροθετικοί με την πλειοψηφία αυτών να εμφανίζει αντισώματα έναντι της *Bartonella vinsonii berkhoffii* γονότυπου II (56,2%) ενώ 7,9% των συμμετεχόντων ήταν θετικοί και με μοριακές τεχνικές. Οι συγγραφείς διαπίστωσαν αύξηση χρονίων συμπτωμάτων μερικής αμνησίας, αϋπνίας, κεφαλαλγίας κλπ στους οροθετικούς συμμετέχοντες<sup>104</sup>.

Γενικότερα, οι παράγοντες κινδύνου που οδηγούν σε οροθετικότητα και ιδιαίτερα σε βαρύνοντα συμπτώματα ή σε μακροχρόνιες επιπλοκές δεν έχουν διερευνηθεί επαρκώς και ενδεχομένως εξαρτώνται από δραστηριότητες που ενέχουν κίνδυνο έκθεσης αλλά επιπλέον και από την παθογονικότητα των διαφορετικών στελεχών και την ανοσολογική «ιδιοσυγκρασία» των ξενιστών.

## *Rickettsia felis*

### 2.1 Βακτηριολογία

Η *Rickettsia felis* θεωρείται αναδυόμενο παθογόνο και αιτιολογικός παράγοντας του Κηλιδώδους Πυρετού από Ψύλλους (Flea Borne Spotted Fever, FBSF). Το βακτήριο, όπως όλες οι ρικέτσιες, είναι υποχρεωτικά ενδοκυτταρικό, ραβδόμορφο, Gram-αρνητικό και ανήκει στα *α-proteobacteria*.

Οι ρικέτσιες ταξινομούνται «κλασσικά» σε τρεις κατηγορίες, (1) τις ρικέτσιες της ομάδας των κηλιδωδών πυρετών (Spotted Fever Group – SFG), σε αυτή την ομάδα ανήκει και η *R. felis* (2) η ομάδα των ρικετσιών του τύφου (Typhus Group -TG) που περιλαμβάνει τις *R. prowazekii* και *R. typhi* και (3) την «αρχέγονη» ομάδα, που περιέχει το *R. bellii* και *R. canadensis*. Ορισμένοι προτείνουν και μία τέταρτη ομάδα, τη μεταβατική ομάδα (Transitional Group -TRG)<sup>105</sup>, στην οποία κατατάσσουν τη *R. felis*, τη *R. australis* και *R. akari*, ωστόσο αυτό δεν έχει υιοθετηθεί ευρέως<sup>106</sup>.

Τα περισσότερα γονίδια της *R. felis* σχετίζονται με την SFG, ωστόσο μπορεί ορισμένα από αυτά να μεταφέρθηκαν οριζόντια καθώς κάτι που πιθανώς εξηγείται από τη συνύπαρξή της με άλλους ενδοκυτταρικούς μικροοργανισμούς που μπορεί να απαντώνται σε πολλούς διαφορετικούς ξενιστές<sup>107</sup>. Η *R. felis* μπορεί να μην έχει κανένα, ένα ή δύο πλασμίδια, τα οποία πιθανώς προήλθαν από οριζόντια ανταλλαγή γενετικού υλικού<sup>108</sup>. Παρά το γεγονός ότι έχουν ταυτοποιηθεί όλα τα γονίδια που το βακτήριο φέρει, παραμένει άγνωστη η λειτουργία για πολλά από αυτά. Φέρει μεγάλο μέγεθος πολυσχιδούς γονιδιώματος με υψηλή κωδικοποιητική ικανότητα, ενώ οι παθογόνες ρικέτσιες τυπικά έχουν μικρότερο και απλότερο γονιδίωμα.

Κάποιες κυτταρικές σειρές μπορούν να υποστηρίξουν την ανάπτυξη του βακτηρίου (Vero κύτταρα πρωτεύοντων, XTC-2 από αμφίβια, C6/36 και Aa23 από κουνούπια *Aedes albopictus*, ISE6 από κρότωνα, Sua5B από κουνούπια *Anopheles gambiae*, L929 από ποντικό και ενδοθηλιακά κύτταρα ομφαλικής φλέβας (HUVEC) από άνθρωπο) αλλά δεν έχει αναφερθεί επιτυχής απομόνωση από ανθρώπινα δείγματα<sup>109</sup>. Από δείγματα ψύλλων ωστόσο απομονώθηκε επιτυχώς σε όλες τις προαναφερθείσες κυτταρικές σειρές, ιδιαίτερα στην κυτταρική σειρά XTC-2 σε θερμοκρασίες επώασης από 28 έως 32 °C<sup>12</sup>. Τα αναπτυχθέντα βακτήρια αναγνωρίζονται εύκολα με τη χρώση Giménez. Το βακτήριο όταν ανευρίσκεται σε κυτταρικές σειρές αρthropόδων εμφανίζεται με επιμήκη μορφή. Ενδεχομένως αυτή η μορφή το κάνει πιο ανθεκτικό και διευκολύνει την μετάδοση στον ξενιστή-θηλαστικό<sup>110</sup>.

Γενικότερα, το βακτήριο αναπτύσσεται ευκολότερα σε σχετικά χαμηλές θερμοκρασίες, χαμηλότερες του φάσματος της φυσιολογικής θερμοκρασίας των θηλαστικών κάτι που ταιριάζει με την παρουσία του σε αρthropόδα.

Τέλος, για το βακτήριο αυτό υπάρχουν αρκετά γνωστικά κενά και αναπάντητα ερωτήματα. Ένας σημαντικός προβληματισμός είναι γιατί σε ανθρώπους που είχαν συμπτωματική λοίμωξη επιβεβαιωμένη με μοριακή ανίχνευση *R. felis*, δεν αναπτύσσονται αντισώματα<sup>111 112</sup>.

## *Rickettsia felis*

### 2.2 Μηχανισμοί παθογένεσης

Οι *Rickettsia* spp. είναι υποχρεωτικά ενδοκυτταρικά βακτήρια. Παρά το ότι δεν έχει διερευνηθεί αρκετά ο μηχανισμός παθογένεσης, φαίνεται ότι ο θεμέλιος λίθος της νόσου είναι η προσβολή των κυττάρων του αγγειακού ενδοθηλίου, που έχει ως αποτέλεσμα αιμορραγίες και θρόμβωση. Μόνη εξαίρεση φαίνεται να αποτελεί η *R. akari*, το αίτιο της ρικετσιακής ανεμευλογιάς (*Rickettsialpox*), η οποία στοχεύει όχι ενδοθηλιακά κύτταρα αλλά κυρίως μακροφάγα<sup>113</sup>. Οι λιποπολυσακχαρίτες του κυτταρικού τοιχώματος των βακτηρίων φαίνεται ότι εντείνουν τις εξανθηματικές εκδηλώσεις, τον πυρετό, ακόμα και το ενδοτοξικό shock<sup>114</sup>. Ωστόσο άλλα είδη *Rickettsia* είναι παθογόνα και άλλα όχι και οι λόγοι που συμβαίνει αυτό δεν έχουν μελετηθεί επαρκώς.

Στον **Πίνακα 8** φαίνονται τα είδη που παρουσιάζουν ενδείξεις παθογονικότητας για τον άνθρωπο.

**Πίνακας 8** Διαβιβαστές, δεξαμενές και είδη *Rickettsia* που θεωρούνται παθογόνες για τον άνθρωπο (Πηγή: Uchiyama 2012, τροποποιημένο).

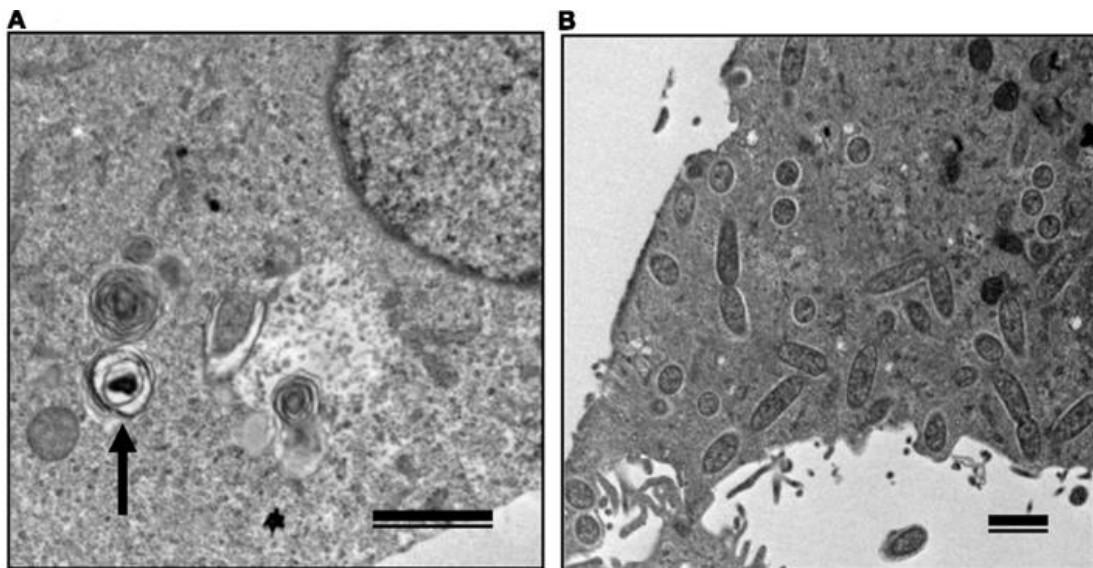
Αντιγονική Ομάδα	Γένος Είδος	Νόσος	Κύριος διαβιβαστής	Δεξαμενή
Ομάδα Κηλιδώδους Πυρετού (Spotted Fever Group - SFG)	<i>R. aeschlimannii</i>	Ρικετσίωση	Κρότωνας	Άγνωστο
	<i>R. africae</i>	African Tick-bite Fever	Κρότωνας	Μυρηκαστικά
	<i>R. akari</i>	Rickettsialpox	Άκαρι	Τρωκτικά
	<i>R. australis</i>	Queensland Tick Typhus	Κρότωνας	Τρωκτικά
	<i>R. conorii</i>	Κηλιδώδης Μεσογειακός Πυρετός (Mediterranean spotted fever)	Κρότωνας	Σκύλοι, Τρωκτικά
	<i>R. felis</i>	Κηλιδώδης Πυρετός από Ψύλλους (Flea borne Spotted Fever - FBSF)	Ψύλλος	Γάτες, τρωκτικά, opossums
	<i>R. heilongjiangensis</i>	Κηλιδώδης Πυρετός της άπω Ανατολής (Far East Spotted Fever)	Κρότωνας	Τρωκτικά
	<i>R. helvetica</i>	Aneruptive fever	Κρότωνας	Τρωκτικά
	<i>R. honei</i>	Flinders Island Spotted Fever	Κρότωνας	Τρωκτικά, ερπετά
	<i>R. japonica</i>	Japanese Spotted Fever	Κρότωνας	Τρωκτικά
	<i>R. massiliae</i>	Mediterranean spotted fever-like Disease	Κρότωνας	Άγνωστο
	<i>R. parkeri</i>	Maculatum infection	Κρότωνας	Τρωκτικά
	<i>R. rickettsii</i>	Κηλιδώδης Πυρετός Βραχωδών Ορέων (Rocky Mountain Spotted Fever)	Κρότωνας	Τρωκτικά
	<i>R. sibirica</i>	North Asian Tick Typhus	Κρότωνας	Τρωκτικά
	<i>R. sibirica mongolotimonae</i>	Lymphangitis associated rickettsiosis	Κρότωνας	Τρωκτικά
<i>R. slovacae</i>	Κροτωνογενής λεμφαδενοπάθεια (Tick-borne lymphadenopathy, TIBOLA)	Κρότωνας	Λαγόμορφα, τρωκτικά	
Ομάδα Τύφου (Typhus Group-TG)	<i>R. prowazekii</i>	Επιδημικός τύφος - Brill-Zinsser Disease	Φθείρα	Άνθρωποι, ιπτάμενοι σκίουροι
	<i>R. typhi</i>	Ενδημικός τύφος - Murine Typhus	Ψύλλος	Τρωκτικά

Η ακριβής μοριακή βάση της παθογονικότητας των ρικετσιών δεν έχει ακόμα καθοριστεί. Ενδέχεται η ταχύτητα διπλασιασμού να επηρεάζει την βαρύτητα των συμπτωμάτων καθώς η επίδρασή τους στα ενδοθηλιακά κύτταρα είναι αυτή που κυρίως καθορίζει την βαρύτητα των συμπτωμάτων.

Στην αρχή προηγείται η προσκόλληση στα κύτταρα στόχο και στη συνέχεια η είσοδος εντός των κυττάρων, καθώς τα *Rickettsia* spp. είναι υποχρεωτικά ενδοκυτταρικά βακτήρια. Αυτή η είσοδος γίνεται αρκετά γρήγορα (εντός λεπτών) και ορισμένα ένζυμα που εκρίνει το βακτήριο όπως η αιμολυσίνη C (hemolysin C) και φωσφολιπάση D (phospholipase D) που κωδικοποιούνται από τα γονίδια *tlyC* και *pld* αντίστοιχα, και το προστατεύουν από τα φαγοσωμάτια του κυτταροπλάσματος<sup>115</sup>.

Έχει διαπιστωθεί ότι ανάμεσα στις 17 και πλέον υποοικογένειες αντιγονικών πρωτεϊνών επιφανείας (Surface Cell Antigen - Sca), οι rOmpA (Sca0) όπως και η rOmpB (Sca5) εμπλέκονται στην διαδικασία προσκόλλησης και εισόδου στα κύτταρα. Ιδιαίτερα η rOmpA θεωρείται από τα πιο σημαντικά επιφανειακά αντιγόνα παθογονικότητας για τις SFG ρικέτσιες ενώ πρόσφατες εργασίες αναδεικνύουν και τον σημαντικό ρόλο της Sca2<sup>116</sup>. Ωστόσο, οι ρικέτσιες που ανήκουν στο TG δεν έχουν rOmpA. Η rOmpB, κοινό αντιγόνο επιφανείας για όλες τις ρικέτσιες, έχει επίσης περιγραφεί ότι διευκολύνει την προσκόλληση και είσοδο στο κύτταρο στόχο<sup>117</sup>.

Η διαφορά στα γεγονότα που ακολουθούν την είσοδο στο κύτταρο μεταξύ μιας απαθογόνου και μίας παθογόνου ρικέτσια φαίνεται στην **Εικόνα 12**. Η ανάπτυξη της απαθογόνου *R. montanensis* είναι πολύ περιορισμένη σε σχέση με τη *R. japonica*. Οι ακριβείς μηχανισμοί που οδηγούν σε παθογενετικότητα δεν έχουν διευκρινιστεί ακριβώς.



**Εικόνα 12** Διαφοροποίηση επίδρασης σε κύτταρα ξενιστές μη παθογόνων και παθογόνων ρικετσιών (A) Vero-κύτταρα επτά ημέρες μετά τον ενοφθαλμισμό τους με τη μη παθογόνο *R.*

*montanensis*. Το βέλος δείχνει μια εκφυλισμένη ρικέτσια εντός φαγοσωματίου (B) Ορισμένα από τα κύτταρα (A) τη μέρα τρία μολύνθηκαν με την παθογόνο *R. japonica* και τη μέρα επτά παρατηρήθηκαν πολλές ελεύθερες ρικέτσες και κυτταρική διαίρεση (binary fission) των παθογόνων. Κλίμακα (μπάρα): 1 μm. (Πηγή: Uchiyama 2012)

## *Rickettsia felis*

### 2.3 Παράγοντες λοιμικότητας

Έχει βρεθεί μια αντίστροφη σχέση μεταξύ παθογονικότητας και μεγέθους γονιδιώματος. Π.χ. η *R. prowazekii* είναι πιο παθογόνος από τη *R. conorii* και η *R. felis* λιγότερο παθογόνος από τη *R. conorii*. Πιθανολογείται ότι η απενεργοποίηση και απώλεια γονιδίων είχε αποτέλεσμα τη μείωση της κατασταλτικής επίδρασης από το κύτταρο ξενιστή στην ανάπτυξη του βακτηρίου<sup>118</sup>.

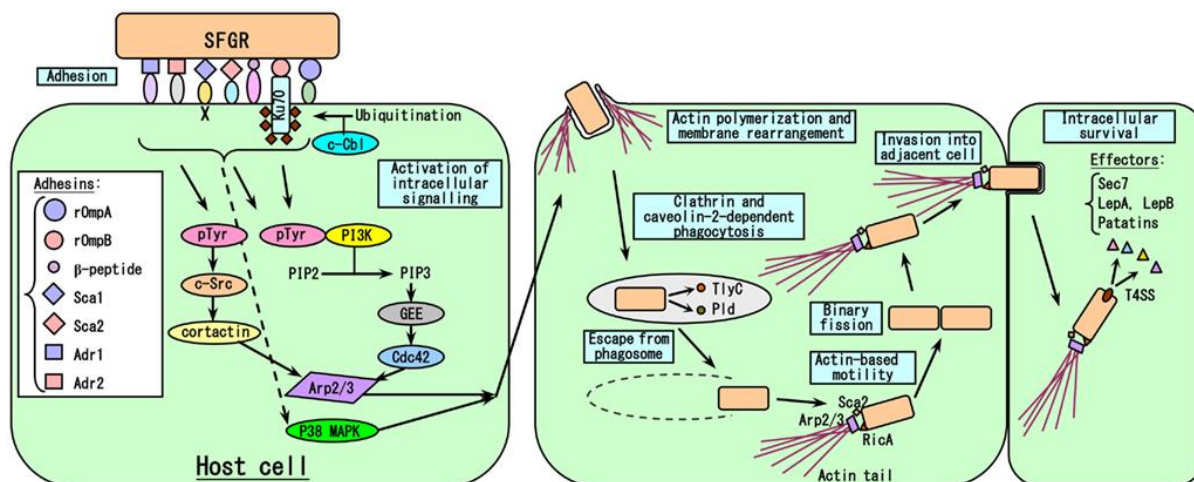
Η προσβολή του κυττάρου ξεκινά με την προσκόλληση της ρικέτσιας όπου πολύ σύντομα φαγοκυτταρρώνεται και βρίσκεται στο εσωτερικό του κυττάρου. Μέσω της δράσης των αιμολυσίνης C και φωσφολιπάσης D διαφεύγει από το λυσοσωμάτιο και πλέον βρίσκεται ελεύθερη στο κυτταρόπλασμα<sup>119</sup>.

Ανάμεσα στις 17 υποοικογένειες των αντιγονικών πρωτεϊνών επιφανείας, πολύ σημαντικές για την προσκόλληση και εισβολή στο κύτταρο είναι οι rOmpA (Sca0) και rOmpB (Sca5). Μάλιστα, η rOmpA είναι ένα από τα κυριότερα αντιγόνα επιφανείας των SFG *Rickettsia* spp. και πάνω σε αυτή έχουν γίνει μελέτες για δημιουργία εμβολίου με ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη ή για χορήγηση αντισωμάτων έναντι αυτής<sup>120</sup>.

Η rOmpB που είναι το κοινό επιφανειακό αντιγόνο για όλα τα είδη του γένους *Rickettsia*, έχει και αυτό επιβεβαιωμένη συμμετοχή στην προσκόλληση και είσοδο στο κύτταρο στόχο<sup>121</sup>. Η rOmpB έχει ενδεχομένως και άλλες λειτουργίες όπως η διατήρηση της δομής του βακτηρίου ή στη διεύθυνση μη κυτταροφαγικού τύπου αλληλεπιδρώντας με την πρωτεΐνη Ku70 στην μεμβράνη του κυττάρου<sup>122</sup>. Για την περάτωση της παραπάνω δράσης, η προσθήκη ουβικουιτίνης (ubiquitin) στην Ku70 είναι απαραίτητη και γίνεται μέσω μίας λιγκάσης της ουβικουιτίνης (ubiquitin ligase, c-Cbl)<sup>123</sup>.

Η είσοδος στο κύτταρο ξενιστή θεωρείται ότι είναι εξαρτώμενη από την κλαθρίνη (Clathrin) και καβεολίνη-2 (caveolin-2). Και οι δύο παραπάνω πρωτεΐνες προάγουν τη δημιουργία εγκοιλώσεων της κυτταρικής μεμβράνης μέσω των οποίων οι ρικέτσες διεισδύουν εντός του κυττάρου στόχου. Πιθανώς μια αναδιάταξη της F-ακτίνης του κυττάρου παίζει και αυτή ρόλο στην είσοδο στο κύτταρο, επηρεάζοντας με μια πληθώρα πιθανών μηχανισμών το σύστημα Arp2/3<sup>124</sup>. Τέλος, και άλλες εξώτερες πρωτεΐνες (outer membrane proteins) που ανήκουν σε άλλες υποοικογένειες όπως η Sca1 και Sca2 επίσης έχουν κάποιο ρόλο στην προσβολή των κυττάρων ενώ τα πεπτίδια Adr1 και Adr2 έχουν πιθανά ρόλο συγκολλητινών που συντελούν στην προσκόλληση στο κύτταρο ξενιστή<sup>125</sup>.

Στην **Εικόνα 13** φαίνεται η διαδοχή των συμβάντων κατά την προσβολή ενός κυττάρου από SFG ρικέττσια.



**Εικόνα 13** Αλληλεπίδραση ρικετσιών του Spotted Fever Group (SFGR) και ενδοθηλιακών κυττάρων στόχων. Προηγείται η προσκόλληση μέσω των συγκολλητινών (adhesins) του βακτηρίου που ακολουθείται από την ενεργοποίηση ενδοκυτταρικών μηχανισμών που οδηγούν στην εγκόλπωση από το φαγοσωμάτιο μέσω του μηχανισμού της κλαθρίνης και καβεολίνης-2. Στη συνέχεια η ρικέττσια διαφεύγει από το φαγοσωμάτιο μέσω της έκκρισης των αιμολυσιν C και φωσφολιπάση D. Οι συγκολλητίνες RicA και Sca2 διαμορφώνουν την ακτίνη του κυτταροπλάσματος ώστε να σχηματίσει μία «ουρά» η οποία διευκολύνει την κίνηση της ρικέττσιας εντός του κυττάρου. Οι ρικέττσιας διαιρούνται με διχοτόμηση (binary fission) και αυξάνει ο αριθμός τους. Το σύστημα VirB-T4SS είναι απαραίτητο για την ενδοκυτταρική επιβίωση των ρικετσιών και την έκκριση effector molecules (Πηγή: Uchiyama 2012).

## *Rickettsia felis*

### 2.4 Γονιδίωμα

Το γονιδίωμα της *R. felis* έχει αναλυθεί πλήρως και είναι η πρώτη ρικέττσια στην οποία βρέθηκαν πλασμίδια. Το γενετικό υλικό της *R. felis* μαζί με τα δύο πλασμίδια που διαθέτει ((pRF και pRFδ) είναι από τα μεγαλύτερα σε μέγεθος (bp) ανάμεσα στις ρικέττσιας<sup>126</sup>. Τα πλασμίδια αυτά είναι μεταβλητά. Σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να απουσιάζει το ένα ή και τα δύο από τα πλασμίδια αυτά<sup>108</sup>.

Έχει διαπιστωθεί γενομική ετερογένεια σε διαφορετικά στελέχη *R. felis* που βρίσκονται σε διαφορετικούς διαβιβαστές (ψύλλοι *C. felis*, booklouse *Liposcelis bostrychophila*) και ακόμα σε διαφορετικές αποικίες διαβιβαστών του ίδιου είδους (*C. felis*) και επιπλέον η δυνατότητα διασταυρούμενης προσβολής διαβιβαστών από διαφορετικά στελέχη *R. felis*<sup>108</sup>.

Τα τελευταία χρόνια έχουν ανακαλυφθεί βακτήρια με μεγάλη γενοτυπική ομοιότητα με τη *R. felis*, τα *R. felis*-like organisms (RFLOs) με την τεχνική multilocus sequence typing



(MLST). Για τη διαφοροποίηση των ειδών *Rickettsia* και την ανακήρυξη νέων ειδών έχουν προταθεί ορισμένα κριτήρια που βασίζονται στον βαθμό ομοιότητας των αποτελεσμάτων της αλληλούχισης των νουκλεοτιδίων του γονιδίου 16S rRNA (<99.8 %), *gltA* (<99.9 %), *ompA* (<98.8 %), *ompB* (<99.2 %) και του γονιδίου D (gene D) (<99.3 %)<sup>127</sup>. Η ελάχιστη διαφοροποίηση στο 16S rRNA είναι 0,2% ενώ 1% και πλέον ορίζει με ακόμα πιο σαφή τρόπο τα διαφορετικά βακτηριακά είδη. Δύο προσφάτως ανακαλυφθέντα είδη, τα *Candidatus Rickettsia asemboensis* και *Candidatus Rickettsia senegalensis*, είχαν 99.5% και 99.65 % ομοιότητα στο 16S rRNA γονίδιο του *R. felis*, αντίστοιχα<sup>134</sup>. Ενδεχομένως στο μέλλον θα αναζητηθεί συνδυασμός κριτηρίων, γενομικών, φαινοτυπικών και οικολογικών, που θα εξηγούν καλύτερα τη διαφοροποίηση των ειδών που διακρίνονται με βάση την MLST.

Τα πλήρες γονιδιώμα της *R. felis* (στέλεχος URRWXCal2) είναι καταχωρημένο στη GenBank (**Πίνακας 9**).

**Πίνακας 9** Γονιδίωμα αναφοράς για *R. felis* στη GenBank

<b>Γονιδίωμα αναφοράς (Reference genome)</b>	<b>RefSeq</b>	<b>INSDC<sup>1</sup></b>	<b>Μέγεθος (Mb)</b>	<b>GC%</b>	<b>Γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες</b>	<b>rRNA</b>	<b>tRNA</b>	<b>Άλλα RNA</b>	<b>Γονίδια</b>	<b>Ψευδογονίδια</b>
<i>Rickettsia felis</i> <i>URRWXCal2</i>	<a href="#">NC_007109.1</a>	<a href="#">CP000053.1</a>	1,49	32,5	<a href="#">1,256</a>	3	33	4	1,637	341

<sup>1</sup> International Nucleotide Sequence Database Collaboration

Πηγή: NCBI <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (16-05-2020).

Η μοριακή διάγνωση *R. felis* σε δείγμα αίματος ασθενούς, όπως σε όλες τις ρικέτσιες, παρουσιάζει μια εγγενώς μειωμένη ευαισθησία καθώς η ανίχνευση γενετικού υλικού συνδέεται με το βαθμό αγγειακής βλάβης και τον αριθμό των ενδοθηλιακών κυττάρων που καταστράφηκαν ή αποκολλήθηκαν με αποτέλεσμα να κυκλοφορούν ρικέτσιες στο αίμα. Κατ' επέκταση, η σοβαρότητα των συμπτωμάτων αυξάνει την ευαισθησία αυτής της μεθόδου<sup>128</sup>.

Σε άλλες περιπτώσεις στοχεύονται γονίδια που αντιστοιχούν στο γένος *Rickettsia*, στα προϊόντα της PCR γίνεται αλληλούχιση και οι ακολουθίες που προκύπτουν συγκρίνονται με γνωστές ακολουθίες (GenBank) για να διαπιστωθεί το είδος ή και το στέλεχος<sup>129</sup>. Στις περισσότερες μελέτες, πρώτα εξασφαλίζεται ότι πρόκειται για *Rickettsia* μέσω μίας ειδικής για το γένος μοριακής μεθόδου όπως για παράδειγμα qPCR που στοχεύει το γονίδιο που κωδικοποιεί την αντιγονική πρωτεΐνη επιφανείας 17-kDa (17-kDa αντιγόνο)<sup>130</sup> ή τμήμα του γονιδίου που κωδικοποιεί την κιτρική συνθάση *gltA*<sup>111</sup>.

Οι Moonga et al. (2019)<sup>131</sup> σε δείγματα ζώων (σκύλων, τρωκτικών) και αρθροπόδων χρησιμοποίησαν μία συμβατική PCR σαν μέθοδο διαλογής που στόχευε το κοινό για τις ρικέτσιες *gltA* και δύο qPCR, την μερικώς ειδική για *R. felis* που στοχεύει το γονίδιο της συνθάσης της βιοτίνης (*bioB*) και την ειδική για *R. felis* που στοχεύει τμήμα γονιδίου της *R. felis* για την *ompB* (*RfelB*) όπως περιγράφεται στους Odhiambo et al., 2014<sup>132</sup>. Σύμφωνα με την παραπάνω μελέτη, για να χαρακτηριστεί το DNA ως *R. felis* θα έπρεπε τα δείγματα να ικανοποιούν τουλάχιστον δύο κριτήρια (markers): (α) τα προϊόντα sequencing των προϊόντων πολλαπλασιασμού της συμβατικής *gltA* PCR να παρουσιάζουν ομολογία >99% με το *R. felis* strain URRXCal2 (GenBank: CP000053) με το εργαλείο BLASTn και μία από τις δύο qPCR για *R. felis* να είναι θετική ή (β) και οι δύο qPCR για *R. felis* να είναι θετικές, ανεξαρτήτως άλλου αποτελέσματος. Τα προϊόντα sequencing δύο επιπλέον συμβατικών PCR (*ompA*, *ompB*) χρησιμοποιήθηκαν για επιβεβαίωση άλλων ειδών *Rickettsia* και συγκρίθηκαν με κατατεθειμένες αλληλουχίες που αντιστοιχούν σε *Rickettsia felis*-like Organisms (RFLOs) και συγκεκριμένα την *R. asembonensis* (Accession number - JN315968).

Ως ειδικός στόχος για εκκινητές μοριακών τεχνικών για τη *R. felis* έχει περιγραφεί και μέρος του γονιδίου που κωδικοποιεί την *ompB*<sup>133</sup>.

Η *R. felis* σε δείγματα αίματος ή ορού λόγω του πολύ μικρού DNA φορτίου είναι πιο πιθανό να ανιχνευτεί με την πολύ ευαίσθητη qPCR. Τα πιο συχνά γονίδια στόχοι είναι τα *gltA*, *ompB*, και *htrA*<sup>109</sup>. Σε πολλές μελέτες, η ανίχνευση της *R. felis* επιβεβαιώνεται με μοριακές μεθόδους σε περισσότερους από δύο στόχους και τα προϊόντα πολλαπλασιασμού που προκύπτουν συχνά δέχονται αλληλούχιση και σύγκριση με γνωστές αλληλουχίες νουκλεοτιδίων.

Τα γονίδια που συχνότερα στοχεύονται είναι τα *gltA*, *ompB* και *htrA*. Η αλληλούχιση των προϊόντων συνήθως χρειάζεται για την επιβεβαίωση καθώς τα γονίδια στόχοι υπάρχουν σε όλες τις SFG ρικέτσιες και μόνο συγκεκριμένες διαφορές στις αλληλουχίες των προκυπτόντων προϊόντων επιτρέπουν τη διαφοροποίηση του είδους. Η αλληλούχιση γίνεται μετά από PCR υβριδισμό των γονιδίων για *gltA*, *ompB*, 16S rRNA, *sca4*, και των πλασμιδιακών γονιδίων της *R. felis* *pRF* και *pRF*<sup>134</sup> και εν συνεχεία μπορούν να συγκριθούν με κατατεθειμένες αλληλουχίες όπως π.χ. σε δημόσιες βάσεις δεδομένων (GenBank)<sup>135</sup>. Ωστόσο έχουν περιγραφεί qPCR που διαχωρίζουν είδος και ανιχνεύουν *R. felis*, κυρίως στοχεύοντας το γονίδιο *ompB* και το *bioB* ή το γονίδιο της μεμβρανικής φωσφατάσης (membrane phosphatase gene), ακυρώνοντας την ανάγκη για sequencing<sup>136 137</sup>. Φαίνεται ότι το γονίδιο για το 16S rRNA ενώ είναι αρκετά αξιόπιστο για την ταυτοποίηση του είδους, δεν διαθέτει επαρκή διαχωριστική ικανότητα σε επίπεδο είδους όσο αφορά τις ρικέτσιες<sup>138</sup>.

Ο Πίνακας 10 παρουσιάζει τα γονίδια στόχους και μεθοδολογίες που έχουν αναφερθεί για την ανίχνευση *R. felis*.

**Πίνακας 10** Τεχνικές που έχουν περιγραφεί για ανίχνευση/διάγνωση *R. felis* σε ανθρώπινη λοίμωξη και έτη δημοσίευσης (Πηγή: Hun & Troys 2012).

Έτος δημοσίευσης	Τεχνικές, στόχοι και μέθοδοι για ανίχνευση <i>R. felis</i> *
1994	PCR γονίδιο που κωδικοποιεί τη 17-kDa protein gene fragment
	RFLP υβριδισμός κατά Southern (Southern hybridization)
2001	MIF υψηλότεροι αντισωματικοί τίτλοι για <i>R. felis</i> higher κατά δύο ή περισσότερες αραιώσεις
	Nested PCR για το γονίδιο της <i>gltA</i> , αλληλούχιση
2000	PCR για το γονίδιο της 17-kDa, αλληλούχιση
2006	PCR για το γονίδιο της 17-kDa, αλληλούχιση
2009	PCR για γονίδια <i>gltA</i> , <i>ompA</i> , <i>ompB</i> , αλληλούχιση και RFLP
2001	MIF αντισωματικοί τίτλοι για <i>R. felis</i> υψηλότεροι κατά δύο ή περισσότερες αραιώσεις
2009	MIF, <i>R. felis</i> επιβεβαίωση με Western blot και cross-adsorption
2002	Ορομετατροπή, MIF υψηλότεροι αντισωματικοί τίτλοι για <i>R. felis</i> higher κατά δύο ή περισσότερες αραιώσεις, επιβεβαίωση με Western blot
	Nested PCR για το γονίδιο της πρωτεΐνης PS120
2003	MIF υψηλότεροι αντισωματικοί τίτλοι για <i>R. felis</i> higher κατά δύο ή περισσότερες αραιώσεις, επιβεβαίωση με Western blot
2005	Nested PCRs για γονίδια <i>ompB</i> και <i>gltA</i> , RFLP και αλληλούχιση
2005	MIF υψηλότεροι αντισωματικοί τίτλοι για <i>R. felis</i> κατά δύο ή περισσότερες αραιώσεις, επιβεβαίωση με Western blot
2006	Nested PCRs για <i>gltA</i> και <i>ompB</i> , seminested PCR για <i>ompA</i> , αλληλούχιση
2006	MIF, Western blot με cross-absorption
2009	MIF, Western blot με cross-absorption

2006	MIF, Western blot με cross-absorption
2007	qPCR ειδική <i>R. felis</i> (γονίδιο <i>ompB</i> )
2010	qPCR ειδική <i>R. felis</i> (γονίδιο <i>ompB</i> )
2010	qPCR και nested PCR για το γονίδιο της πρωτεΐνης 17 kDa, αλληλούχιση
	qPCR ειδική <i>R. felis</i> (γονίδιο <i>ompB</i> )
	Nested PCR για <i>ompB</i> , αλληλούχιση
2012	PCR για πλασμίδιο της <i>R. felis</i>
	PCR για πρωτεΐνη 17-kDa, <i>ompB</i> , πλασμίδιο <i>R. felis</i> , αλληλούχιση
	qPCR ειδική για <i>R. felis</i> (γονίδιο <i>ompB</i> )
2011	MIF, υψηλοί αντισωματικοί τίτλοι ή ορομετατροπή
	PCR <i>gltA</i> gene fragment from cat fleas, αλληλούχιση
2010	qPCR και nested PCR (γονίδιο <i>gltA</i> ), αλληλούχιση
	qPCR ειδική για <i>R. felis</i> (γονίδιο <i>bioB</i> )
2008	qPCR για τη 17-kDa πρωτεΐνη, <i>groEL</i> , αλληλούχιση
2010	qPCR (γονίδιο <i>gltA</i> )
	qPCR για τη 17-kDa και <i>ompB</i> , αλληλούχιση
2012	MIF, επιβεβαίωση <i>R. felis</i> με Western blot και cross-adsorption
*PCRs μη ειδικές για <i>R. felis</i> εκτός και αν δηλώνεται διαφορετικά.	
<b>Συντημήσεις:</b> PCR, αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης ανάστροφης μεταγραφής - qPCR αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης ανάστροφης μεταγραφής πραγματικού χρόνου - RFLP, restriction fragment length polymorphism - MIF, μικροανοσοφθορισμός (microimmunofluorescence)	

## *Rickettsia felis*

### 2.6 Ευαισθησία στα αντιβιοτικά

Η ευαισθησία του *R. felis* στα αντιβιοτικά είναι παρόμοια με των υπόλοιπων SFG ρικετσιών<sup>139</sup>. Μια ιδιαίτερη αντίδραση της χλωραμφαινικόλης έχει παρατηρηθεί σε κύτταρα μολυσμένα με *R. felis* καθώς προκαλεί την απόπτωσή τους μέσω ενός μηχανισμού τοξίνης-αντιτοξίνης<sup>140</sup>.

Η *R. felis* όπως και τα περισσότερα είδη SFG ρικετσίας εμφανίζουν ένα προφίλ ανοχής στα αμοξικιλίνη, γενταμικίνη, και τριμεθοπρίμη-σουλφαμεθοξαζόλη. Φτωχή ευαισθησία επίσης εμφανίζει στην ερυθρομικίνη με MIC από 8 έως 32 µg/ml. Η δοξυκυκλίνη αποτελεί το πιο αποτελεσματικό αντιμικροβιακό με MICs από 0,06 έως 0,125 µg/ml.

Αποτελεσματικές έναντι στη *R. felis* είναι και οι φθοροκινολόνες με MICs από 0.5 έως 1 µg/ml. Η ριφαμπικίνη είναι επίσης αποτελεσματική με MICs από 0,06 έως 1 µg/ml. Αγωγή με φθοροκινολόνες έχει αποδειχτεί κλινικώς αποτελεσματική σε SFG ρικετσιώσεις όπως Μεσογειακός κηλιδώδης πυρετός (Mediterranean Spotted Fever)<sup>141</sup> και μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν εναλλακτική θεραπεία. Κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, οι μακρολίδες είναι ένα ασφαλέστερο εναλλακτικό σχήμα σε σχέση με τη δοξυκυκλίνη και τις φθοροκινολόνες.

## *Rickettsia felis*

### 2.7 Κλινικές εκδηλώσεις

Οι κλινικές εκδηλώσεις της λοίμωξης από *R. felis* περιλαμβάνουν κεφαλαλγία, ρίγη, πυρετό (>38°C), μυαλγία, κακουχία και συχνή εμφάνιση κηλιδοβλατιδώδους εξανθήματος. Λίγα κρούσματα εμφανίζονται με εσχάρα, δηλαδή μία ενιαία εφελκιδωποιημένη δερματική αλλοίωση, περιβαλλόμενη από φλεγμαίον ιστό που συνήθως θεωρείται ως το σημείο ενοφθαλμισμού του βακτηρίου μέσω νύγματος αρθροπόδου<sup>142</sup>. Σπανίως η *R. felis* συνδέεται με νευρολογικές εκδηλώσεις υπό τη μορφή πολυνευροπάθειας ή υποξείας μηνιγγίτιδας, πνευμοία, και γαστρεντερικές διαταραχές<sup>143</sup>. Δεν υπάρχουν αναφορές για σοβαρή νόσο ή θάνατο. Ωστόσο κάποιες αναφορές περιγράφουν αναπνευστικές, νευρολογικές και σπλαχνικές εντοπίσεις που οδήγησαν σε σοβαρές επιπλοκές<sup>144</sup> ενώ έχουν αναφερθεί και δύο κρούσματα που εκδήλωσαν απάθεια και το ένα από αυτά, κόμα<sup>145</sup>.

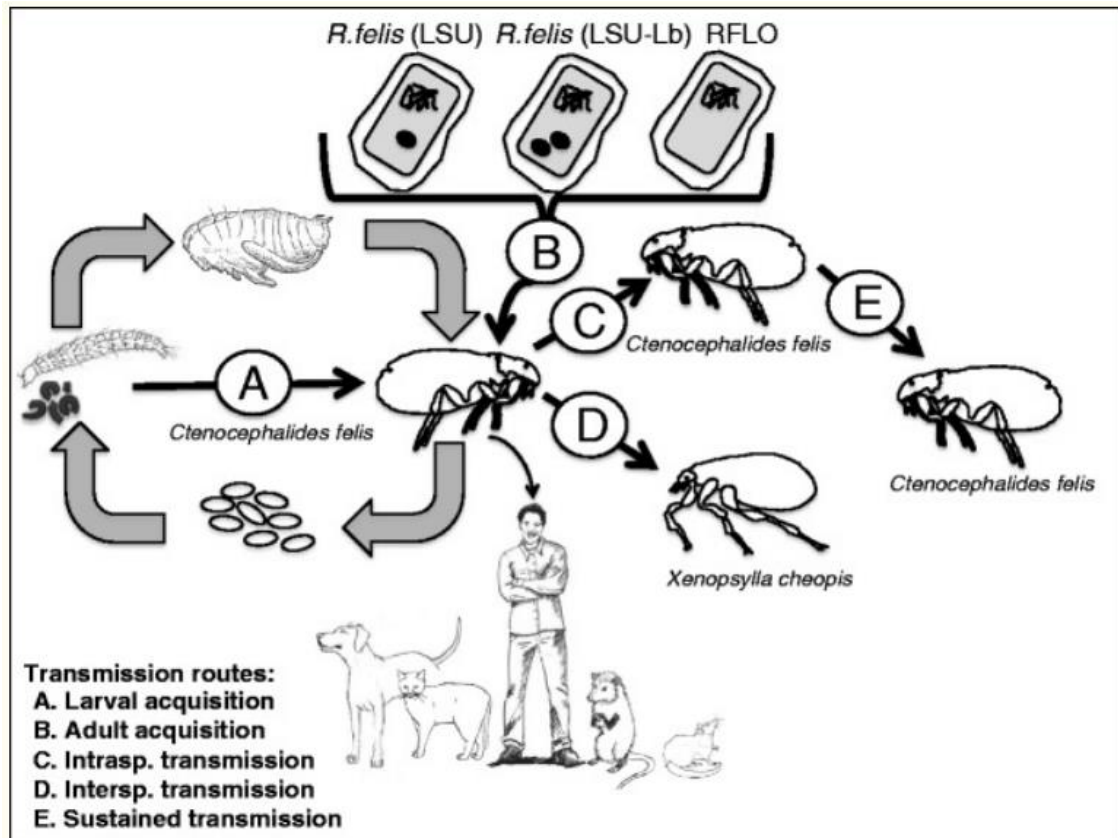
Η απουσία παθογνωμονικών συμπτωμάτων, η ήπια νόσος και η έλλειψη ειδικών διαγνωστικών δοκιμών κατά τη συνήθη κλινική πράξη οδηγούν σε υποδιάγνωση της νόσου<sup>8</sup>. Στην Αφρική η *R. felis* αποτελεί αναδυόμενο αίτιο πυρετού αγνώστου αιτιολογίας. Καθώς η *R. felis* έχει απομονωθεί και από ασυμπτωματικούς φορείς έχει αμφισβητηθεί από μερικούς η παθογονικότητά της ή έχουν διατυπωθεί θεωρίες για χρόνια μορφή λοίμωξης με περιόδους έξαρσης και ύφεσης<sup>143</sup>.

## *Rickettsia felis*

## 2.8 Επιδημιολογία

Η *R. felis* έχει παγκόσμια εξάπλωση και έχει αναφερθεί σε όλες τις ηπείρους πλην της ανταρκτικής<sup>14</sup>.

Το βακτήριο παραμένει στον πληθυσμό των ψύλλων με διωθητική μετάδοση όμως και άλλων μορφών μετάδοσης όπως κατανάλωση περιττωμάτων μολυσμένων ψύλλων από προνύμφες ψύλλων ή μέσω συμπαρασιτισμού με μολυσμένους ψύλλους σε κοινό ξενιστή κάτι που παρατηρείται ακόμα και μεταξύ διαφορετικών ειδών ψύλλων (π.χ. *C. felis* και *X. cheopis*)<sup>146</sup> (Εικόνα 14).



**Εικόνα 14** Προτεινόμενοι τρόποι διατήρησης και μετάδοσης του *R. felis* σε ψύλλους *Ctenocephalides felis*. (A) μη διωθητική μετάδοση σε επόμενες γενεές (μέσω κατανάλωσης περιττωμάτων ενηλίκων ψύλλων από προνύμφες ψύλλων) (B) μετάδοση σε ψύλλους *C. felis* μέσω πρόσληψης μολυσμένου αιματούχου γεύματος σε τεχνητές συνθήκες (C) μετάδοση μεταξύ ψύλλων *C. felis* που τρέφονταν από τον ίδιο μολυσμένο ξενιστή (D) μετάδοση μεταξύ ψύλλων διαφορετικών ειδών (*C. felis* και *Xenopsylla cheopis*) που τρέφονταν από τον ίδιο μολυσμένο ξενιστή (E) μετάδοση από μολυσμένους ψύλλους *C. felis* σε ψύλλους *C. felis* ελεύθερους *R. felis*. (specific pathogen free) που προσλάμβαναν κοινό αιματούχο γεύμα σε τεχνητές συνθήκες (Πηγή: Brown & Macaluso 2016).

Η παρουσία του βακτηρίου δε φαίνεται να μειώνει τη ζωτικότητα των ψύλλων, ορισμένες αναφορές μάλιστα υποστηρίζουν ότι την αυξάνει.

Έτσι ο διαβιβαστής (ψύλλος) έχει παράλληλα και ρόλο αποθήκης του βακτηρίου (reservoir) όμως και αρκετά οικόσιτα και άγρια ζώα εμφανίζουν ενδείξεις φυσικής λοίμωξης από *R. felis*, τόσο υπό μορφή αντισωμάτων όσο και DNA. Οι γάτες, σκύλοι και διδελφίδες (opossums, μικρά μαρσιποφόρα θηλαστικά της Αμερικής) θεωρούνται επίσης πιθανές δεξαμενές του βακτηρίου καθώς έχει βρεθεί ότι μπορούν τόσο να το μεταδώσουν σε ψύλλους όσο και να μολυνθούν από ψύλλους<sup>147 148 149</sup>.

Η μόλυνση του ανθρώπου και των υπόλοιπων θηλαστικών πιθανολογείται ότι προέρχεται από το νύγμα του ψύλλου και κατά τη διάρκεια της λήψης του αιματούχου γεύματος αν και αναφορές υποστηρίζουν ότι μπορεί να γίνει και μέσω έκθεσης στα περιττώματα του ψύλλου.

Δεν υπάρχουν πολλές αναφορές σχετικά με τους παράγοντες κινδύνου έκθεσης στη *R. felis* ωστόσο αυξημένη πιθανότητα παρουσίας αντισωμάτων (IgG) κατά ρικετσιών της ομάδας SFG έχει συνδεθεί με άρρενες, μεγαλύτερη ηλικία, αγροτική/κτηνοτροφική ενασχόληση, ενασχόληση με οικόσιτα πουλερικά ενώ, αναπάντεχα, η επαφή με οικιακά ζώα συντροφιάς συνδυάστηκε με σημαντική μείωση του λόγου πιθανοτήτων (odds ratio) για ανεύρεση αντισωμάτων<sup>150</sup>.

Σπανίως έχουν περιγραφεί συρροές όπως αυτή που αφορούσε 5μελή οικογένεια στην Αυστραλία που εκτέθηκαν σε ψύλλους από το οικόσιτο γατάκι τους<sup>151</sup>.

Καθώς η πυκνότητα και η δραστηριότητα των ψύλλων είναι και θερμοεξαρτώμενη, έχει εκφραστεί ανησυχία σχετικά με τις αλλαγές που μπορεί να φέρει η αύξηση της θερμοκρασίας του πλανήτη στην οικολογία του ψύλλου και στη δυναμική της μετάδοσης στους ανθρώπους<sup>152</sup>.

Στην υποσαχάριο Αφρική ή *R. felis* αποτελεί συχνό αίτιο πυρετού αγνώστου αιτιολογίας (3-15%) και μάλιστα σε περιοχές ενδημικές για ελονοσία<sup>153 154</sup>. Έχει δε υποστηριχθεί ότι στην επιδημιολογία της *R. felis* μπορεί να συμμετέχουν και τα κουνούπια όπως διάφορα είδη *Anopheles* καθώς έχει ανιχνευθεί και σε αυτά και έχει διαπιστωθεί συσχέτιση της διαμονής σε περιοχές με μολυσμένα *Anopheles* με αυξημένη συχνότητα ανθρώπινων κρουσμάτων<sup>8</sup>. Ο κατεξοχήν διαβιβαστής της ελονοσίας στην Αφρική, το *Anopheles gambiae*, υπό τεχνητές συνθήκες βρέθηκε ότι μπορεί να μολυνθεί και να μεταδώσει *R. felis*<sup>155</sup>. Σε μελέτες στην Αφρική διαπιστώθηκε ότι αρκετά ακόμα αρθρόποδα μπορεί να είναι μολυσμένα με *R. felis*, όπως ψώρες και και κοριοί (bed bugs)<sup>152</sup> (Πίνακας 11).

Τέλος λόγω της απαθογόνου δράσης της *R. felis* σε αρκετούς ανθρώπους-φορείς ή ανθρώπους με ενδείξεις πρότερης έκθεσης (ανεύρεση αντισωμάτων) υποστηρίζεται ότι ο άνθρωπος μαζί με άλλα πρωτεύοντα όπως οι *Pan troglodytes* (χιμπατζήδες) μπορεί να αποτελούν την βασική δεξαμενή αυτού του βακτηρίου<sup>156</sup>.

**Πίνακας 11** Αρθρόποδα υποδόχα της *R. felis*, άλλα παθογόνα που τυχόν φέρουν και οι αντίστοιχες ασθένειες (Πηγή: Abdad et al. 2011).

Αρθρόποδο ξενιστής/διαβιβαστής	Σπονδυλωτό ξενιστής	Άλλα παθογόνα που μπορεί να φέρουν τα αρθρόποδα	Προκαλούμενη νόσος
<i>Ψύλλοι</i> <i>Ctenocephalides felis</i>	Σκύλος, Γάτα, Τρωκτικά, Πίθηκος, opossums	<i>Rickettsia typhi</i> , <i>Bartonella</i> sp.	Ενδημικός τύφος, Νόσος εξ αμυχών γαλής



<i>Ctenocephalides canis</i>	Σκύλος, γάτα	<i>Bartonella</i> sp.	Νόσος εξ αμυχών γαλής
<i>Pulex Irritans</i>	Άνθρωπος και θηλαστικά	<i>Rickettsia typhi</i> , <i>Yersinia pestis</i>	Ενδημικός τύφος, Πανώλη
<i>Xenopsylla cheopis</i>	Τρωκτικά	<i>Rickettsia typhi</i> , <i>Yersinia pestis</i>	Ενδημικός τύφος, Πανώλη
<i>Anomiopsyllus nudata</i>	Τρωκτικά	–	–
<i>Archaeopsylla erinacei</i>	Σκαντζόχοιρος, σκύλος, γάτα	–	–
<i>Echidnophaga gallinacean</i>	Πουλερικά, σκύλος, γάτα	<i>Rickettsia</i> sp.	Κηλιδώδης πυρετός
<i>Spilopsyllus cuniculi</i>	Γάτα, κουνέλι	–	–
<i>Ctenophthalmus</i> sp.	Τρωκτικά	<i>Rickettsia typhi</i> , <i>Bartonella</i> sp.	Ενδημικός τύφος, Νόσος εξ αμυχών γαλής
<i>Xenopsylla brasiliensis</i>	Τρωκτικά	<i>Yersinia pestis</i>	Πανώλη
<i>Tunga penetrans</i>	Άνθρωπος, σκύλος, γάτα, χοίρος	–	–
<i>Polygenis atopus</i>	Σκύλος, γάτα, opossum	–	–
<i>Κρότωνες</i>			
<i>Haemaphysalis flava</i>	Γάτα	<i>Rickettsia japonica</i>	Κηλιδώδης πυρετός
<i>Haemaphysalis kitaokai</i>	Βοοειδή, ελάφι	–	–
<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Σκύλος, άλογο	<i>Rickettsia</i> sp., <i>Anaplasma</i> sp.	Κηλιδώδης πυρετός, Αναπλάσμωση
<i>Amblyomma cajennense</i>	Σκύλος, άλογο	<i>Rickettsia</i> sp.	Κηλιδώδης πυρετός
<i>Ixodes granulatus</i>	Τρωκτικά	<i>Rickettsia</i> sp., <i>Ehrlichia</i> sp.	Κηλιδώδης πυρετός, Ερλιχίωση
<i>Ixodes ovatus</i>	Γάτα	<i>Rickettsia</i> sp.	Κηλιδώδης πυρετός
<i>Carios capensis</i>	Ψαροπούλια	<i>Coxiella</i> sp., <i>Rickettsia</i> sp.	Unknown, Κηλιδώδης πυρετός
<i>Haemaphysalis sul</i> Γάτα	Πρόβατα, αίγες	–	–
<i>Ψώρες</i>			
<i>Trombiculid</i>	Τρωκτικά	<i>Orientia tsutsugamushi</i>	Scrub typhus
<i>Leptotrombidium deliense</i>	Αρουραίος	<i>Orientia tsutsugamushi</i>	Scrub typhus
<i>Mesostigmata</i>	Αρουραίος	–	–
<i>Ψείρες</i>			
<i>Liposcelis bostrychophila</i>	–	–	–

Η *R. typhi* ανήκει στην οικογένεια *Rickettsiaceae* που περιλαμβάνει Gram-αρνητικά ενδοκυτταρικά βακτήρια και ανήκει στην ομάδα ρικετσιών του τύφου (Typhus group -TG) που διαφοροποιούνται από την ομάδα ρικετσιών των κηλιδωδών πυρετών (Spotted fever group -SFG) λόγω διαφορετικών πρωτεϊνών στην μεμβράνη του βακτηρίου. Σε αντίθεση με τα μέλη του SFG που εκφράζουν τις πρωτεΐνες επιφανείας ompA, ompB και έχουν διασταυρούμενη αντίδραση με τον ορότυπο OX2 του *Proteus vulgaris* τα μέλη της ομάδας TG εκφράζουν μόνο την ompB και έχουν διασταυρούμενη αντίδραση με αντιγόνα του ορότυπου OX19 του *P. vulgaris*. Στη διαφορετική αντίδραση στους ορότυπους του *P. vulgaris* βασίζεται και το Weil–Felix test που μπορεί να γίνει σε πλάκα ή σωληνάριο<sup>157</sup>.

Ένας τρόπος για να διαπιστωθεί με μικροσκόπηση το βακτήριο σε δείγματα εντόμων είναι η χρώση Giménez που περιλαμβάνει επεξεργασία της αιμολέμφου του εντόμου με την βασική χρώση φουξίνης με φόντο πράσινο του μαλαχίτη<sup>158</sup>.

Η απομόνωση του βακτηρίου μπορεί να γίνει επιτυχώς στον λεκιθικό σάκο εμβρυοφόρου αυγού όρνιθας ωστόσο ανάπτυξη σε κυτταροκαλλιέργειες αποδίδει καλύτερα αποτελέσματα<sup>159</sup>. Κυτταρικές σειρές κατάλληλες για καλλιέργεια είναι οι Vero ATCC-CCL81 (*Cercopithecus aethiops* kidney, L929 (*Mus musculus* fibroblasts, ενώ με πιο φτωχά αποτελέσματα η HEL (Human embryonic lung)<sup>160</sup>. Απομονώσεις *R. typhi* έχουν επιτευχθεί από δείγματα τρωκτικών, αρθροπόδων και ανθρώπων. Φαίνεται πως καλύτερα αποτελέσματα για την απομόνωση σε ανθρώπινα δείγματα έχει η χρήση κυττάρων Vero σε καλλιεργητικό υλικό MEM με την προσθήκη FBS 5% στους 33 °C με 5% ατμόσφαιρα CO<sub>2</sub><sup>161</sup>.

Η *R. typhi* εισβάλλει στο ενδοθηλιακό κύτταρο μέσω προκαλούμενης από αυτή φαγοκυττάρωσης (**Εικόνα 15**) Σε αντίθεση με τις ρικέτσιες του SFG που εξέρχονται σημειακά από τη μεμβράνη του κυττάρου μέσω προεκβολών που κινητοποιούνται από την F-ακτίνη, οι *R. typhi* συγκεντρώνονται ενδοκυτταρικά και απελευθερώνονται μέσω της ρήξης το κυττάρου (**Εικόνα 16**). Η διάρρηξη της κυτταρικής μεμβράνης φαίνεται να προκαλείται από φωσφολιπάσες ή πρωτεϊνάσες του ίδιου του βακτηρίου ή μέσω κάποιας άλλης βιοχημικής οδού που όμως προκαλείται από την παρουσία του βακτηρίου.

Η κίνηση των ρικετσιών εντός του κυτταροπλάσματος γίνεται μέσω κάποιας αλληλεπίδρασης της F-ακτίνης του κυττάρου ξενιστή (**Εικόνα 17**).

Στην αντίδραση από πλευράς ξενιστή καταλογίζεται μέρος – άγνωστο ακριβώς πόσο και ποιο – της κλινικής εικόνας. Οι ίδιοι οι πολυσακχαρίτες της μεμβράνης των βακτηρίων δε

φαίνεται να συμμετέχουν στην καταστροφή των κυττάρων καθώς φαίνεται να μην έχουν ιδιαίτερη βιοτοξικότητα. Οι πολλαπλοί τραυματισμοί των ενδοθηλιακών κυττάρων αυξάνουν τη διαπερατότητα των αγγείων και έτσι δημιουργείται έξοδος ενδοαγγειακών υγρών σε ιστούς (οίδημα), μείωση του όγκου του αίματος, κακή αιμάτωση των ζωτικών οργάνων. Από τις διαδικασίες φλεγμονής, πήξης και λειτουργικής διαταραχής της μικροκυκλοφορίας μπορεί να επισυμβεί βλάβη σε όργανα όπως ο εγκέφαλος, πνεύμονες και να δημιουργηθούν υποδόριες αιμορραγίες (εμφάνιση αιμορραγικού εξανθήματος)<sup>162 163</sup>.



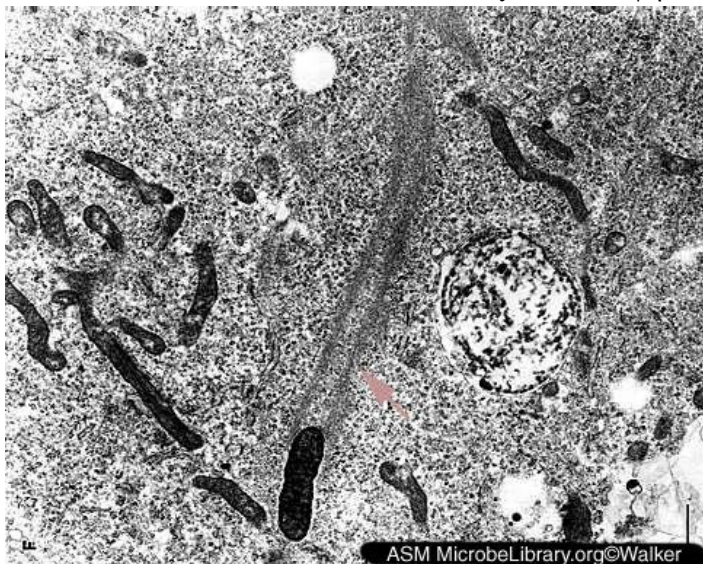
**Εικόνα 15** Η προσκόλληση των ρικετσιών στην επιφάνεια του ενδοθηλιακού κυττάρου ακολουθείται από προκαλούμενη από το βακτήριο φαγοκυττάρωση. Ακολούθως η μεμβράνη του φαγοσωματίου διαλύεται απελευθερώνοντας ρικέτσιες στο κυτταρόπλασμα (η μπάρα κάτω αριστερά αντιστοιχεί σε 0,5  $\mu\text{m}$ ). Bacteriology – Chapter 21, *Rickettsia, Orientia, Ehrlichia, Anaplasma, Coxiella and Bartonella*, Microbiology and Immunology Online. University of South Carolina, School of Medicine.

(Πηγή: <https://www.microbiologybook.org/mayer/rickettsia.htm> University of South Carolina, School of Medicine, Prof. emer. Gene Mayer, επίσκεψη στον ιστότοπο: 11-07-2020).



**Εικόνα 16** Αφού εισέλθουν στο εσωτερικό του κυττάρου οι ρικέτσιες πολλαπλασιάζονται με κυτταρική διαίρεση δημιουργώντας μεγάλους αριθμούς ενδοκυτταρικών βακτηρίων.

(Πηγή: <https://www.microbiologybook.org/mayer/rickettsia.htm> University of South Carolina, School of Medicine, Prof. emer. Gene Mayer, επίσκεψη στον ιστότοπο: 11-07-2020)



**Εικόνα 17** Οι ρικέτσιες κινούνται μέσα στο κυτταρόπλασμα μέσω ενός μηχανισμού που σχετίζεται με τον πολυμερισμό της κυτταρικής F-actin δημιουργώντας χαρακτηριστική ουρά κομήτη (βέλος). Bacteriology – Chapter 21, *Rickettsia, Orientia, Ehrlichia, Anaplasma, Coxiella and Bartonella*, Microbiology and Immunology Online. University of South Carolina, School of Medicine.

(Πηγή: <https://www.microbiologybook.org/mayer/rickettsia.htm> University of South Carolina, School of Medicine, Prof. emer. Gene Mayer, επίσκεψη στον ιστότοπο: 11-07-2020)

Οι μηχανισμοί και τα αντίστοιχα γονίδια που επιτρέπουν στην *R. typhi* και γενικότερα στις ρικέτσιες να εισβάλουν στο ενδοθηλιακό κύτταρο και να προκαλέσουν νόσο δεν είναι απόλυτα γνωστοί. Φαίνεται ότι σημαντικό ρόλο παίζουν αιμολυσίνες, ένζυμα που βοηθούν στην ενδοκυτταρική επιβίωση και φωσφολιπάσες που επιτρέπουν στη ρικέτσια να εξέλθει από το λυσοσωμάτιο.

Η αιμόλυση είναι ένας παθογενετικός μηχανισμός ιδίως για τις ρικέτσιες του τύφου. Στην *R. typhi* έχουν βρεθεί δύο σχετικά γονίδια *tlyA* (RT0543) και *tlyC* (RT0725) που κωδικοποιούν πρωτεΐνες που προάγουν αιμόλυση<sup>16</sup>.

Η ινβασίνη A (InvA) είναι μια πρωτεΐνη που δημιουργεί ATP ενδοκυτταρικά προσφέροντας στο βακτήριο πιο ευνοικό για την επιβίωση περιβάλλον<sup>164</sup>.

Η δισμουτάση του υπεροξειδίου του υδρογόνου (iron-associated superoxide dismutase-*sodB*) παρέχει στο βακτήριο προστασία από τις δραστικές μορφές οξυγόνου (reactive oxygen species – ROS) συμβάλλοντας στην επιβίωσή του εντός του κυττάρου-στόχου<sup>16</sup>.

Εικάζεται ότι η ρικέτσια χρησιμοποιεί φωσφολιπάση-A για να διαφύγει από το λυσοσωμάτιο εντός του κυττάρου όσο και για τη διάτρηση της κυτταρικής μεμβράνης και την έξοδο του στον εξωκυττάριο χώρο. Συγκεκριμένα έχουν διαπιστωθεί φωσφολιπάσες A2 (PLA<sub>2</sub>) με δραστηριότητα πατατίνης 1 και 2 (Pat1 και Pat2) και κυτταροπαθογόνο δράση που ενίονται από τη ρικέτσια στο κύτταρο στόχο<sup>165</sup>. Η PLA<sub>2</sub> φαίνεται ότι δημιουργεί βλάβη στη μεμβράνη του κυττάρου στόχου και εν συνεχεία προκλητή φαγοκυττάρωση<sup>119</sup>. Το κύτταρο αντιδρά με αντανεκλαστική εγκόλπωση της βλάβης όμως στη δημιουργηθείσα κοιλότητα περιέρχεται και το βακτήριο όπου έτσι εισέρχεται ενδοκυτταρικά και κατόπιν, από το ίδιο σημείο της αρχικής βλάβης της μεμβράνης του εγκοιλώματος, διαφεύγει στο εσωτερικό του ενδοθηλιακού κυττάρου<sup>119</sup>. Η δράση των φωσφολιπασών κατά την είσοδο αλλά και κατά την έξοδο της ρικέτσιας θεωρείται υπεύθυνη για σημαντικό μέρος της παθονου δράσης του βακτηρίου καθώς η κυτταροτοξικότητα αναστέλλεται με την προσθήκη αναστολέων της φωσφολιπάσης<sup>166</sup>. Ένα ορθόλογο μόριο του γονιδίου *pldA* που κωδικοποιεί πρωτεΐνη με δραστηριότητα φωσφολιπάσης D, ανευρίσκεται στη *R. typhi*<sup>167</sup>. Η δημιουργία κοιλοτήτων στην κυτταρική μεμβράνη και η επακόλουθη είσοδος του βακτηρίου γίνεται και με την επενέργεια των κλαθρίνη και καβεολίνη-2 μηχανισμών (clathrin και caveolin-2)<sup>168</sup>. Έχουν επίσης διαπιστωθεί πρωτεΐνες επιφανείας που συμβάλλουν στην είσοδο στο κύτταρο ξενιστή. Αυτές περιλαμβάνουν την *omp1* (RT0150), την *nlpD* (RT0291), και ένα ορθόλογο μόριο της *Salmonella enterica* serovar Typhimurium virulence factor *mviN* (RT0579).

Έχει διαπιστωθεί αλληλεπίδραση της *ompB* της *R. typhi* με τη Ku70, μιας πρωτεΐνης που εντοπίζεται στην μεμβράνη των κυττάρων στόχων, που φαίνεται να συνδέεται με την

ενδοκυτταρική διείσδυση με φαγοκυττάρωση που συμβαίνει σχεδόν άμεσα μετά την προσκόλληση. Η Ku70 είναι στην ουβικινομένη μορφή της (ubiquitinated form), κάτι που συμβαίνει με την επίδραση της λιγκάσης της ουβικιινόνης (ubiquitin-ligase)<sup>123</sup>.

Φαίνεται ότι διάφοροι μηχανισμοί που ενεργοποιούνται από το βακτήριο παίζουν ρόλο στην προσβολή των ενδοθηλιακών κυττάρων που σε αυτούς εμπλέκονται φυσιολογικά κυτταρικά ένζυμα όπως η Cdc42 (μία Rho GTPάση που σχετίζεται με τον ακτίνη του κυτταροσκελετού), η φωσφατιδιλινοσιτόλη 3-κινάση (phosphoinositide 3-kinase), η c-Src και διάφορες άλλες τυροσινικές κινάσες (tyrosine kinases) αλλά και στην ενεργοποίηση των πρωτεϊνών του συμπλέγματος Arp2/3 που επηρεάζουν τον ακτινοσκελετό του κυττάρου.

Άλλα 12 γονίδια που σχετίζονται με λιποπολυσακχαρίτες έχουν ανακαλυφθεί και ακόμα 16 γονίδια που σχετίζονται με το εκκριτικό σύστημα τύπου IV (IV secretion system) και πέντε γονίδια που έχουν σχέση με το σύστημα διαμεμβρανικής μεταφοράς<sup>16</sup>. Συγκεκριμένα, η ανάλυση του γονιδιώματος της *R. typhi* ανέδειξε πέντε αυτομεταφερόμενες πρωτεΐνες (autotransporter proteins): Sca1 (RT0015), Sca2 (RT0052), Sca3 (RT0438), Sca4 (RT0485), and OmpB (RT0699)<sup>169</sup>.

Η κίνηση της *R. typhi* εντός του κυττάρου ξενιστή βασίζεται στον πολυμερισμό της εντός του κυτταροπλάσματος F-ακτίνης ωστόσο φαίνεται ότι δεν έχει τη δυνατότητα να πραγματοποιεί ευθεία ομαλή κίνηση αλλά κινείται σε κυκλικές διαδρομές<sup>16</sup>.

## *Rickettsia typhi*

### 3.4 Γονιδίωμα

Το γονιδίωμα του *R. typhi* είναι ένα μονήρες κυκλικό χρωματόσωμα αποτελούμενο από 1.111.496 βάσεις με περιεκτικότητα σε κυτοσίνη-γουανίνη 28,9%. Η *R. typhi* όπως και όλες οι ρικέτσιες, περιέχει αριθμό ψευδοχρωμοσωμάτων, αναφέρονται περί τα 41, χρωμοσωμάτων δηλαδή που συνδέονται με την παραγωγή μη λειτουργικών πρωτεϊνών<sup>170</sup>.

Από τη *R. typhi* απουσιάζει ολόκληρο το σύστημα της οξειδάσης του κυτοχρώματος c (cytochrome c oxidase pathway) και όλα τα γονίδια που κωδικοποιούν την οξειδάση του κυτοχρώματος c ή τις σχετικές με το σύστημα αυτό πρωτεΐνες εμφανίζονται αλλοιωμένα και πιθανώς μη λειτουργικά. Το μοναδικό διαθέσιμο σύστημα της οξειδάσης CydAB (RT0207 και RT0208), εμφανίζεται να είναι τύπου d (d-type) που συνδέεται με καταστάσεις χαμηλού διαθέσιμου οξυγόνου<sup>171</sup>. Καθώς το τύπος αυτός συνδέεται με μεγαλύτερη συνοχή με το οξυγόνο, μπορεί να απελευθερώνει ηλεκτρόνια με μικρότερη συχνότητα και ποσότητα στο περιβακτηριακό νερό και ίσως να εξηγεί τα αμβληγρά συμπτώματα της νόσου σε σχέση με τη άλλη ρικέτσια της ομάδας του τύπου, την *R. prowazekii*.

Το πλήρες γονιδίωμα της *R. typhi* (στέλεχος Wilmington) είναι καταχωρημένο στη GenBank (Πίνακας 12).

**Πίνακας 12** Καταχωρημένο γονιδίωμα αναφοράς *R. typhi* στη GenBank

Γονιδίωμα αναφοράς (Reference genome)	RefSeq	INSDC <sup>1</sup>	Μέγεθος (Mb)	GC%	Γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες	rRNA	tRNA	Άλλα RNA	Γονίδια	Ψευδογονίδια
<i>Rickettsia typhi</i> str. <i>Wilmington</i>	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/RefSeq/assembly/NC_006142.1">NC_006142.1</a>	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/INSDC/assembly/AE017197.1">AE017197.1</a>	1,11	28,9	<a href="#">817</a>	3	33	4	875	18

<sup>1</sup> International Nucleotide Sequence Database Collaboration

Πηγή: NCBI <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (16-05-2020).

Ο μοριακός έλεγχος για *R. typhi* μπορεί να ξεκινήσει από μία αρχική μέθοδο διαλογής (screening) που θα μπορούσε να είναι μία qPCR με στόχο το ειδικό για τις ρικέτσιες της ομάδας του τύφου Rpr 247p γονίδιο<sup>172</sup> ή τα κοινά για *Rickettsia* γονίδια που κωδικοποιούν τις *gltA*, *ompA* ή/και *omp17-kd* πρωτεΐνες της βακτηριακής μεμβράνης<sup>173</sup>, και να ολοκληρωθεί με επιβεβαιωτική qPCR που στοχεύει ειδικούς στόχους για *R. typhi* σε περιοχές του γονιδίου της γλυκοτρανσφεράσης (glycosyltransferase, GTF) του συστήματος Rpr 331<sup>137</sup>, της *ompB*<sup>174 135</sup>, ή/και της *gltA*<sup>175 176</sup>.

Εναλλακτικά ή και ταυτόχρονα με τις ως άνω μεθόδους μπορούν να πραγματοποιηθούν PCR με στόχο τα γονίδια για *gltA*, *ompA* ή/και *ompB* και αλληλούχιση στα προϊόντα της PCR αντίδρασης<sup>177</sup>.

Οι νέες μέθοδοι που στηρίζονται στην αλληλούχιση νέας γενιάς (16S Next Generation Sequencing) διερευνώνται για εφαρμογή σε ευρύτερη κλινική κλίμακα όπως η ανίχνευση σε δείγμα πλάσματος από το αίμα του ασθενούς ακυτταρικού μικροβιακού DNA *R. typhi* (ποσότητα συνολικών μορίων μικροβιακού DNA/μL πλάσματος) ή και άλλων δυσδιάγνωστων παθογόνων όταν η ταχύτητα είναι κομβική για τη λήψη θεραπευτικών αποφάσεων<sup>178</sup>.

Η δοξυκυκλίνη είναι το αντιβιοτικό εκλογής για την αντιμετώπιση της *R. typhi* καθώς ο μικροοργανισμός ανθίσταται σε αρκετά άλλα αντιβιοτικά όπως βήτα-λακτάμες, γενταμυκίνη και τριμεθοπρίμη-σουλφαμεθοξαζόλη<sup>179</sup>.

Η ανάλυση του γονιδιώματος δείχνει μηχανισμούς αντοχής τόσο ειδικούς όσο και μη ειδικούς. Ένα ορθόλογο μόριο της μεταλλο-β-λακταμάσης βρέθηκε σε *R. typhi* (RT0428) όπως επίσης στο τοίχωμα πεπτιδογλυκάνης του βακτηρίου εντοπίστηκαν πρωτεΐνες που δεσμεύουν την πενικιλίνη (penicillin-binding proteins).

Η αντίσταση στη τριμεθοπρίμη-σουλφαμεθοξαζόλη ενδεχομένως οφείλεται στην απουσία ενζύμων του κύκλου του φολικού οξέως στο βακτήριο, ενώ στην γενταμυκίνη στο γεγονός ότι το μικρόβιο είναι ενδοκυτταρικό ενώ το αντιβιοτικό αυτό ασκεί κυρίως εξωκυτταρική δράση<sup>16 180</sup>.



Ο ενδημικός τύφος (endemic typhus, murine typhus) εμφανίζεται με πυρετό, κεφαλαλγία και μυαλγία και οδηγεί σε πολυσυστηματική νόσο που περιλαμβάνει προσβολή του ενδοθηλίου του εγκεφάλου, πνεύμονα, ήπατος, νεφρού και καρδιάς, διάχυτη κυψελιδική βλάβη, διάμεση πνευμονία, πνευμονικό οίδημα, μυοκαρδίτιδα, νεφρίτιδα, καθώς και υποδόριες και υποβλεννογόνιες αιμορραγίες.

Οι κλινικές εκδηλώσεις ξεκινούν μετά από 7 έως 14 ημέρες επώασης και οι συχνότερες είναι πυρετός, μυοσκελετικός πόνος, κεφαλαλγία. Το εξάνθημα εμφανίζεται συνήθως από την 5<sup>η</sup> μέρα των συμπτωμάτων σε 60-70% των περιπτώσεων και διαρκεί κάπου τέσσερις ημέρες. Είναι κηλιδοβλατιδώδες λεπτό και αφορά τον κορμό και τα άκρα, σεβόμενο όμως παλάμες και πατούσες. Επιπλοκές εμφανίζονται σε λιγότερο από 10%, σοβαρές επιπλοκές σε 2-4% και η θνητότητα είναι 0-1%, ωστόσο οι εκδηλώσεις μπορεί να είναι αρκετά σοβαρές (μηνιγγοεγκεφαλίτιδα, διάμεση πνευμονία και διάχυτες αγγειακές βλάβες με αιμορραγίες)<sup>181 182</sup>. Η θνητότητα συνδέεται με αιμογλοβιναϊκές ανωμαλίες, μεγάλη ηλικία, καθυστερημένη έναρξη ή απουσία θεραπευτικής αγωγής<sup>163</sup>.

Αξίζει να σημειωθεί όμως ότι αυτό που θεωρείται κλασσική παρουσίαση δηλαδή η τριάδα πυρετού, εξανθήματος και κεφαλαλγίας εμφανίζεται μόνο σε 30% των κρουσμάτων που προσέρχονται για ιατρική βοήθεια με τους υπόλοιπους ασθενείς να παρουσιάζουν κακουχία, ρίγη, επιπεφυκίτιδα και σπληνομεγαλία<sup>183</sup>.

Τα μη ειδικά συμπτώματα σε συνδυασμό με την απουσία εργαστηριακού ελέγχου κατά το οξύ στάδιο της νόσου, συχνά οδηγούν σε λανθασμένη διάγνωση ή/και υποδιάγνωση. Ο αυτοπεριοριζόμενος χαρακτήρας του νοσήματος στη μεγάλη πλειοψηφία των κρουσμάτων καθιστά ακόμα δυσκολότερη τη διάγνωση και καταγραφή των κρουσμάτων<sup>184</sup>.

Οι αρουραίοι θεωρούνται η κλασσική αποθήκη του παθογόνου στη φύση όμως και άλλα ζώα έχειδειχθεί ότι μπορεί να είναι φορείς όπως ποντικοί, ασβοί, ρακούνες ή άλλα είδη<sup>185</sup>. Ιδίως τα opossums αλλά και οι γάτες ως ξενιστές και οι κοσμοπολίτικοι ψύλλοι τους (*Ctenocephalides felis*) ως διαβιβαστές, έχει περιγραφεί ότι μπορεί να διατηρούν ένα αστικό κύκλο μετάδοσης ενδημικού τύφου<sup>15 186 187</sup>. Οι ίδιοι οι ψύλλοι εξάλλου λειτουργούν και ως αποθήκες του παθογόνου καθώς έχει καταγραφεί συγγενής μετάδοση σε επόμενες γενεές αυτών των εντόμων, τουλάχιστον όσο αφορά τον κλασσικό ψύλλο των αρουραίων (*Xenopsylla cheopis*)<sup>188</sup>. Ο

ενδημικός τύφος έχει σημαντική παγκόσμια εξάπλωση και κυρίως απαντάται σε πόλεις με λιμάνια και ναυτική δραστηριότητα<sup>189</sup>. Η νόσος παρουσιάζει εποχικότητα με τάση να εμφανίζεται μεγαλύτερη συχνότητα κρουσμάτων τους θερμούς μήνες του έτους. Προσβάλλονται όλες οι ηλικιακές ομάδες, συχνότερα όμως τα παιδιά. Η διαβίωση σε περιοχές περισσότερο αγροτικές σε συνθήκες διαβίωσης πιο υπαίθριες και το χαμηλότερο επίπεδο διαβίωσης φαίνεται ότι συνδέεται με αυξημένα κρούσματα<sup>163</sup>.

Ο ενδημικός τύφος έχει την τάση να εμφανίζεται ως επιδημικές συρροές, είναι συχνά υποδιαγνωσμένος και συνδέεται με περιοχές με πληθώρα αρουραίων και ψύλλων. Στις Ηνωμένες πολιτείες συγκεκριμένες περιοχές συνδέονται με συχνή εμφάνιση κρουσμάτων και φαίνεται ότι υπάρχει ένας κύκλος διατήρησης του βακτηρίου με opossums, γάτες και κοινούς ψύλλους των κατοικίδιων ζώων (*Ctenocephalides felis*) όπου η μετάδοση στον άνθρωπο γίνεται μέσω τσιμπήματος από ψύλλο<sup>15 187 190</sup>.

Στην Ελλάδα υπάρχουν επίσης ενδείξεις ενδημικότητας της νόσου<sup>191 192</sup>. Σε παλαιότερη έρευνα είχε βρεθεί φορεία αντισωμάτων σε ποσοστό 2% σε κατοίκους της βόρειας Ελλάδας και η ενασχόληση με αγροτικές δραστηριότητες είχε συνδεθεί με αυξημένη συχνότητα IgG αντισωμάτων κατά της *R. typhi* ενώ αυτοί που ήταν θετικοί είχαν σημαντικά μεγαλύτερο μέσο όρο ηλικίας σε σχέση με τους μη θετικούς<sup>193</sup>. Η ενασχόληση με αγροτικά επαγγέλματα και η μεγαλύτερη ηλικία αναφέρεται και αλλού ως παράγοντας κινδύνου για παρουσία αντισωμάτων κατά της *R. typhi*<sup>194</sup>.

## ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### Ειδικό μέρος

### 2.1 Εισαγωγή

Η μελέτη αυτή επικεντρώθηκε στην περιοχή της Αττικής και εστίασε στα παρακάτω

(α) ανίχνευση *Rickettsia* spp., *Rickettsia felis* και *Rickettsia typhi* και *Bartonella* spp., και ειδών *Bartonella*, σε κοινούς ψύλλους ζώων συντροφιάς

(β) σύγκριση των μεθόδων για μοριακή διάγνωση για *R. felis* και *R. typhi*

(γ) διερεύνηση του 16S rDNA με αλληλούχιση νέας γενιάς του μικροβιώματος κοινών ψύλλων ζώων συντροφιάς για γένη και είδη βακτηρίων που συγκαταλλέγονται στα αναγνωρισμένα ως παθογόνα για τον άνθρωπο

(δ) εκτίμηση της φορείας αντισωμάτων στον πληθυσμό για παθογόνα που σχετίζονται με ψύλλους με συνακόλουθη επιδημιολογική ανάλυση και διερεύνηση παραγόντων κινδύνου.

### Ειδικό μέρος

### 2.2 Υλικό – μέθοδος

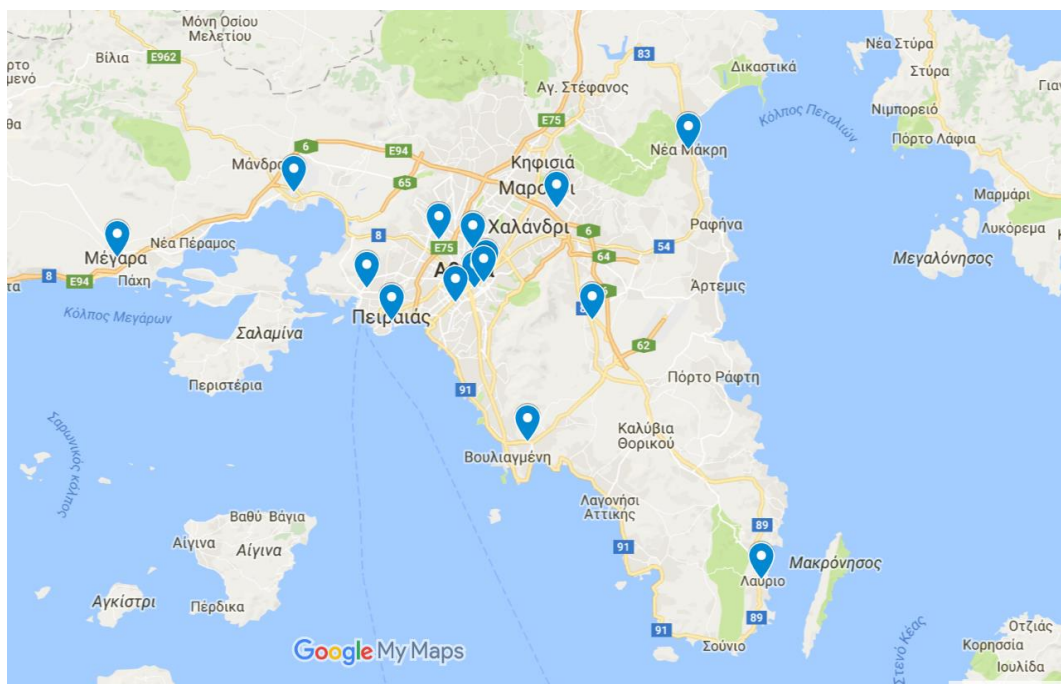
#### 2.2.1 Συλλογή πρωτογενούς υλικού

##### 2.2.1.1 Ψύλλοι ζώων συντροφιάς

Κατά την περίοδο 2016-2017 από δίκτυο συνεργαζόμενων κλινικών μικρών ζώων (N=15) στην περιοχή της Αττικής συλλέχθηκαν ψύλλοι από τα εξεταζόμενα ζώα (**Εικόνα 18**).

Οι ψύλλοι τοποθετήθηκαν από τους κτηνιάτρους κατά ζώο-ξενιστή σε πλαστικούς αποστειρωμένους περιέκτες και διατηρήθηκαν στην κατάψυξη με αναγραφόμενα το είδος ζώου, ηλικία, φύλο, κατάσταση δεσποζόμενου ή αδέσποτου και περιοχή κατοικίας.

Στη συνέχεια τα έντομα ταυτοποιήθηκαν στον Τομέα Παρασιτικών και Τροπικών Νόσων της Εθνικής Σχολής Δημόσιας Υγείας (πλέον Σχολή Δημόσιας Υγείας, Τμήμα Πολιτικών Υγείας του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής) υπό μεγέθυνση 100X με την χρήση ταξονομικών κλειδών<sup>195</sup> και διαχωρίστηκαν σε ομάδες (δείγματα -pools), κατά ζώο-ξενιστή, γένος, είδος και φύλο εντόμων και καταμετρήθηκε ο αριθμός ψύλλων του κάθε δείγματος.



**Εικόνα 18** Κλινικές Μικρών Ζώων στην Αττική από όπου προήλθαν τα δείγματα ψύλλων.

Τα δείγματα, ομαδοποιημένα κατά αυτόν τον τρόπο τοποθετήθηκαν σε πλαστικά σωληνάρια 1,5 mL, εμβαπτίστηκαν σε αιθανόλη 95% και διατηρήθηκαν σε κατάψυξη ( $\leq -18^{\circ}\text{C}$ ). Από τα συλλεχθέντα δείγματα ένας προκαθορισμένος αριθμός (100), αποτελούμενος μόνο από δείγματα που περιείχαν θηλυκά έντομα, επιλέχθηκαν για εργαστηριακή ανάλυση. Τα κριτήρια επιλογής περιελάμβαναν την μεγαλύτερη δυνατή γεωγραφική κάλυψη της Αττικής και την ικανή αντιπροσώπευση σκύλων και γατών, κατηγοριοποιημένων κατά δεσποζόμενα και αδέσποτα, ηλικία και φύλο.

#### 2.2.1.2 Οροί αίματος ανθρώπων

Τα δείγματα ορών αίματος συλλέχθηκαν από άτομα που επισκέπτονταν ιδιωτικά μικροβιολογικά εργαστήρια στην Αττική, την περίοδο Μάρτιος 2017 έως Μάιος 2018. Οι συμμετέχοντες αφού ενημερώθηκαν για τον σκοπό της μελέτης συγκατατέθηκαν να χορηγήσουν δείγμα αίματος και απάντησαν σε επιδημιολογικού τύπου ερωτήσεις. Οι πληροφορίες που ελήφθησαν αφορούσαν ηλικία (ηλικιακές ομάδες: 1=2-14 έτη, 2=15-29 έτη, 3=30-50 έτη and 4>50 έτη), φύλο, περιοχή κατοικίας, επάγγελμα, κηπουρικές ή αγροτικές δραστηριότητες, αίσθηση τσιμπημάτων από έντομα πλην κουνουπιών, επαφή με ζώα συντροφιάς, συστηματική εφαρμογή αντιψυλλικής

αγωγής στα ζώα συντροφιάς, αμυχές στα χέρια από όνυχες γαλής και συχνότητα ανεύρεσης ψύλλων στα ζώα συντροφιάς.

## 2.2.2 Εργαστηριακές τεχνικές

### 2.2.2.1 Εκχύλιση του DNA των ψύλλων

Η απομάκρυνση της επιφανειακής χλωρίδας από τους εξωσκελετούς των εντόμων του κάθε δείγματος πραγματοποιήθηκε με μία σειρά πλύσεων και μηχανική ανάδευση σε αιθανόλη 70% σύμφωνα με το πρωτόκολλο της Andrews (2013)<sup>196</sup>:

1. Πλύση των ψύλλων με 200 μl υδατικού διαλύματος 70% αιθανόλης με ανεβοκατέβασμα της στάθμης του διαλύματος με τη βοήθεια πιπέτας για 2'.
2. Άφεση σε ηρεμία του δείγματος σε θερμοκρασία δωματίου με το διάλυμα για 5'.
3. Απόρριψη του διαλύματος αιθανόλης.
4. Επανάληψη του 1<sup>ο</sup> βήματος.
5. Απόρριψη του διαλύματος αιθανόλης.
6. Πλύση των ψύλλων με 200 μl molecular grade νερού με καλή ανάδευση με την βοήθεια της πιπέτας για 1'.
7. Απόρριψη του νερού και στέγνωμα των δειγμάτων στους 56°C για 10'.
8. Ομογενοποίηση με χρήση αποστειρωμένου πλαστικού στυλεού (συνήθης στυλεός με κρίκο για επίστρωση δειγμάτων για καλλιέργειες) για τουλάχιστον 1,5 λεπτό ή όσο απαιτείται, ανάλογα και με τον αριθμό των ψύλλων, έως πλήρους συνθλίψεως των εντόμων.

Η εκχύλιση του DNA από το κάθε δείγμα επετεύχθη με το QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή και την χρήση του tissue protocol και το προϊόν εκχύλισης διατηρήθηκε σε συνθήκες κατάψυξης -20° C μέχρι τη περαιτέρω επεξεργασία του.

Συγκεκριμένα η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την εκχύλιση του DNA ήταν η εξής:

1. Στο ομογενοποιημένο υλικό του κάθε δείγματος ψύλλων προστέθηκε 180 μL ρυθμιστικό διάλυμα λύσης ιστών (ATL) και 20 μL διαλύματος πρωτεϊνάσης K (δραστηριότητας 600

- mAU/ml) και αφέθηκαν υπό αργή ανάδευση στους 56 °C έως την επόμενη ημέρα σε θερμομπλόκ Eppendorf thermomixer comfort (Eppendorf AG, Hamburg, Germany)
2. Προστέθηκε στο μίγμα 200 μL ρυθμιστικό διάλυμα (AL) περιέχον χαοτροπικά άλατα και το μίγμα αφέθηκε στους 75° για 10' και στην συνέχεια έγινε απενεργοποίηση των ενζύμων στους 95° για 15'
  3. Το μίγμα αναδεύτηκε έντονα για 15' στις 12.000 στροφές/min<sup>-1</sup> (vortex)
  4. Προστέθηκαν 200 μL αιθανόλης 100% και πραγματοποιήθηκε νέο vortex
  5. Το διάλυμα μεταφέρθηκε σε στήλες εκχύλισης (QIAGEN™) περιέχουσες πυρίτιο και και φυγοκεντρήθηκε στα 6000 x g για 1' σε μικροφυγόκεντρο Hermle Z233 MK-2 (Labnet, Edison, NJ, United States)
  6. Αφού απορίφθηκε το υγρό που προέκυψε από τη φυγοκέντρηση, προστέθηκαν στη στήλη 500 μL ρυθμιστικό διάλυμα (AW1) περιέχον χαοτροπικά άλατα και η στήλη φυγοκεντρήθηκε στα 6000 x g
  7. Προστέθηκε AW2 και το μίγμα φυγοκεντρήθηκε στα 20000 x g για 3'
  8. Με μία ακόμη φυγοκέντρηση στα 20000 x g για 1' απομακρύνθηκαν τυχόν υπολείματα υγρών
  9. Στη στήλη προστέθηκαν 100 μL AE και η στήλη τοποθετήθηκε σε φιαλίδιο Eppendorf
  10. Το υλικό αφέθηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 5' και κατόπιν φυγοκεντρήθηκε στα 6000 x g για 1'
  11. Το υγρό που προήλθε από τη φυγοκέντρηση με το DNA που τυχόν προέκυψε από την εκχύλιση, συλλέχθηκε και τοποθετήθηκε σε νέα φιαλίδια μικροφυγοκέντρησης 1,5 ml (microcentrifuge tubes) και συντηρήθηκε στην κατάψυξη (-20 °C) μέχρι την περαιτέρω επεξεργασία του

#### 2.2.2.2 Συμβατικές και Real-Time PCR

Στο εκχυλισμένο προϊόν αρχικά πραγματοποιήθηκε PCR (Σντμ.: PCR<sub>16sRNA</sub>) για ανίχνευση βακτηριακού DNA με στόχο το κοινό για τα βακτήρια γονίδιο που κωδικοποιεί το 16S rRNA με χρήση ολιγονουκλεοτιδιακών εναρκτηρίων αλληλουχιών<sup>197 198</sup>.

Η πραγματοποίηση της PCR<sub>16sRNA</sub> έγινε ως εξής:

Για την PCR χρησιμοποιήθηκε το διάλυμα ανάμιξης Go Taq Hot Start Colorless master mix M5133 (Promega, Madison, Wisconsin, USA) (Σντμ.: Green Mastermix). Η αντίδραση είχε

τελικό όγκο 50  $\mu\text{L}$  και περιείχε 25  $\mu\text{L}$  διάλυμα ανάμιξης, 1  $\mu\text{L}$  από κάθε εναρκτήρια αλληλουχία, 18  $\mu\text{L}$  δις-απεσταγμένο νερό, ελεύθερο από DNAάσες και RNAάσες ( $\text{dH}_2\text{O}$ ) και 5  $\mu\text{L}$  από το δείγμα. Χρησιμοποιήθηκε αρνητικός ( $\text{dH}_2\text{O}$ ) και θετικός μάρτυρας.

Το πείραμα πραγματοποιήθηκε στο θερμοκυκλοποιητή Bio-Rad Mycycler (Bio-Rad laboratories, Hercules, California, USA). Οι συνθήκες διεξαγωγής της  $\text{PCR}_{16\text{SRNA}}$  ήταν:

1. 94°C για 5΄
2. 95°C για 1΄
3. 59°C για 1΄
4. 79°C για 1,5΄
5. Επανάληψη των σταδίων 2, 3 και 4 για 30 φορές
6. 72°C για 10΄
7. Διατήρηση στους 20°C

Ο έλεγχος για *Bartonella* spp. έγινε με συμβατική PCR (Σντμ.:  $\text{PCR}_{\text{QHVE}}$ ) και στόχο την ενδομεταγραφόμενη περιοχή μεταξύ των 16S και 23S rRNA γονιδίων (ITS) η οποία αρχικώς δημιουργήθηκε για τα *B. vinsonii*, *B. elizabethae*, *B. quintana*, και *B. henselae*<sup>4 199 200</sup>. Χρησιμοποιήθηκε μόνο αρνητικός μάρτυρας ( $\text{dH}_2\text{O}$ ).

Για την  $\text{PCR}_{\text{QHVE}}$  χρησιμοποιήθηκε το Go Taq Hot Start Green Mastermix M5123 (Promega). Η αντίδραση είχε τελικό όγκο 25  $\mu\text{L}$  και περιείχε 12,5  $\mu\text{L}$  διάλυμα ανάμιξης, 1  $\mu\text{L}$  από κάθε εναρκτήρια αλληλουχία, 9,5  $\mu\text{L}$   $\text{dH}_2\text{O}$  και 1  $\mu\text{L}$  από το δείγμα. Χρησιμοποιήθηκε αρνητικός ( $\text{dH}_2\text{O}$ ) και θετικός μάρτυρας.

Οι συνθήκες διεξαγωγής της  $\text{PCR}_{\text{QHVE}}$  ήταν:

1. 95°C για 5΄
2. 95°C για 1΄
3. 52°C για 1΄
4. 72°C για 2΄
5. Επανάληψη των σταδίων 2, 3 και 4 για 35 φορές
6. 72°C για 10΄
7. Διατήρηση στους 20°C

Η ηλεκτροφόρηση των προϊόντων των συμβατικών PCR πραγματοποιήθηκε σε γέλη αγαρόζης 2% w/v που περιείχε 10% TBE Buffer (1M Tris, 1M Orthoboric Acid και 2mM Na+EDTA) και 5  $\mu$ L βρωμιούχο αιθίδιο/100 ml, με εφαρμοζόμενη σταθερή τάση 120 V για διάρκεια τουλάχιστον 30' και μέγιστη 45'. Φωτογραφικές λήψεις στιγμιότυπων της ηλεκτροφόρησης πραγματοποιήθηκαν σε περιβάλλον υπεριώδους φωτισμού (UV) με το Biorad Universal Hood II (Bio-Rad Laboratories, Milan, Italy). Για τον υπολογισμό του μεγέθους των βάσεων των προϊόντων πολλαπλασιασμού χρησιμοποιήθηκε μάρτυρας (DNA ladder) διακριτικότητας 100 bp (Nippon genetics, Tokyo, Japan).

Τα δείγματα στην συνέχεια ελέγχθηκαν για το γένος *Rickettsia* με Real-Time PCR (qPCR) και στόχους στο γονίδιο που κωδικοποιεί την κιτρική συνθάση (citrate synthase - *gltA*), με (α) μία εμπορική μέθοδο (Primerdesign™ genesig™ Standard Kit for Rickettsia (all species), Citrate synthase (*gltA*) gene (Primerdesign Ltd., Camberley, UK) (Σντμ.: qPCR<sub>*gltA1*</sub>) και (β) με μία in-house μέθοδο, σύμφωνα με Socolovschi et al. (2010)<sup>111</sup> (Σντμ.: qPCR<sub>*gltA2*</sub>).

Για την qPCR<sub>*gltA1*</sub> χρησιμοποιήθηκε το διάλυμα ανάμιξης Kapa Probe Fast qPCR Master Mix (2X) ABI PRISM™ (Kapa Biosystems, Wilmington, MA, USA) (Σντμ.: Kappa Mastermix). Η αντίδραση είχε τελικό όγκο 20  $\mu$ L και περιείχε 10  $\mu$ L διάλυμα ανάμιξης, 1  $\mu$ L από το έτοιμο διάλυμα με εναρκτήριες αλληλουχίες και δείκτη (Primerdesign™), 4  $\mu$ L dH<sub>2</sub>O και 5  $\mu$ L από το δείγμα. Χρησιμοποιήθηκε αρνητικός (dH<sub>2</sub>O) και θετικός μάρτυρας.

Η αντίδραση για την qPCR<sub>*gltA2*</sub> είχε τελικό όγκο 20  $\mu$ L και περιείχε 10  $\mu$ L Kappa Mastermix, 1  $\mu$ L από κάθε μία εναρκτήρια αλληλουχία, 0,5  $\mu$ L δείκτη, 2,5  $\mu$ L dH<sub>2</sub>O και 5  $\mu$ L από το δείγμα. Χρησιμοποιήθηκε μόνο αρνητικός μάρτυρας (dH<sub>2</sub>O).

Για την ανίχνευση *R. felis* χρησιμοποιήθηκαν δύο qPCR: η μία είχε με στόχο το γονίδιο της biotine synthase (*bioB*) σύμφωνα με τους Socolovschi et al. (2010) (Σντμ.: qPCR<sub>*bioB*</sub>) και η άλλη τμήμα γονιδίου ειδικό για τη *R. felis* που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη εξωτερικής μεμβράνης του βακτηρίου B (outer membrane protein B - ompB) σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Odhiambo et al. (2014)<sup>132</sup> (Σντμ.: qPCR<sub>RfeIB</sub>).

Η αντίδραση για την qPCR<sub>*bioB*</sub> είχε τελικό όγκο 20  $\mu$ L και περιείχε 10  $\mu$ L Kappa Mastermix, 1  $\mu$ L από κάθε μία εναρκτήρια αλληλουχία, 0,5  $\mu$ L δείκτη, 2,5  $\mu$ L dH<sub>2</sub>O και 5  $\mu$ L από το δείγμα. Χρησιμοποιήθηκε μόνο αρνητικός μάρτυρας (dH<sub>2</sub>O).



Η αντίδραση για τη qPCR<sub>RfeIB</sub> είχε τελικό όγκο 20  $\mu\text{L}$  και περιείχε 10  $\mu\text{L}$  Kappa Mastermix, 1,2  $\mu\text{L}$  από κάθε μία εναρκτήρια αλληλουχία, 0,6  $\mu\text{L}$  δείκτη, 2  $\mu\text{L}$  dH<sub>2</sub>O και 5  $\mu\text{L}$  από το δείγμα. Χρησιμοποιήθηκε μόνο αρνητικός μάρτυρας (dH<sub>2</sub>O).

Η ανίχνευση της *R. typhi* έγινε με qPCR με στόχο το γονίδιο που κωδικοποιεί τη γλυκοσυλτρανσφεράση (glycosyltransferase, GTF) με εναρκτήριες αλληλουχίες όπως περιγράφονται από τους Socolovschi et al. (2010)<sup>111</sup> (Σντμ.: qPCR<sub>GTF</sub>).

Η αντίδραση για την qPCR<sub>GTF</sub> είχε τελικό όγκο 20  $\mu\text{L}$  και περιείχε 10  $\mu\text{L}$  Kappa Mastermix, 1  $\mu\text{L}$  από κάθε μία εναρκτήρια αλληλουχία, 0,5  $\mu\text{L}$  δείκτη, 2,5  $\mu\text{L}$  dH<sub>2</sub>O και 5  $\mu\text{L}$  από το δείγμα. Χρησιμοποιήθηκε μόνο αρνητικός μάρτυρας (dH<sub>2</sub>O).

Οι αντιδράσεις για qPCR<sub>gltA1</sub>, qPCR<sub>gltA2</sub>, qPCR<sub>bioB</sub>, qPCR<sub>RfeIB</sub> και qPCR<sub>GTF</sub> διεξήχθησαν στο θερμοκυκλοποιητή StepOnePlus (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Ma, USA) υπό τις εξής συνθήκες:

1. 95°C για 3'
2. 95°C για 3''
3. 60°C Συνδυαστική πρόσδεση εναρκτήριων αλληλουχιών και υβριδισμός για 30''
4. Επανάληψη των σταδίων 2, 3 για 40 φορές
5. 60°C για 30'' (καταγραφή τελικού φθορισμού)
6. Διατήρηση στους 20°C

Οι εναρκτήριες αλληλουχίες και δείκτες που χρησιμοποιήθηκαν σε όλες τις PCR και qPCR τεχνικές απεικονίζονται στον **Πίνακα 13**.

**Πίνακας 13** Εναρκτήριες αλληλουχίες και οι δείκτες (forward primer/ reverse primer/ probe) που χρησιμοποιήθηκαν για τις PCR και qPCR τεχνικές για την ανίχνευση *Rickettsia* spp., *R. felis*, *R. typhi* και *Bartonella* spp.

Στόχος (άρθρο που περιγράφεται)	Εναρκτήριες αλληλουχίες / probe	
Κοινό βακτηριακό 16s rRNA	Εμπρόσθιος εκκινητής (BAc08F)	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'

(Siala et al. 2009)	Ανάστροφος εκκινητής (Uni 1390R)	5'-GACGGGCGGTGTGTACAA-3'
<i>Rickettsia</i> spp. <i>gltA</i> Primerdesign™ genesig™	Εμπρόσθιος εκκινητής	Εμπορική μέθοδος
	Ανάστροφος εκκινητής	Εμπορική μέθοδος
	Δείκτης	Εμπορική μέθοδος
<i>Rickettsia</i> spp. <i>gltA</i> (Socolovschi et al. 2010)	Εμπρόσθιος εκκινητής	GTGAATGAAAGATTACACTATTTAT
	Ανάστροφος εκκινητής	GTATCTTAGCAATCATTCTAATAGC
	Δείκτης	CTATTATGCTTGCGGCTGTCGGTTC[TAM]
<i>R. felis bioB</i> (Socolovschi et al. 2010)	Εμπρόσθιος εκκινητής	ATGTTTCGGGCTTCCGGTATG
	Ανάστροφος εκκινητής	CCGATTCAGCAGGTTCTTCAA
	Δείκτης	GCTGCGGCGGTATTTTAGGAATGGG[TAM]
<i>R. felis ompB</i> (Odhiambo et al. 2014)	Εμπρόσθιος εκκινητής	5'-TAATTTTAACGGAACAGACGGT-3'
	Ανάστροφος εκκινητής	5'-GCCTAAACTTCCTGTAACATTAAG-3'
	Δείκτης	5'-FAM-TGCTGCTGGTGGCGGTGCTA-BHQ]-3'
<i>R. typhi</i> GTF (Socolovschi et al. 2010)	Εμπρόσθιος εκκινητής	TGCTTCATGGGCAATGTCTG
	Ανάστροφος εκκινητής	TTGAGCATAAAACTGCCCTGCT
	Δείκτης	CGCTGGATTATCAAAAGAATTAGCACG[TAM]
<i>Bartonella</i> spp. (Roux et al. 1995)	Εμπρόσθιος εκκινητής (QHVE1)	TTCAGATGATGATCCCAA
	Ανάστροφος εκκινητής (QHVE4)	AACATGTCTGAATATATC

### 2.2.2.3 16S metagenomics

Το DNA του κάθε δείγματος διερευνήθηκε με αλληλούχιση νέας γενιάς (16S Next Generation Sequencing - 16S NGS) (Σντμ.: 16S) με χρήση του Ion 16S Metagenomics kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) σε μία PGM Ion Torrent platform (Thermo Fisher Scientific). Τα Metagenomics data αναλύθηκαν με το QIIME ver. 2<sup>201</sup> που παρέχεται μέσω του Ion Reporter v5.10 software (Thermo Fisher Scientific) σε αντιδιαστολή με τις βάσεις νουκλεοτιδιακών αλληλουχιών 16S rRNA, MicroSEQ v2013.1 και GreenGenes v13.5. Οι ουδοί ταυτοποίησης σε επίπεδο γένους και είδους ήταν αντίστοιχα 97% και 99%. Τα δείγματα με θετικά αποτελέσματα σε συμβατική ή real-time PCR ελέγχθηκαν και με το BLASTn εργαλείο αντιστοίχισης νουκλεοτιδικών αλληλουχιών στην επιλογή Highly similar sequences (megablast)<sup>202</sup>.

Τα προϊόντα sequencing του 16S NGS που έδωσαν *Rickettsia* genus, με ή χωρίς είδος, ελέγχθηκαν με το BLASTn για >99.0% ομολογία (% identity) με το στέλεχος αναφοράς της *R. felis* URRXCal2 (GenBank: CP000053) (σντμ.: BLAST<sub>>99</sub>) και με το *R. typhi* στέλεχος Wilmington (GenBank: AE017197.1), σύμφωνα με McLeod et al. (2004)<sup>16</sup>.

### 2.2.2.4 Επιβεβαίωση γένους *Rickettsia*, *R. felis* και *R. typhi*

Η επιβεβαίωση της *R. felis* πραγματοποιήθηκε με συνδυασμό κριτηρίων για να αποφευχθεί η υπερεκτίμηση του επιπολασμού της λόγω συνάφειας με συγγενικά φυλογενετικώς είδη, candidatus ή μη, με βάση τα εξής κριτήρια: θετικό αποτέλεσμα σε μία ή περισσότερες από τις μεθόδους ταυτοποίησης του γένους *Rickettsia* (i) 16S για γένος *Rickettsia* (ii) qPCR εμπορική για *gltA* γένους *Rickettsia* PrimerDesign™ genesig™ (σντμ.: qPCR<sub>gltA1</sub>) (iii) qPCR με βάση το πρωτόκολλο σύμφωνα με Socolonschi et al. 2010 για *gltA* γένους *Rickettsia* (σντμ.: qPCR<sub>gltA2</sub>), και επιπλέον συνδυαστικό θετικό αποτέλεσμα στην υψηλής ευαισθησίας και ειδικότητας qPCR για *R. felis* με βάση το πρωτόκολλο των Odhiambo et al. 2014 (σντμ.: qPCR<sub>RfelB</sub>) και στην qPCR για *R. felis* με βάση το πρωτόκολλο των Socolonschi et al. 2010 (σντμ.: qPCR<sub>bioB</sub>) ή θετικό αποτέλεσμα ταυτόχρονα σε qPCR<sub>RfelB</sub> και BLAST<sub>>99</sub>.

Με ανάλογο τρόπο επιδιώχθηκε η ταυτοποίηση του *R. typhi*: τα επιβεβαιωμένα δείγματα θα έπρεπε να έχουν θετικό αποτέλεσμα σε μία ή περισσότερες από τις μεθόδους ταυτοποίησης του γένους *Rickettsia* (i) 16S για γένος *Rickettsia* (ii) qPCR<sub>gltA1</sub> (iii) qPCR<sub>gltA2</sub><sup>111</sup> και επιπλέον θετικό αποτέλεσμα στην ειδική για το είδος qPCR (qPCR<sub>GTF</sub>). Σε περίπτωση θετικού αποτελέσματος σε

μία ή περισσότερες τεχνικές ταυτοποίησης γένους *Rickettsia*, χωρίς όμως θετικό αποτέλεσμα στη qPCR<sub>GTF</sub> και ανίχνευση *R. typhi* μόνο με 16S, το δείγμα θα ελάμβανε τον χαρακτηρισμό πιθανό *R. typhi*.

Δείγματα που δεν επιβεβαιώθηκαν σε επίπεδο είδους είχαν όμως δύο ή περισσότερες με θετικό αποτέλεσμα μοριακές τεχνικές για ταυτοποίηση γένους *Rickettsia* (qPCR<sub>gltA1</sub>, qPCR<sub>gltA2</sub>, 16S), ή είχαν συνδυασμό τουλάχιστον μίας θετικής μοριακής τεχνικής για το γένος *Rickettsia* και θετικό αποτέλεσμα σε μία από τις ειδικές qPCR για *R. felis*, χαρακτηρίστηκαν επιβεβαιωμένα για γένος *Rickettsia*. Ως πιθανό γένος *Rickettsia* χαρακτηρίστηκαν όσα είχαν μόνο μία ταυτοποιητική του γένους μέθοδο με θετικό αποτέλεσμα, με αρνητικό αποτέλεσμα σε όλες τις άλλες μοριακές τεχνικές.

#### 2.2.2.5 Χαρακτηρισμός γένους και ειδών *Bartonella*

Ο χαρακτηρισμός των δειγμάτων για *Bartonella* spp. πραγματοποιήθηκε με βάση τα αποτελέσματα της συμβατικής PCR (PCR<sub>QHVE</sub>): τα επιβεβαιωμένα δείγματα για γένος *Bartonella* θα έπρεπε να έχουν θετικό αποτέλεσμα στην PCR<sub>QHVE</sub> ή στην 16S. Για την επιβεβαίωση των *B. quintana*, *B. henselae*, *B. vinsonii*, *B. elizabethae*, ή άλλων ειδών *Bartonella* τα δείγματα έπρεπε να έχουν θετικό αποτέλεσμα στην PCR<sub>QHVE</sub> και τα προϊόντα της ηλεκτροφόρησης να έχουν επαρκή διακριτικότητα ώστε να μπορούν να αποδοθούν σε συγκεκριμένο είδος. Δείγματα με ανίχνευση είδους *Bartonella* μόνο στη 16S, χαρακτηρίστηκαν ως πιθανά για το είδος αυτό.

#### 2.2.2.6 Σύγκριση μοριακών τεχνικών για την επιβεβαίωση *Rickettsia* spp. και *R. felis*

Η ειδικότητα και ευαισθησία της qPCR<sub>gltA1</sub>, qPCR<sub>gltA2</sub>, 16S για την ανίχνευση του γένους *Rickettsia* και των qPCR<sub>RfelB</sub>, qPCR<sub>bioB</sub> για *R. felis* προσδιορίστηκαν σε σχέση με τα δείγματα που πληρούσαν τις προϋποθέσεις για να θεωρηθούν επιβεβαιωμένα (Πίνακας 14).

#### 2.2.2.7 Μελέτη μικροβιώματος ψύλλων για δυνητικά παθογόνα βακτήρια

Με βάση το 16S αναλύθηκε το εσωτερικό μικροβίωμα των ψύλλων και διερευνήθηκε ποια από αυτά εμφανίζουν υγειονομικό ενδιαφέρον με βάση το International Statistical Classification of

Diseases and Related Health Problems by WHO (ICD-11, 2019 version). Παράλληλα η ανεύρεση γενών παθογόνων βακτηρίων υγειονομικής σημασίας αναλύθηκε σε σχέση με το ζωικό είδος (σκύλος ή γάτα), το φύλο, την κατάσταση (δεσποζόμενο ή αδέσποτο) και την ηλικία του ζώου-ξενιστή και τον αριθμό ψύλλων που περιείχε το δείγμα.

#### 2.2.2.8 Φορεία IgG αντισωμάτων

Περίπου 2 mL ορού διαχωρίστηκε από κάθε δείγμα αίματος κατόπιν φυγοκέντρησης (4,000 x g για τουλάχιστον 5' και αφού είχε προηγηθεί διατήρηση του δείγματος για τουλάχιστον 30' σε θερμοκρασία δωματίου) και αποθηκεύτηκε σε συνθήκες κατάψυξης ( $\leq -20^{\circ}\text{C}$ ). Η ανίχνευση των IgG αντισωμάτων κατά των *B. henselae*, *B. quintana* και *R. typhi* έγινε με έμμεσο ανοσοφθορισμό (indirect immunofluorescence antibody test, IFAT) με εμπορικό κιτ (Vircell™, S.L., Santa Fé, Granada, Spain), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Πραγματοποιήθηκαν συνεχόμενες κατά 50% αραιώσεις των εξεταζόμενων ορών και η υψηλότερη αραιώση που παρουσίαζε φθορισμό ήταν το τελικό αποτέλεσμα του τίτλου αντισωμάτων. Οι αραιώσεις ξεκινούσαν από 1/40 για την *R. typhi* και 1/64 για την *B. henselae* και *B. quintana* και μπορούσαν να φτάσουν έως και 1/640 για τη *R. typhi* και 1/1024 για τις *B. henselae* και *B. quintana*. Σε κάθε δοκιμή γινόταν χρήση θετικού και αρνητικού μάρτυρα. Οι αντικειμενοφόροι με τις αραιώσεις επιθεωρούνταν υπό μεγέθυνση 400X. Μία πράσινη φθορίζουσα απόχρωση (apple green fluorescence) μαρτυρούσε την παρουσία αντισωμάτων. Για την επίτευξη αντικειμενικότητας, η μικροσκοπική εξέταση επαναλαμβανόταν από ένα δεύτερο παρατηρητή ενώ σε περίπτωση διχογνωμίας το αποτέλεσμα καθοριζόταν από ένα τρίτο παρατηρητή.

Δείγματα με ανοσοφθορισμό από αραιώσεις  $\geq 1/40$  και  $\geq 1/64$  αντίστοιχα για *R. typhi* και για *Bartonella* spp., θεωρούνταν θετικά και οι αραιώσεις συνεχίζονταν μέχρι την υψηλότερη αραιώση που εμφάνιζε ανοσοφθορισμό και η οποία εκλαμβάνονταν ως ο τελικός τίτλος αντισωμάτων. Αν από τις αρχικές αραιώσεις δεν προέκυπτε ανοσοφθορισμός, το δείγμα χαρακτηριζόταν αρνητικό και δεν εξεταζόταν περαιτέρω. Αν ένα δείγμα αντιδρούσε και στη *B. quintana* και στη *B. henselae*, τα αντισώματα αποδίδονταν στο είδος που επεδείκνυε ανοσοφθορισμό στην υψηλότερη αραιώση, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

### 2.2.2.9 Στατιστικές αναλύσεις

Οι στατιστικές αναλύσεις για τη μελέτη *R. felis*, *R. typhi* και *Bartonella* spp. σε ψύλλους και τη σύγκριση ευασθησίας και ειδικότητας των μοριακών τεχνικών, για τη μελέτη δειγμάτων ορού αίματος του πληθυσμού για αντισώματα IgG κατά *B. henselae* και *B. quintana* και για τη μελέτη του μικροβιώματος των ψύλλων για δυνητικά παθογόνα βακτήρια, έγιναν με Chi-square test, binomial logistic regression, Mann-Whitney U test και t-test. Όλες οι αναλύσεις έγιναν με alpha-level στο 5% και με χρήση του στατιστικού πακέτου IBM SPSS Statistics for Windows, Version 20.0 (IBM Corporation, Armonk, NY, USA).

## Ειδικό μέρος

## 2.3 Αποτελέσματα

### 2.3.1 Ανίχνευση *Bartonella* spp., *R. felis* και *R. typhi* σε ψύλλους ζώων συντροφιάς

#### 2.3.1.1 Ζώα-ξενιστές και συλλεχθέντες ψύλλοι

Από το καλοκαίρι του 2016 έως την άνοιξη του 2017, συνολικά συλλέχθηκαν 1381 ψύλλοι που αντιστοιχούσαν σε 321 ομάδες ψύλλων από ισάριθμα ζώα (225 γάτες, 95 σκύλους και ένα κουνέλι). Από το υλικό αυτό και αφού τα έντομα ταξινομήθηκαν ανά ζώο-ξενιστή, γένος, είδος και φύλο, προέκυψαν 423 νέες ομάδες ψύλλων (δείγματα), 409, 4 και 10 *Ctenocephalides felis*, *Ctenocephalides canis* και *Pulex irritans* αντίστοιχα.

Από τα δείγματα, 100 δείγματα επιλέχθηκαν για ανάλυση, στα οποία περιλαμβάνονταν 96 δείγματα αποτελούμενα από *C. felis*, 2 δείγματα από *C. canis* και 2 δείγματα από *P. irritans*, που συλλέχθηκαν από 67 γάτες (58 αδέσποτες, 8 δεσποζόμενες και ένα αγνώστου κατάστασης, 23 αρσενικά και 44 θηλυκά) και 33 σκύλους (12 αδέσποτοι, 20 δεσποζόμενοι και ένας αγνώστου κατάστασης, 14 αρσενικά, 18 θηλυκά και ένα αγνώστου φύλου) (Πίνακας 14).

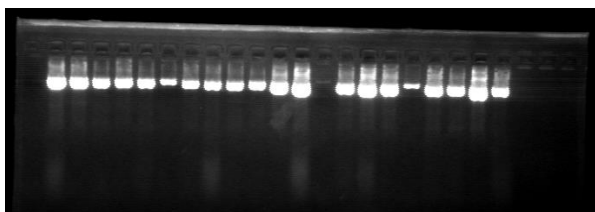
Από τα ζώα ξενιστές, 63 ήταν θηλυκά, 36 ήταν αρσενικά και ένα ήταν αγνώστου φύλου. Τα εξεταζόμενα δείγματα από τις γάτες είχαν διάμεσο αριθμό εντόμων 3 (IQR: 2-6) και 2 τα δείγματα από τους σκύλους (IQR: 1-3). Τα περισσότερα δείγματα προήλθαν από ζώα που διέμεναν στην Περιφερειακή Ενότητα (ΠΕ) Κεντρικού Τομέα Αθήνας (37%) και στην ΠΕ Ανατολικής Αττικής (30%).

**Πίνακας 14** Συλλεχθέντα και επιλεχθέντα δείγματα ψύλλων και αριθμός ψύλλων από Ιατρεία Μικρών Ζώων της Αττικής, με κατανομή κατά είδος ζώων-ξενιστών και είδος, φύλο ψύλλων. Τα δείγματα ψύλλων αντιπροσωπεύουν ομάδες ψύλλων που συλλέχθηκαν από διαφορετικά ζώα κατά τη διάρκεια της μελέτης.

Συλλεχθέντα δείγματα	<i>Ctenocephalides felis</i> (αριθμός ψύλλων)		<i>Ctenocephalides canis</i> (αριθμός ψύλλων)		<i>Pulex irritans</i> (αριθμός ψύλλων)		Μη ταυτοποιήσιμο (αριθμός ψύλλων)
	♀	♂	♀	♂	♀	♂	
Γάτες (225)	209 (937)	95 (235)	0	0	0	0	0
Σκύλοι (95)	76 (126)	27 (35)	3 (8)	1 (4)	5 (17)	5 (16)	1 (1)
Κουνέλι (1)	1 (1)	1 (1)	0	0	0	0	0
Σύνολο ζώων	Σύνολο δειγμάτων						
321	424 (1381)						
Επιλεχθέντα δείγματα	<i>Ctenocephalides felis</i> ♀ (αριθμός ψύλλων)		<i>Ctenocephalides canis</i> ♀ (αριθμός ψύλλων)		<i>Pulex irritans</i> ♀ (αριθμός ψύλλων)		Μη ταυτοποιήσιμο (αριθμός ψύλλων)
Γάτες (67)	67 (241)		0 (0)		0 (0)		0
Σκύλοι (33)	29 (48)		2 (7)		2 (2)		0
Σύνολο επιλεχθέντων ζώων	Σύνολο επιλεχθέντων δειγμάτων						
100	100 (298)						

### 2.3.1.2 Ανίχνευση βακτηριακού DNA

DNA που κωδικοποιεί το κοινό για τα βακτήρια 16S rRNA γονίδιο, ανιχνεύθηκε σε 97 δείγματα, ένα δείγμα ήταν αρνητικό ενώ σε δύο το αποτέλεσμα ήταν αμφίβολο (**Εικόνα 19**).



**Εικόνα 19** Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης σταθερού πεδίου σε πηκτή αгарόζης των προϊόντων PCR με τις μη ειδικές εναρκτήριες αλληλουχίες για το γονίδιο που κωδικοποιεί το βακτηριακό 16S rRNA κατά Siala et al. (2009). Κατά σειρά από αριστερά προς δεξιά: αρνητικό control, θετικό control, αραιώση 1/10 του θετικού control και ακολουθούν 22 εξεταζόμενα θετικά δείγματα.

### 2.3.1.3 *R. felis* και *R. typhi* σε ψύλλους ζώων συντροφιάς

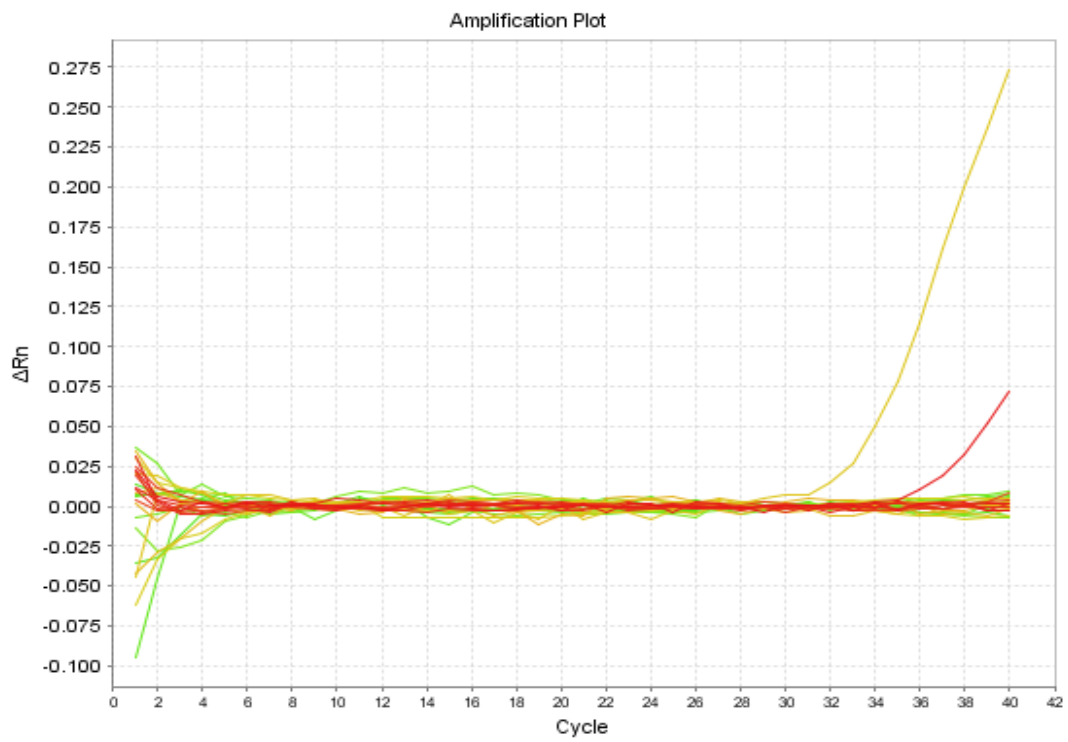
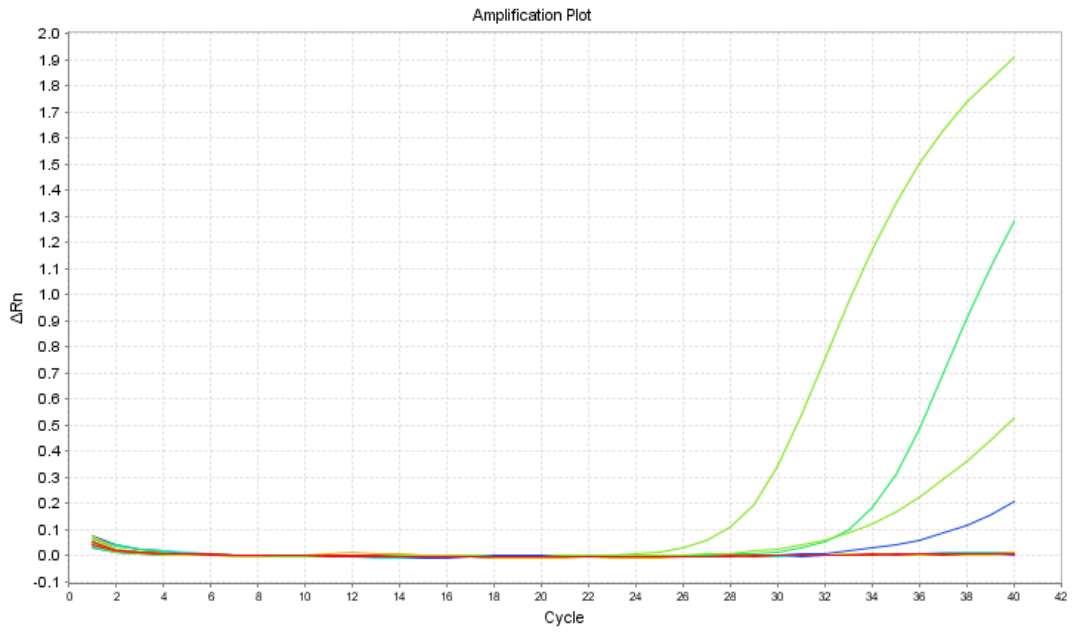
Ανιχνεύσιμα προϊόντα και στις δύο qPCR για ανίχνευση του γένους *Rickettsia* έδωσαν 10 από τα 100 δείγματα (**Εικόνα 20**).

Η qPCR<sub>gltA2</sub> έδωσε έξι επιπλέον θετικά δείγματα. Η 16S ανίχνευσε γένος *Rickettsia* σε 20 δείγματα, από αυτά τα 12 είχαν θετικές μία ή και δύο από τις qPCR<sub>gltA1</sub> και qPCR<sub>gltA2</sub>. Η qPCR<sub>bioB</sub> για *R. felis* ήταν θετική σε 13 δείγματα. Στα ίδια δείγματα αλλά και σε τρία επιπλέον ήταν θετική και η qPCR<sub>RfeIB</sub> (**Εικόνα 21**).

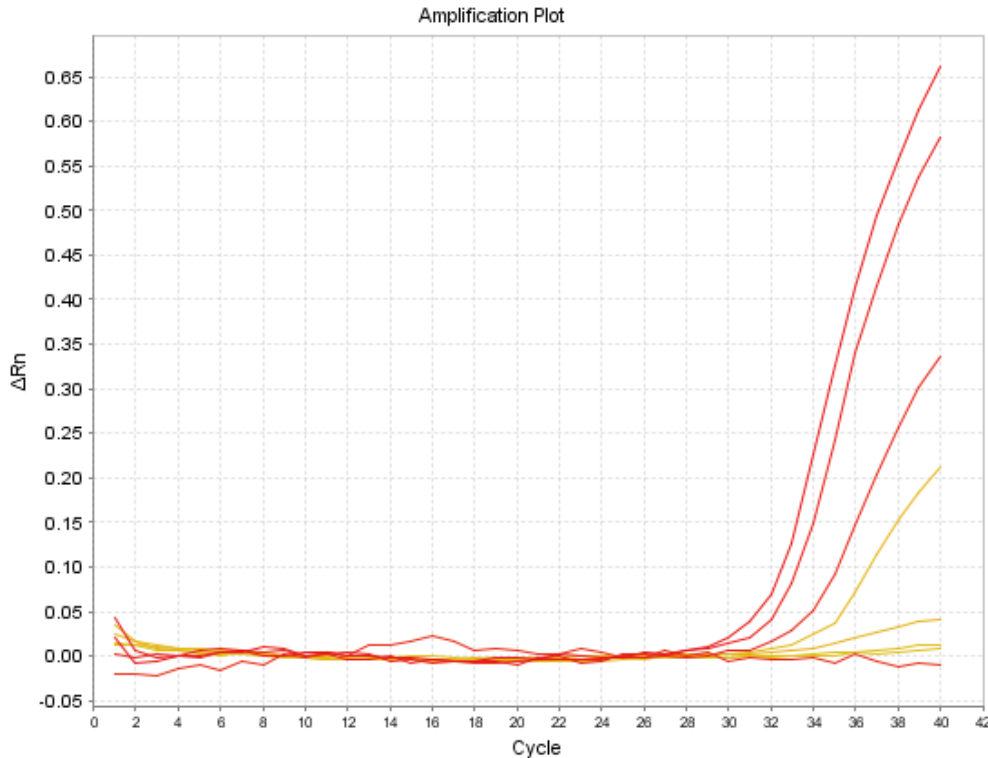
Κανένα δείγμα δεν ήταν θετικό στην qPCR για τη *R. typhi*. Από τα 100 δείγματα ψύλλων, 16 θεωρήθηκαν επιβεβαιωμένα για το γένος *Rickettsia* και 8 πιθανά. Τα δείγματα με πιθανό γένος *Rickettsia* είχαν μόνο μία θετική αντίδραση για το γένος, επτά στη 16S και ένα στη qPCR<sub>gltA2</sub>.

Τα επιβεβαιωμένα για *R. felis* δείγματα ήταν 14.





**Εικόνα 20** Ενδεικτικά θετικά δείγματα των qPCR για γένος *Rickettsia*. Επάνω: qPCR<sub>gltA1</sub> (PrimerDesign™). Κάτω: qPCR<sub>gltA2</sub> (Socolovschi et al. 2010)



**Εικόνα 21** Ενδεικτικά θετικά δείγματα των qPCR για *R. felis* - συγκριτικό γράφημα. Σκούρο (κόκκινο): qPCR<sub>RfelB</sub> (Odhiambo et al. 2014), ανοιχτό (κίτρινο): qPCR<sub>bioB</sub> (Socolovschi et al. 2010).

Από τα θετικά δείγματα για *R. felis*, οκτώ προέρχονταν από γάτες και έξι από σκύλους αντιπροσωπεύοντας 11,9% (8/67) και 18,2% (6/33) των γατών και σκυλών που συμμετείχαν στη μελέτη, αντίστοιχα. Από τα θετικά δείγματα για *R. felis*, οκτώ ήταν από θηλυκά ζώα (12,9% των θηλυκών, 8/62) και έξι από αρσενικά (18,9% των αρσενικών, 7/37), επτά από αδέσποτα (10,0% των αδεσπότεων, 10/70) και επτά από δεσποζόμενα (25,0% των δεσποζόμενων, 7/28) ζώα. Η ανάλυση δεν έδειξε σημαντικές διαφορές ανάμεσα σε γάτες και σκύλους  $\chi^2(1, N=100)=0,26, p=0,871$ , ανάμεσα σε θηλυκά και αρσενικά ζώα  $\chi^2(1, N=99)=0,332, p=0,565$  και σε αδέσποτα και δεσποζόμενα ( $p=0,382, N=98$ , Fisher's exact test), ούτε κάποια επίδραση της ηλικίας (σε μήνες) ή του αριθμού των ψύλλων του κάθε δείγματος, όσο αφορά την συχνότητα θετικών για *R. felis* δειγμάτων. Τα παραπάνω ίσχυαν και για τα δείγματα που ήταν επιβεβαιωμένα ή/και πιθανά μόνο για το γένος *Rickettsia*.

Στον **Πίνακα 15** φαίνονται τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα από τις εργαστηριακές εξετάσεις για *Rickettsia* spp. και *R. felis*.

**Πίνακας 15** Αποτελέσματα μοριακών ελέγχων για *Rickettsia* spp. και *R. felis*

Μοριακές τεχνικές <i>Rickettsia</i> genus (γονίδιο στόχος)		16S metagenomics					Μοριακές τεχνικές για <i>R. felis</i> (γονίδιο στόχος)		Έλεγχος με BLAST (MegaBlast)	Αποτελέσματα					
qPCR ( <i>gltA</i> ) <sup>α</sup>	qPCR ( <i>gltA</i> ) <sup>β</sup>	<i>Rickettsia</i> genus	<i>R. australis</i>	<i>R. hoogstraalii</i>	<i>R. heilongjiangii</i>	<i>R. massiliae</i>	qPCR ( <i>bioB</i> ) <sup>β</sup>	qPCR ( <i>ompB</i> ) <sup>γ</sup>	BLAST <sub>&gt;99</sub>	<i>Rickettsia</i> spp.	( <i>Rickettsia</i> - απροσδιόριστο είδος)	Πιθανό <i>R. hoogstraalii</i>	Πιθανό <i>R. felis</i>	<i>R. felis</i>	N
-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	1
-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	1
+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	10
-	+ <sup>ε</sup>	-	-	-	-	-	+	+ <sup>ε</sup>	-	+	-	-	-	+	1
-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	1
-	+ <sup>ε</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	+ <sup>δ</sup>	+	-	-	-	1
-	+ <sup>ε</sup>	-	-	-	-	-	-	+ <sup>ε</sup>	-	+	-	-	+	-	2
-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+ <sup>δ</sup>	+	-	-	-	6
-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+ <sup>δ</sup>	-	+	-	-	1
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	76
														Σύνολο	100

α Primerdesign™ genesig™

β Socolovschi et al. 2010

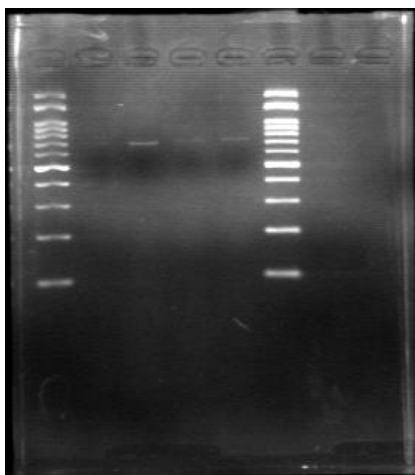
γ Odhiambo et al. 2014

δ Πιθανό

ε Προϊόντα πολλαπλασιασμού πέραν του 35<sup>ου</sup> κύκλου

#### 2.3.1.4 *Bartonella* spp. σε ψύλλους ζώων συντροφιάς

Η PCR για το γένος *Bartonella* ήταν ασθενώς θετική σε 4 από τα 100 δείγματα και τα προϊόντα ήταν μεγέθους ~700bp όπως εξάλλου αναμενόταν<sup>203 204</sup>. Το μέγεθος των προϊόντων ηλεκτροφόρησης ήταν συμβατό περισσότερο με το είδος *B. henselae* και λιγότερο με το *B. elizabethae* ενώ τα *B. vinsonii* και *B. quintana* αποκλείστηκαν (Εικόνα 22, Πίνακας 16). Ωστόσο, 28 επιπλέον δείγματα και συνολικά 32 δείγματα, ήταν θετικά για *Bartonella* spp. με τη 16S metagenomics, από τα οποία στα 27 η τεχνική μπόρεσε να διακρίνει και το είδος του βακτηρίου ενώ σε πέντε η διακριτικότητα έφθασε μόνο μέχρι το γένος. Από τα δείγματα που διακρίθηκε είδος, 12 είχαν μόνο *B. clarridgeiae*, επτά μόνο *B. henselae*, ένα μόνο *B. koehlerae* ενώ τα υπόλοιπα επτά είχαν μικτή μόλυνση με περισσότερα από ένα είδη *Bartonella* (Πίνακας 17).



**Εικόνα 22** Θετικά δείγματα για *Bartonella* (N=4) με ηλεκτροφορημένα προϊόντα μεγέθους περί τα 700 bp. Στις θέσεις 1 και 6 bp Ladder διαβάθμισης 100 bp.

**Πίνακας 16** Αναμενόμενα μεγέθη προϊόντων PCR<sub>QHVE</sub> για τις εναρκτήριες αλληλουχίες QHVE1 και QHV4 ανά είδος *Bartonella* σύμφωνα με Roux et al. (1995).

Θέσεις έναρξης υβριδισμού στην ενδομεταγραφόμενη περιοχή μεταξύ των γονιδίων 16S και 23S rRNA				Μέγεθος προϊόντων PCR (bp)		Είδος <i>Bartonella</i>
QHV1		QHV4		Μέγιστο	Ελάχιστο	
274	292	898	915	641	606	<i>B. quintana</i>
240	257	946	963	723	689	<i>B. henselae</i>
260	277	904	921	661	627	<i>B. vinsonii</i>
331	348	1109	1127	796	761	<i>B. elizabethae</i>

Από τα 32 θετικά δείγματα για DNA του γένους *Bartonella*, από αυτά 31 ήταν από γάτες (46,3% των γατών, 31/67) και ένα από σκύλο (3,0%, 1/33). Τα 17 ήταν από θηλυκά (27,4% των θηλυκών, 17/62) και 15 από αρσενικά ζώα (40,5% των αρσενικών, 15/37), 29 από αδέσποτα (41,4% των αδεσπώτων, 29/70) και τρία από δεσποζόμενα ζώα (10,7% των δεσποζόμενων, 3/28).

Η ανάλυση με Chi square έδειξε σημαντικά υψηλότερη συχνότητα εντόπισης *Bartonella* spp. στους ψύλλους των γατών σε σχέση με αυτή από τους ψύλλους των σκύλων  $X^2(1, N=100)=18,996, p<0,001$ . Ακόμα, σημαντικά πιο συχνά εντοπίστηκε *Bartonella* spp. σε ψύλλους που προέρχονταν από αδέσποτα ζώα  $X^2(1, N=98)=8,580, p=0,003$ , ωστόσο στις γάτες, η διαφορά αυτή μεταξύ δεσποζόμενων και αδέσποτων δεν είναι σημαντική ( $p>0.05$ ) (Εικόνα 23).

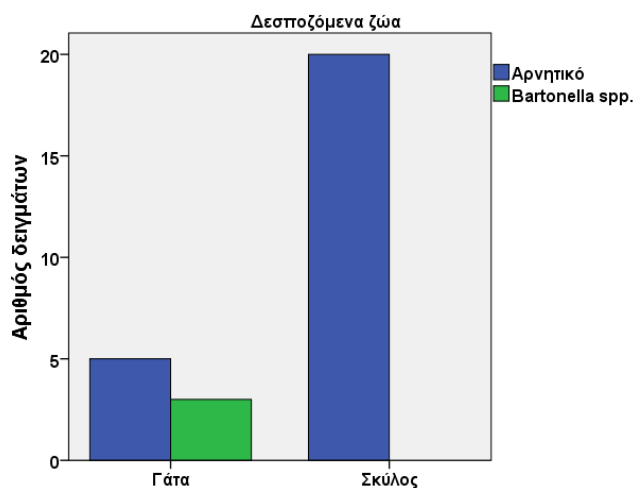
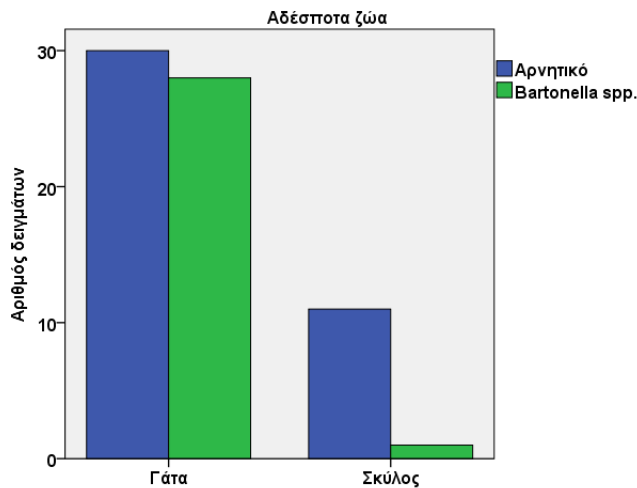
Δε βρέθηκε διαφορά στη συχνότητα εντόπισης *Bartonella* spp. ανάμεσα σε θηλυκά και αρσενικά ζώα  $X^2(1, N=99)=1,824, p=0,177$ .

Με βάση ένα πολυωνυμικό μοντέλο λογιστικής παλινδρόμησης εξετάστηκε η επίδραση της ηλικίας, του ζωικού είδους, της κατάστασης του ζώου (δεσποζόμενο ή αδέσποτο) και του αριθμού των ψύλλων στο δείγμα στην πιθανότητα να εντοπιστεί *Bartonella* spp. Το μοντέλο που προέκυψε ήταν στατιστικά σημαντικό,  $X^2(4)=38,491, p<0.0001$ . Το μοντέλο εξήγησε 46,1% (Nagelkerke  $R^2$ ) της τυχαιότητας για ανεύρεση *Bartonella* spp. και προέβλεψε ορθώς το 77,1% των δειγμάτων. Οι ψύλλοι των γατών ήταν 28,1 φορές πιο πιθανό να έχουν *Bartonella* spp. από τους ψύλλους των σκύλων. Ο αριθμός των ψύλλων στο δείγμα συνδεόταν με αύξηση της πιθανότητας ανεύρεσης *Bartonella* spp., για κάθε επιπλέον ψύλλο η πιθανότητα αυξανόταν κατά 1,2 φορές. Αντιθέτως η ηλικία του ζώου ξενιστή είχε αρνητική συσχέτιση, για κάθε επιπλέον μήνα ηλικίας η πιθανότητα μειωνόταν στο 0,97 για ανίχνευση *Bartonella* spp.

**Πίνακας 17** Αποτελέσματα μοριακών ελέγχων για *Bartonella* spp.

PCR για <i>Bartonella</i> spp. (QHVE)	16S γένος & είδος <i>Bartonella</i>	16S μόνο γένος <i>Bartonella</i>	<i>B. henselae</i> <sup>α</sup>	<i>B. clarridgeiae</i> <sup>α</sup>	<i>B. grahamii</i> <sup>α</sup>	<i>B. koehlerae</i> <sup>α</sup>	<i>B. rattaustraliani</i> <sup>α</sup>	<i>B. rochalimae</i> <sup>α</sup>	N
-	+	-	+	+	+	-	-	-	1
-	+	-	+	+	+	-	-	+	1
-	+	-	+	+	+	-	+	-	1
-	+	-	+	-	+	-	-	-	1
Ασαφές	+	-	+	+	-	+	-	-	1
-	+	-	+	+	-	-	-	-	1
-	+	-	-	+	-	-	-	-	12
-	+	-	+	-	-	-	-	-	6
Ασαφές	+	-	+	-	-	-	-	-	1
Ασαφές	+	-	-	-	-	+	-	-	1
-	-	+	-	-	-	-	-	-	5
Ασαφές	+	-	-	-	-	+	+	-	1
-	-	-	-	-	-	-	-	-	68
Σύνολο									100

α: πιθανό



**Εικόνα 23** Bar-charts των δειγμάτων από γάτες και σκύλους, χωρισμένα σε αδέσποτα και δεσποζόμενα, που βρέθηκαν θετικά & αρνητικά για *Bartonella* spp.

### 2.3.2 Σύγκριση των μοριακών μεθόδων για ταυτοποίηση *R. felis* και *R. typhi*

Η ευαισθησία των μεθόδων για ανίχνευση του γένους *Rickettsia* (qPCR<sub>gltA1</sub>, qPCR<sub>gltA2</sub>, 16S) κυμάνθηκε από 62,5% έως 93,8% και η ειδικότητα από 65,0 έως 100%. Μεταξύ των ειδικών για *R. felis* μοριακών δοκιμών, η qPCR<sub>bioB</sub> εμφάνισε 100% ευαισθησία και ειδικότητα ενώ η ευαισθησία και ειδικότητα ήταν 100% και 81,3% για την qPCR<sub>RfelB</sub>. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι αν δεν συμπεριλαμβάνονταν ως θετικές οι αντιδράσεις της qPCR<sub>RfelB</sub> που έδωσαν θετικό σήμα μετά τους 35 κύκλους, η qPCR<sub>RfelB</sub> θα είχε 92,3% ευαισθησία και 92,3% ειδικότητα (Πίνακας 18).

**Πίνακας 18** Αναλυτικός πίνακας ευαισθησίας και ειδικότητας μοριακών μεθόδων για *Rickettsia* spp. και *Rickettsia felis* σε δείγματα ομάδων ψύλλων (N=100) από σκύλους και γάτες στην Ελλάδα.

	<i>Μοριακές δοκιμές γένους Rickettsia</i>			<i>Μοριακές δοκιμές R. felis</i>		
	qPCR <sub>gltA1</sub>	qPCR <sub>gltA2</sub>	<i>Rickettsia</i> γένος σε 16S	qPCR <sub>bioB</sub>	qPCR <sub>ompB</sub>	BLAST <sub>&gt;99</sub>
<b>Ευαισθησία (%)</b>	62,5	93,8	81,3	92,9	100,0 <sup>α</sup> 92,9 <sup>β</sup>	92,9
<b>Ειδικότητα (%)</b>	100,0	93,8	65,0	100,0	87,5 <sup>α</sup> 100,0 <sup>β</sup>	65,0

α: θετική αντίδραση θεωρούμενη μέχρι και τον 40<sup>ο</sup> κύκλο

β: Θετική αντίδραση θεωρούμενη μόνο μέχρι και τον 35<sup>ο</sup> κύκλο



### 2.3.3 Βακτήρια με υγειονομική σημασία στο μικροβίωμα ψύλλων

Συνολικά 18 φύλα, 318 γένη και 468 διαφορετικά είδη βακτηρίων καταγράφηκαν ενώ σύμφωνα με το με το International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems του WHO (ICD-11, 2019), δυνητική υγειονομική σημασία (ΥΣ) είχαν 33 γένη και συγκεκριμένα τα *Acinetobacter*, *Actinomyces*, *Bacillus*, *Bacteroides*, *Bartonella*, *Bifidobacterium*, *Brucella*, *Campylobacter*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Coxiella*, *Enterococcus*, *Fusobacterium*, *Haemophilus*, *Kingella*, *Klebsiella*, *Legionella*, *Leptotrichia*, *Moraxella*, *Morganella*, *Mycobacterium*, *Neisseria*, *Nocardia*, *Pasteurella*, *Propionibacterium*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Rickettsia*, *Salmonella*, *Serratia*, *Staphylococcus*, *Stenotrophomonas* και *Streptococcus*. (**Εικόνα 24, 25**). Τα ΥΣ γένη ανιχνεύθηκαν σε 96 ομάδες ψύλλων.

Στα δείγματα από γάτα και σκύλο κατά μέσο όρο ανιχνεύθηκαν 4,5 [95% CI: 3,3-5,8] και 3,9 [95%CI: 2,5-5,3] γένη βακτηρίων ΥΣ, αντίστοιχα, χωρίς στατιστικώς σημαντική διαφορά στον αριθμό των παθογόνων γενών (t-test,  $p=0,82$ ).

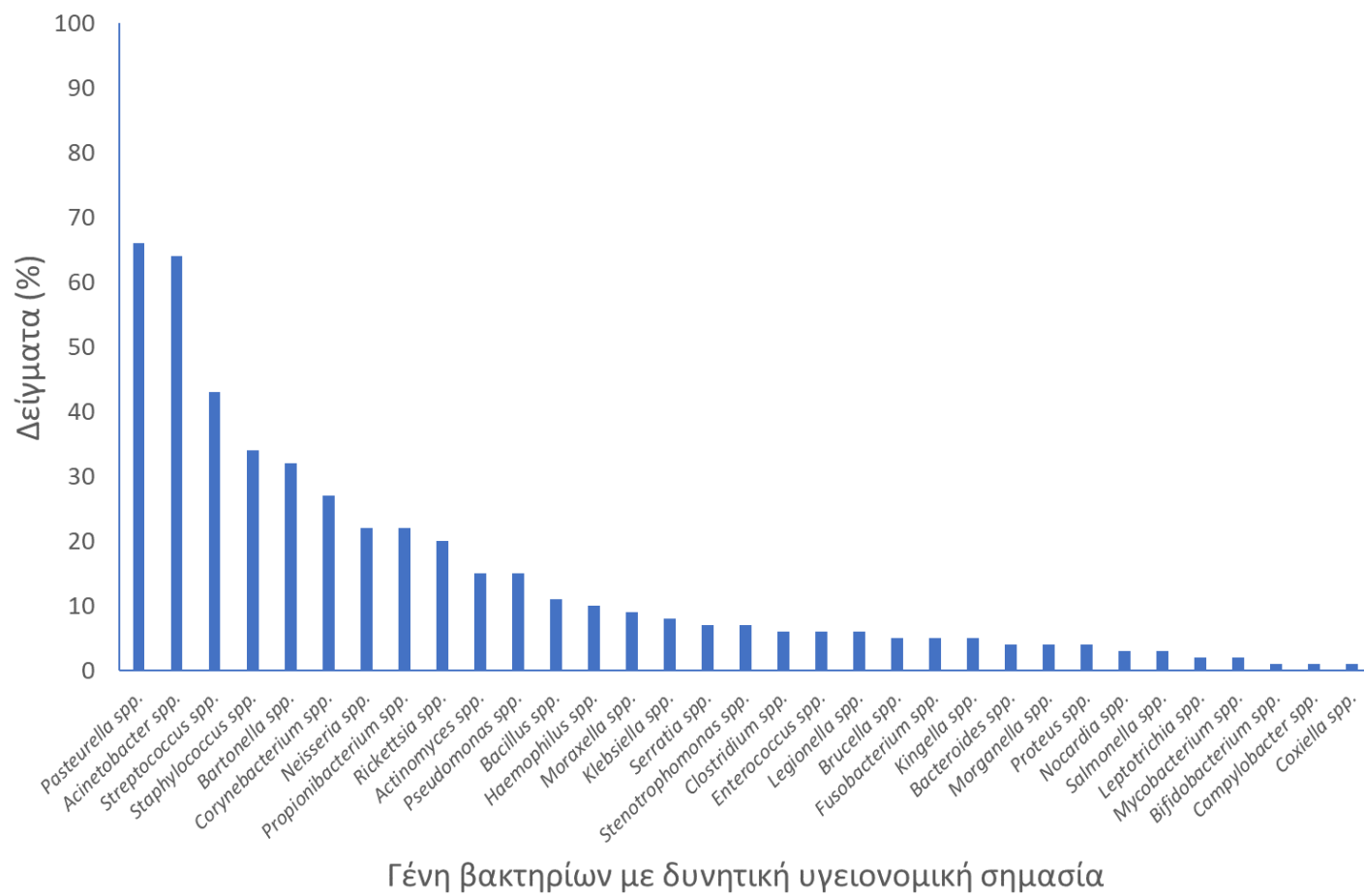
Σε επίπεδο κατανομής των παθογόνων γενών ανά ζωικό είδος ξενιστή, διαφορά βρέθηκε μόνο στην *Bartonella* spp. που ανευρέθηκε συχνότερα σε ψύλλους από γάτες (OR=27,6,  $p<0,001$ ).

Τα γένη *Coxiella*, *Campylobacter*, *Legionella*, *Spirochaeta*, *Salmonella*, *Brucella* ανευρέθησαν μόνο σε γάτες χωρίς όμως στατιστική σημαντικότητα ( $p>0,05$ ).

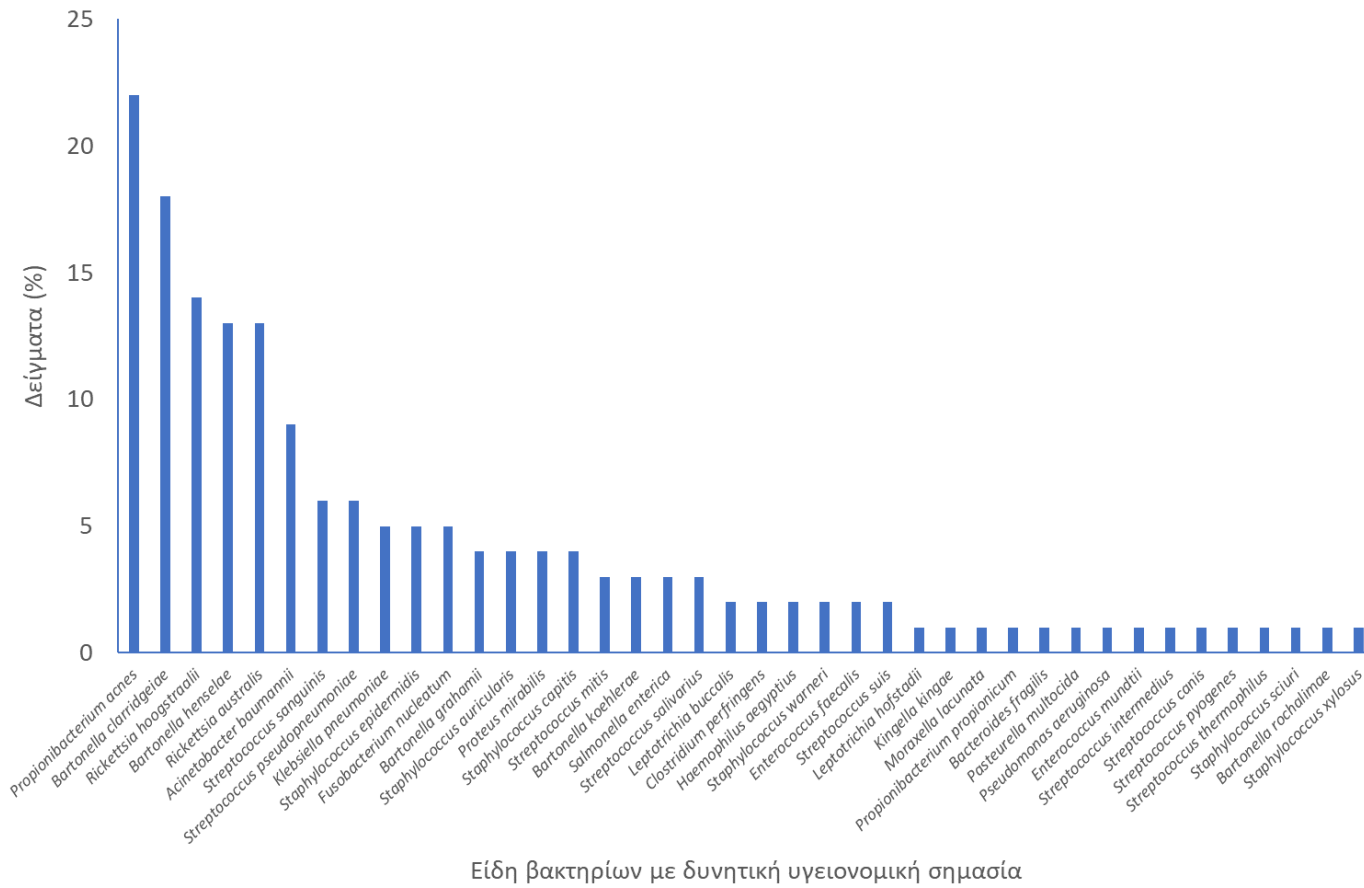
Τα είδη βακτηρίων με δυνητική υγειονομική σημασία ήταν 40, ανιχνεύθηκαν σε 60 ομάδες ψύλλων και περιλάμβαναν τα εξής: *Acinetobacter baumannii*, *Bacteroides fragilis*, *Clostridium perfringens*, *Enterococcus faecalis*, *E. mundtii*, *Fusobacterium nucleatum*, *Haemophilus aegyptius*, *Kingella kingae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Leptotrichia buccalis*, *L. hofstadii*, *Moraxella lacunata*, *Pasteurella multocida*, *Propionibacterium acnes*, *P. propionicum*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Rickettsia australis*, *R. hoogstraalii*, *Salmonella enterica*, και διάφορα είδη *Bartonella*, *Staphylococcus* και *Streptococcus* (**Εικόνα 26**).



**Εικόνα 24** Γένη βακτηρίων με δυνητική υγειονομική σημασία σε γάτες και σκύλους μέχρι επίπεδο γένους (Krona chart) (N=96).



**Εικόνα 25** Συχνότητα εμφάνισης γενών βακτηρίων υγειονομικής σημασίας στο εσωτερικό μικροβίωμα ψύλλων από γάτες και σκύλους, σύμφωνα με ICD-11 (N=100).



**Εικόνα 26** Συχνότητα εμφάνισης ειδών βακτηρίων υγειονομικής σημασίας στο εσωτερικό μικροβίωμα ψύλλων από γάτες και σκύλους, σύμφωνα με ICD-11 (N=100).

### 2.3.4 IgG αντισώματα κατά *B. henselae*, *B. quintana* και *R. typhi* σε ανθρώπινους ορούς αίματος

Συγκεντρώθηκαν 202 δείγματα ορού με αναλογία αρρένων: θηλέων 79:123 και μέση ηλικία τα 51 έτη (95% CI:49-54). Έξι, 20, 67 και 109 ανήκαν στις ηλικιακές ομάδες 2-14, 15-29, 30-50 και >50 ετών, αντίστοιχα. Η πλειονότητα των συμμετεχόντων στη μελέτη κατοικούσαν στην Περιφερειακή Ενότητα (ΠΕ) Κεντρικού Τομέα Αθήνας (42,6%) και οι υπόλοιποι, κατά φθίνον ποσοστό σε, ΠΕ Πειραιά (17,3%), ΠΕ Νότια Αθήνας (6,4%), ΠΕ Ανατολικής Αττικής (4,5%), ΠΕ Δυτικής Αττικής (1,0%) και ΠΕ Δυτικού Τομέα Αθήνας (0,5%). Η ΠΕ Νήσων (πληθυσμός κάτω του 2% του συνολικού πληθυσμού της Αττικής) δεν αντιπροσωπεύτηκε σε αυτή τη μελέτη. Όλες οι κατοικίες βρισκόταν σε αστικό ιστό, συμπεριλαμβανομένου του μητροπολιτικού κέντρου της Αθήνας.

Επαφή με ζώα συντροφιάς ανέφερε 59,5% (N=202): 24,8% (50/202) με σκύλους, 9,9% (20/202) με γάτες, 24,8% (50/202) με αμφότερα σκύλους και γάτες (N=202). Συνεπή εφαρμογή αντιψυλλικής αγωγής ανέφερε 59,2% (N=120) αυτών που είχαν επαφή με ζώα συντροφιάς ενώ αντιληπτή συχνή παρουσία ψύλλων στα ζώα συντροφιάς αναφέρθηκε από 39,0% (N=118). Επάγγελμα με δυνητική δραστηριότητα στην ύπαιθρο αναφέρθηκε από 5,1% (N=195). Ενασχόληση με κήπο ή με αγροτικές εργασίες είχε 39,0% (N=187). Υποκειμενική αίσθηση τσιμπημάτων αναφέρθηκε από 28,8% (N=200).

IgG αντισώματα κατά *B. henselae*, *B. quintana* and *R. typhi* ανιχνεύθηκαν σε 17,8%, 0,0% και 4,5% των συμμετεχόντων (N=202), αντίστοιχα. IgG αποκλειστικά για *B. henselae* βρέθηκαν σε 14,3% ενώ έναντι της *R. typhi* σε 1,0%, αντίστοιχα. IgG για *B. henselae* και *R. typhi* καταγράφηκε σε 3,5%. Τίτλοι 1/64, 1/128, 1/256, και 1/512 για IgG αντισώματα κατά *B. henselae* ανιχνεύθηκαν σε 6,4%, 4,5%, 4,5% και 2,5% των συμμετεχόντων ενώ τίτλοι 1/40 και 1/80 για IgG κατά *R. typhi* εντοπίστηκαν σε 4,0% και 0,5%, αντίστοιχα (Πίνακας 19).

**Πίνακας 19** Τίτλοι IgG αντισωμάτων κατά *Bartonella henselae* και *Rickettsia typhi* ανά φύλο, ηλικιακή ομάδα, και επαφή με ζώα συντροφιάς, σε δείγματα ορών από 202 συμμετέχοντες.

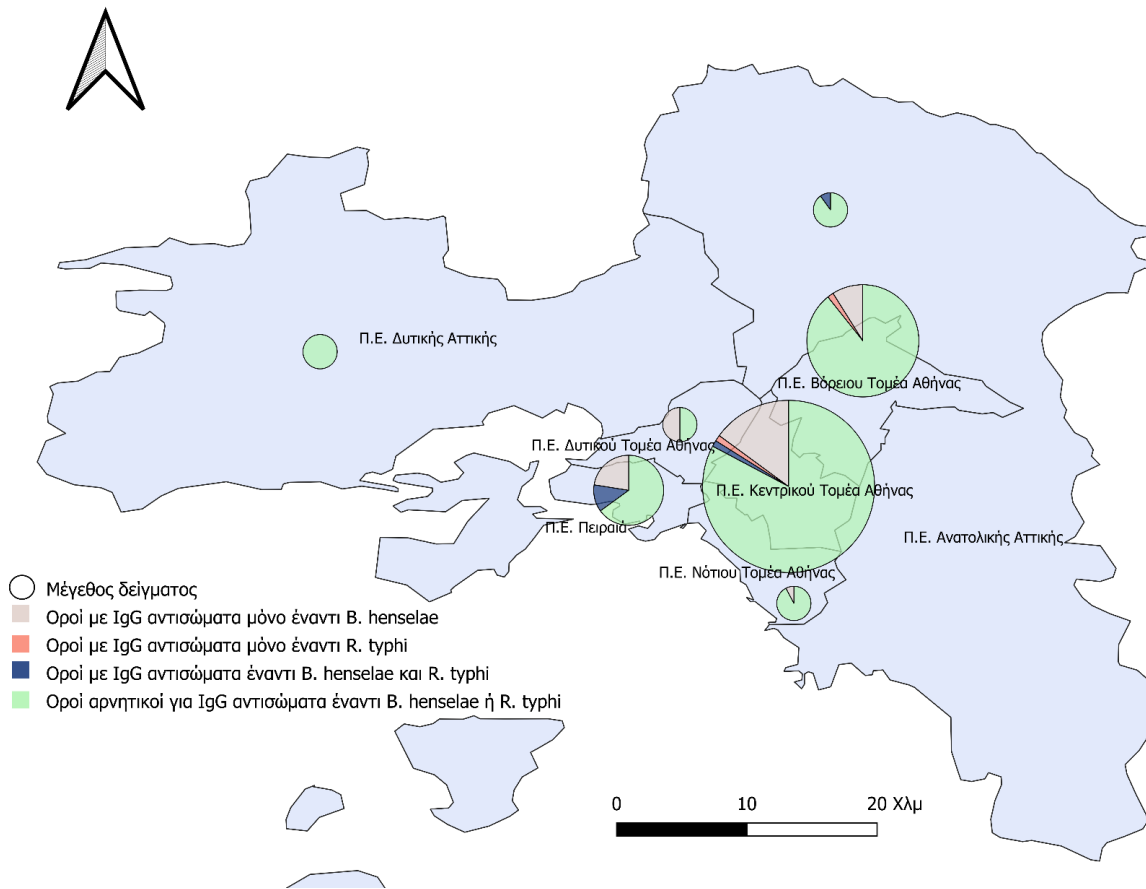
<b>IgG κατά <i>B. henselae</i></b>							
	<b>Τίτλος</b>						<b>N (%)</b>
	<b>&lt;1/64</b>	<b>1/64</b>	<b>1/128</b>	<b>1/256</b>	<b>1/512</b>	<b>1/1024</b>	
<b>Φύλο</b>							
Άρρεν	64	4	6	4	1	0	15 (7,4)
Θήλυ	102	9	3	5	4	0	21 (10,4)
<b>Ηλικιακή ομάδα</b>							
≤14 έτη	4	0	2	0	0	0	2 (1,0)
15-29 έτη	16	2	0	2	0	0	4 (2,0)
30-50 έτη	50	6	4	4	3	0	17 (8,4)
>50 έτη	96	5	3	3	2	0	13 (6,4)
<b>Επαφή με γάτες</b>							
Ναι	59	4	2	2	3	0	11 (5,4)
Όχι	107	9	7	7	2	0	25 (12,4)
<b>Επαφή με σκύλους</b>							
Ναι	87	4	3	3	3	0	13 (6,4)
Όχι	79	9	6	6	2	0	23 (11,4)
<b>Σύνολο (%)</b>	<b>166 (82,2)</b>	<b>13 (6,4)</b>	<b>9 (4,5)</b>	<b>9 (4,5)</b>	<b>5 (2,4)</b>	<b>0 (0,0)</b>	<b>202 (100,0)</b>

<b>IgG κατά <i>R. typhi</i></b>							
	<b>Τίτλος</b>						<b>No (%)</b>
	<b>&lt;1/40</b>	<b>1/40</b>	<b>1/80</b>	<b>1/160</b>	<b>1/320</b>	<b>1/640</b>	
<b>Φύλο</b>							
Άρρεν	77	2	0	0	0	0	2 (1,0)
Θήλυ	116	6	1	0	0	0	7 (3,5)
<b>Ηλικιακή ομάδα</b>							
≤14 έτη	6	0	0	0	0	0	0 (0,0)
15-29 έτη	19	1	0	0	0	0	1 (0,5)
30-50 έτη	62	4	1	0	0	0	5 (2,5)
>50 έτη	106	3	0	0	0	0	3 (1,5)
<b>Επαφή με γάτες</b>							
Ναι	67	3	0	0	0	0	3 (1,5)
Όχι	126	5	1	0	0	0	6 (3,0)
<b>Επαφή με σκύλους</b>							
Ναι	96	4	0	0	0	0	4 (2,0)
Όχι	97	4	1	0	0	0	5 (2,5)
<b>Σύνολο (%)</b>	<b>193 (95,5)</b>	<b>8 (4,0)</b>	<b>1 (0,5)</b>	<b>0 (0,0)</b>	<b>0 (0,0)</b>	<b>0 (0,0)</b>	<b>202 (100,0)</b>

Εντοπίστηκε σημαντική συσχέτιση οροθετικότητας σε *B. henselae* με την περιοχή κατοικίας (Περιφερειακή Ενότητα Πειραιά) ( $X^2(6)=17,737, p=0,009$ ) (Εικόνα 27). Δε βρέθηκε συσχέτιση οροθετικότητας για IgG έναντι *B. henselae* και *R. typhi* με γένος, αγροτικές-κηπουρικές εργασίες, υπαίθριες δραστηριότητες, επαφή με γάτες, αμυχές γάτας στα χέρια, παρουσία ψύλλων στα ζώα συντροφιάς ή με τη συστηματικότητα στην εφαρμογή αντιψυλλικής αγωγής.

Οι οροθετικοί για *B. henselae* είχαν μειωμένο μέσο όρο ηλικίας σε σχέση με τους οροαρνητικούς κατά 8.2 έτη (95%CI: -14,8 έως -1,5), ( $t(199)=2,412, p=0,017$ ). Η διωνυμική λογιστική παλινδρόμηση έδειξε ότι για κάθε πρόσθετο έτος ηλικίας η πιθανότητα οροθετικότητας για *Bartonella* spp. IgG οριακά μειωνόταν (OR=0,976; 95%CI: 0,957 έως 0,996), ( $X^2(1)=5,705, p=0,017$ ). Επιπρόσθετα, άτομα ηλικίας >50 ετών είχαν λιγότερο συχνή οροθετικότητα (12,0%) σε σχέση με τους υπαγόμενους σε όλες τις υπόλοιπες ηλικιακές ομάδες (24,7%), ( $X^2(2)=5,905, p=0,046$ ). Σημαντικά υψηλότερες πιθανότητες για παρουσία αντισωμάτων κατά *R. typhi* υπήρχαν σε οροθετικούς παρά σε οροαρνητικούς για *B. henselae* ( $p=0,011$ ; OR=19,8). Η συχνότητα οροθετικότητας για IgG αντισώματα κατά *R. typhi* δεν παρουσίασε καμία συσχέτιση με τους εξεταζόμενους παράγοντες. Το μέγεθος του τίτλου αντισωμάτων τόσο για τα IgG κατά *B. henselae* όσο και κατά *R. typhi* δεν βρέθηκε να επηρεάζεται από κανένα από τους εξεταζόμενους παράγοντες.



**Εικόνα 27** Δειγματοληψία ορών (ο αριθμός των δειγμάτων απεικονίζεται από τους πράσινους κύκλους) και τα ποσοστά οροθετικότητας για αντισώματα IgG κατά *B. henselae* και *R. typhi* ανά Περιφερειακή Ενότητα, Αττική, Ελλάδα. IgG κατά *B. quintana* δεν ανιχνεύθηκε



2.4.1 Ανίχνευση *Bartonella* spp., *R. felis* και *R. typhi* σε ψύλλους ζώων συντροφιάς

Εξετάζοντας τους ψύλλους σε ομάδες, όπου κάθε ομάδα (δείγμα) αντιστοιχεί σε ένα ζώο, αυξήσαμε την πιθανότητα να ανιχνεύσουμε τα βακτήρια της μελέτης σε οποιοδήποτε ψύλλο που παρασιτεί σε ένα ζώο, εις βάρος της πληροφορίας για τον κάθε μεμονωμένο ψύλλο. Ωστόσο θεωρήσαμε σημαντικότερη για τη δημόσια υγεία την ικανότητα μετάδοσης νόσου έστω και από ένα ψύλλο του κάθε ζώου.

*Bartonella* spp.

Επειδή η διαφοροποιητική ικανότητα του 16S είναι επαρκής για την διαφοροποίηση γενών αλλά αμφίβολη για την ταυτοποίηση των ειδών της *Bartonella*, τα θετικά αποτελέσματα της 16S σε επίπεδο γένους χαρακτηρίστηκαν επιβεβαιωμένα ενώ χαρακτηρίστηκαν πιθανά σε επίπεδο γένους-είδους. Η απουσία επιβεβαιωτικών μοριακών τεχνικών για την ταυτοποίηση των ανιχνευθέντων με 16S γενών και ειδών μικροβίων είναι ένας από τους περιορισμούς της μελέτης μας. Ωστόσο θα πρέπει να σημειωθεί ότι η 16S, παρά την σχετική της αδυναμία να διακρίνει τα βακτήρια σε επίπεδο είδους έχει χρησιμοποιηθεί σε αρκετές μελέτες σε ψύλλους *Ctenocephalides* spp. ως το βασικό εργαλείο για τη διερεύνηση του γένους και των ειδών *Bartonella*<sup>73 205 206 207 208</sup>. Το ποσοστό ανίχνευσης ήταν σημαντικά υψηλότερο σε ομάδες ψύλλων γάτας (46,3%, 31/67) από τις αντίστοιχες σε σκύλους (3,0%, 1/33) ( $p < 0,001$ ). Πάντως δεν διέφερε η κατάσταση (αδέσποτο ή δεσποζόμενο) μεταξύ των γατών με ψύλλους θετικούς και των γατών με ψύλλους αρνητικούς για *Bartonella* spp (Fisher's exact test:  $p = 0,713$ ). Οι γάτες με ψύλλους θετικούς για *Bartonella* ήταν σημαντικά νεαρότερες κατά 23,7 μήνες (95%CI: -41,6 έως -5,7), ( $t(63) = 2,638$ ,  $p = 0,01$ ).

Αντίστοιχες μελέτες στην Ελλάδα: οι Tea et al. (2004) βρήκαν ότι 31,3% άγριων τρωκτικών (N=70) από περιοχές της βορείου Ελλάδας ήταν φορείς ειδών *Bartonella*<sup>209</sup>.

Από αντίστοιχες μελέτες στο εξωτερικό, στη Γαλλία ανιχνεύθηκε *Bartonella* spp. σε 26,2% μεμονωμένων ψύλλων (N=309) που με φθίνουσα σειρά συχνότητας ήταν τα είδη *B. clarridgeiae* (67,9%), *B. quintana* (17,3%), *B. henselae* (11,1%) και *B. koehlerae* (3,7%)<sup>210</sup>. Στην Ταϊβάν (Taiwan) σε μεμονωμένους ψύλλους (N=420) ανιχνεύθηκε *Bartonella* spp. σε ποσοστό 38% που αντιστοιχούσε κατά σειρά συχνότητας σε *B. henselae* (9%) *B. clarridgeiae* (2,1%) και

*B. koehlerae* (0,7%)<sup>211</sup>. Στη Χιλή σε μελέτη επί 251 μεμονωμένων ψύλλων *C. felis* που συλλέχθηκαν από γάτες ανευρέθηκε 39,3% να φέρει *Bartonella* spp. και κατά σειρά συχνότητας *B. clarridgeiae*, *B. henselae* και *B. koehlerae*<sup>212</sup>.

### *Rickettsia felis*

Η *R. felis* ανιχνεύθηκε σε 14 από 100 ομάδες ψύλλων που προήλθαν από σκύλους και γάτες συντροφιάς στην Αττική. Όλα τα θετικά δείγματα ήταν σε ψύλλους *C. felis*, τα οκτώ από γάτες (11,9% - 8/67) και τα έξι από σκύλους (18,2% - 6/33) χωρίς σημαντική διαφορά στη συχνότητα ανεύρεσης μεταξύ γατών και σκύλων (Fisher's exact test:  $p=0,346$ ). Η διαφορά μέσου όρου ηλικίας ήταν σημαντική ανάμεσα στις θετικές γάτες και σκύλους όπου στις γάτες ήταν χαμηλότερος κατά 95% CI: -105 έως -9 μήνες από τον Μ.Ο. των σκύλων ( $p=0,48$ ). Στις γάτες με ψύλλους θετικούς για *R. felis* ο Μ.Ο. ηλικίας σε μήνες ήταν 5,6 (διάμεσος=3, IQR: 2-3) σε αντίθεση με τους σκύλους που ήταν 62,5 (διάμεσος=54, IQR:19-96). Οι γάτες με *R. felis* θετικούς ψύλλους ήταν πιο συχνά αδέσποτες (6/7) σε σχέση με τους σκύλους (0/6) (Fisher's exact test:  $p=0,005$ ).

Η σύγκριση με παρόμοιες μελέτες εξαρτάται ανάμεσα σε άλλα και από το μέγεθος των εξεταζόμενων ομάδων ψύλλων, τα χαρακτηριστικά των εξεταζόμενων ζώων και τις χρησιμοποιούμενες τεχνικές ανίχνευσης. Η μόνη σχετικά παρόμοια μελέτη που γνωρίζουμε στην Ελλάδα, είχε επικεντρωθεί σε ψύλλους που συλλέχθηκαν από το περιβάλλον πλησίον των κατοικιών πιθανών κρουσμάτων *R. felis* στην Κρήτη και στην Έυβοια, όπου ανιχνεύθηκε σε ποσοστό 13,0% (3/23) των μεμονωμένων ψύλλων<sup>213</sup>. Στην Αλβανία σε ομάδες ψύλλων (1-50 έντομα) η *R. felis* ανιχνεύθηκε σε 9 από 78 αδέσποτες γάτες (11,5%) με χρήση PCR με στόχο *gltA* και *ompA* και sequencing στα προϊόντα τους<sup>214</sup> ενώ στην Ιταλία οι Capelli et al. (2009) ανέφεραν επιπολασμό 21,4% (25/117) σε ομάδες ψύλλων (1-3 έντομα) με PCR (*gltA*) και εν συνεχεία αλληλούχιση<sup>215</sup>. Σχετικά με τα ευρήματα αντίστοιχων μελετών σε ψύλλους κατοικιδίων ζώων διεθνώς διαπιστώνεται το μεγάλο εύρος στο ποσοστό ανεύρεσης *R. felis* (6%- 80%), αν και τυπικά η το ποσοστό ανίχνευσης είναι κάτω του 25,0%<sup>216</sup>.

Από άλλες χώρες της Ευρώπης αναφέρονται ποσοστά 8,1% (Γαλλία, N=309)<sup>210</sup>, 9,0% (Γερμανία, N=226)<sup>217</sup>, 28, 4% (N=88)<sup>218</sup>, 40,0% (Ισπανία)<sup>219</sup> και 9,0-21,0% (Αγγλία, N=121)<sup>220</sup>. Εκτός της Ευρώπης, στη Taiwan σε μεμονωμένους ψύλλους (N=420) ανιχνεύθηκε *R. felis* σε ποσοστό 21,4%<sup>211</sup>, στη Χιλή σε μελέτη επί 251 μεμονωμένων ψύλλων *C. felis* που συλλέχθηκαν από γάτες

ανευρέθηκε 76.6% με *R. felis*<sup>212</sup>, ενώ στις Η.Π.Α. ανιχνεύθηκε *R. felis* σε 67,4% των ψύλλων που συλλέχθηκαν από γάτες (N=92)<sup>221</sup>.

Η αλληλούχιση (sequencing) των προϊόντων PCR που στοχεύουν σε γονίδια που παρουσιάζουν σχετική ποικιλομορφία και άρα διακριτική ικανότητα ανάμεσα στα είδη *Rickettsia* χρησιμοποιούνται ευρέως για την ταυτοποίηση των ρικετσιών. Ωστόσο έχουν αναπτυχθεί πρωτόκολλα qPCR που μπορούν να ανιχνεύσουν τη *R. felis* που έχουν λιγότερες απαιτήσεις σε πόρους και εξειδικευμένο εξοπλισμό σε σχέση με την αλληλούχιση νουκλεοτιδίων. Στη μελέτη μας, η ανίχνευση *Rickettsia* spp. και *R. felis* πραγματοποιήθηκε με συνδυασμό qPCRs και 16S καθώς είναι άγνωστη η ευαισθησία και ειδικότητα της κάθε μίας μεθόδου ξεχωριστά, και επίσης λόγω της έλλειψης προτυποποίησης όσο αφορά τις εργαστηριακές διαδικασίες για την ανίχνευση του *R. felis*. Ωστόσο, η απουσία sequencing από τη μελέτη, π.χ. των προϊόντων PRC του γονιδίου *gltA*, στερεί από τα αποτελέσματά μας περαιτέρω επιβεβαίωση.

Η qPCR<sub>RfelB</sub> αναφέρθηκε ότι μπορεί να ανιχνεύσει από δύο τεμάχια περιέχοντα DNA στόχους, με ευαισθησία 100% (51/51), και ειδικότητα 98,1% (51/52), σύμφωνα με δοκιμές σε δείγματα *R. felis*, RFLOs και μη-*R. felis* ρικετσιακά είδη (non-*felis*), που προήλθαν από ανθρώπους και έντομα<sup>132</sup>. Άλλες αναφορές αναφέρουν ότι η qPCR<sub>RfelB</sub> δεν είναι απόλυτα ειδική για το *R. felis* και μπορεί να ανιχνεύσει και το RFLO *Candidatus. R. senegalensis*<sup>135</sup>. Ωστόσο η qPCR<sub>RfelB</sub> σε συνδυασμό και με άλλες μοριακές τεχνικές χρησιμοποιήθηκε σε πρόσφατες μελέτες για την ανίχνευση *R. felis*<sup>131</sup>. Στη μελέτη του Moonga et al. (2019) για την ταυτοποίηση του *R. felis* DNA σε ψύλλους, πρώτα έπρεπε να προηγηθεί επιβεβαίωση γένους και ακολούθως επιβεβαίωση του είδους με θετικά αποτελέσματα και στις δύο τεχνικές, qPCR<sub>RfelB</sub> και qPCR<sub>bioB</sub>. Τα παραπάνω κριτήρια πληρούσαν 13 από τα 14 *R. felis* DNA δείγματα της μελέτης μας ενώ οι Moonga et al. (2019) με τα κριτήρια αυτά χαρακτήρισαν όλα τα θετικά για *R. felis* δείγματα (2/2).

Συμπερασματικά, η *R. felis* ανευρίσκεται σε ψύλλους παρασιτούντες ζώα συντροφιάς στην Αττική και ένας συνδυασμός μοριακών μεθόδων ενδείκνυται για την εργαστηριακή διάγνωση των *Rickettsia* spp. και *R. felis*. Θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη και η FBSF σε ασθενείς με συμβατά συμπτώματα. Επιπλέον, θα πρέπει να βελτιωθεί η επιτήρηση η εργαστηριακή δυνατότητα διάγνωσης και επιδημιολογική επιτήρηση για τα συγκεκριμένα παθογόνα.

### *Rickettsia typhi*

Στη μελέτη μας δεν ανιχνεύθηκε *R. typhi* σε δείγματα ψύλλων. Σε προηγούμενη μελέτη στην Ελλάδα που διεξήχθη σε ψύλλους που συλλέχθηκαν από αρουραίους και γάτες σε περιοχές

ανθρώπων που θεωρήθηκαν ότι νοσούσαν από ρικετσίωση (*R. felis*) σε περιοχές της Εύβοιας και της Κρήτης, σε δείγματα *C. felis* (N=23) και *X. cheopis* (N=36), *R. typhi* ανιχνεύθηκε σε τρία δείγματα *X. cheopis*<sup>213</sup>. Στην ίδια έρευνα, *R. typhi* ανιχνεύθηκε σε πέντε από 54 αρουραίους (*Rattus norvegicus*) από τους οποίους συλλέχθηκαν οι *X. cheopis*.

Δεν έχουμε υπόψη μας άλλες μελέτες με αντικείμενο τη διερεύνηση *R. typhi* σε ψύλλους στην Ελλάδα, ωστόσο ασθενείς με κλινική νόσο από *R. typhi* σε ανθρώπους στην Ελλάδα έχει αναφερθεί στην Εύβοια<sup>222</sup> και στην Κρήτη<sup>192</sup>.

Οι διεθνείς βιβλιογραφικές αναφορές για ανεύρεση *R. typhi* σε ψύλλους κατοικιδίων ζώων δεν είναι ιδιαίτερα πολλές, ανάμεσα σε αυτές ξεχωρίζει η εργασία των Maina et al. (2016) όπου ανίχνευσαν *R. typhi* σε ποσοστό 1,3% σε *C. felis* (N=597) σε επιδημική όμως περιοχή με συμπτωματικούς ασθενείς με λοίμωξη από *R. typhi*<sup>135</sup>.

#### 2.4.2 Σύγκριση των μοριακών μεθόδων για ταυτοποίηση *R. felis* και *R. typhi*

Στη μελέτη μας η qPCR<sub>RfelB</sub> είχε τάση να υπερδιαγιγνώσκει *R. felis* (false positives) σε σχέση με τα θεωρούμενα ως επιβεβαιωμένα για *R. felis* με τα κριτήριά μας. Ωστόσο οι Odhiambo et al. (2014) ανέφεραν για το θετικό μάρτυρα (positive control) της *R. felis* της qPCR<sub>RfelB</sub> τον ουδό των  $21,5 \pm 1,0$  για την παραγωγή ανιχνεύσιμων προϊόντων. Εάν εξαιρούσαμε τις αντιδράσεις της qPCR<sub>RfelB</sub> με προϊόντα άνω των 35 κύκλων, η ευαισθησία και ειδικότητα θα ήταν όμοιες με τις αντίστοιχες της qPCR<sub>bioB</sub>.

Το BLAST<sub>>99</sub> έδειξε χαμηλή ικανότητα να ανιχνεύει το *R. felis*, ενδεχομένως επειδή το 16S rDNA στερείται επαρκούς διακριτικής ικανότητας σε επίπεδο ειδών που ανήκουν στο ίδιο γένος.

Τέλος, με τη μεθοδολογία που ακολουθήσαμε μειώσαμε την πιθανότητα για ψευδώς θετικά αποτελέσματα καθώς αποδεχόμαστε συνδυασμό μεθόδων όμως αυξήθηκαν παράλληλα οι πιθανότητες για ψευδώς αρνητικά. Επομένως τα ευρήματά μας δίνουν βαρύτητα στην επιβεβαίωση των θετικών και τα αποτελέσματα αντικατοπτρίζουν τις πιστοποιημένες ανιχνεύσεις *R. felis*.

### 2.4.3 Βακτήρια με υγειονομική σημασία στο μικροβίωμα ψύλλων

Θεωρώντας ως δυνητικά παθογόνα τα βακτήρια που δύνανται να προκαλέσουν λοιμώδη νόσο σύμφωνα με το ICD-11, DNA από πλειάδα γενών και ειδών βακτηρίων με δυνητική υγειονομική σημασία ανευρέθηκε στο εσωτερικό μικροβίωμα των κοινών ψύλλων που παρασιτούν ζώα συντροφιάς. Είναι άγνωστη η συχνότητα που ο άνθρωπος δέχεται νύγματα ψύλλων και είναι λίγες οι μελέτες που έχουν ασχοληθεί με αυτό το αντικείμενο. Η στενή ωστόσο επαφή των ψύλλων με τον άνθρωπο και το γεγονός ότι οι ψύλλοι περιστασιακά, τρέφονται και από ανθρώπους, δικαιολογεί περαιτέρω έρευνα για τον ρόλο των ψύλλων ως διαβιβαστών ή και ως μηχανικών μεταφορέων παθογόνων ειδών. Επομένως, η σημασία των ευρημάτων για τη δημόσια υγεία μένει να διερευνηθεί διότι δεν υπάρχουν αναφορές για δυνατότητα των ψύλλων να μεταδώσουν λοιμογόνα βακτήρια στον άνθρωπο πέραν των γενών *Yersinia*, *Bartonella* και *Rickettsia*.

Ανάμεσα στα κοινώς θεωρούμενα ζωοανθρωπονοσογόνα βακτήρια που ανευρίσκονται σε γάτες (*Bartonella* spp., *Rickettsia* spp., *Toxoplasma* spp., *Yersinia pestis*, *Francisella tularensis*)<sup>223</sup> μόνο τα είδη της *Bartonella* spp. (*B. grahamii*, *B. henselae*, *B. clarridgeiae*, *B. koehlerae*, *B. rattaustraliani*, και *B. rochalimae*) και *Rickettsia* spp. (*R. australis*, *R. hoogstraalii*) εντοπίστηκαν ενώ από τα αντίστοιχα σε σκύλους (*Leptospira* spp., *Pasteurella* spp., *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *Brucella* spp., *Yersinia enterocolitica*, *Bordetella bronchiseptica*, *Coxiella burnetii*, *Staphylococcus intermedius* και *Staphylococcus aureus* με ανθεκτικότητα στη μεθικιλίνη)<sup>224</sup> εντοπίστηκαν τα *Pasteurella* spp. (*P. multocida*) και *Staphylococcus* spp. (*S. hominis*, *S. epidermidis*, *S. warneri*, *S. gallinarum*, *S. xylosus*, *S. equorum*, *S. sciuri* και *S. felis*).

Από τα θεωρούμενα ως δυνητικά παθογόνα σύμφωνα με το ICD-11, τα *Pasteurella* spp. και *Staphylococcus* spp. (*S. hominis*, *S. auricularis*, *S. capitis*, *S. epidermidis*, *S. jettensis*, *S. warneri*, *S. succinus* και *S. felis*) βρέθηκαν σε σκύλους και γάτες, ενώ μόνο σε γάτες βρέθηκαν *Salmonella* spp. (*S. enterica*, *S. subterranea*), *Campylobacter* spp., *Brucella melitensis* και *Coxiella* spp.

Από τα ΥΣ γένη, τα *Legionella* spp., *Mycobacterium* spp., *Clostridium* spp., *Corynebacterium* spp., *Haemophilus* spp., *Klebsiella* spp., *Nocardia* spp., *Proteus* spp., *Pseudomonas* spp., *Spirochaeta* spp., *Streptococcus* spp., *Actinomyces* spp. σύμφωνα με όσα γνωρίζουμε δεν έχουν αναφερθεί ξανά σε ψύλλους κατοικίδιων ζώων συντροφιάς. Επιπλέον ανιχνεύσαμε *Brucella melitensis* σε ψύλλους γάτας (*C. felis*). Σημειώνεται ότι δυνατότητα των *C. felis* να φέρουν *B. melitensis* και να μολύνουν θηλαστικά έχει αναφερθεί μόνο σε μία παλαιά μελέτη και υπό πειραματικές συνθήκες<sup>225</sup>. Η γάτα δε θεωρείται ότι έχει κάποιο ρόλο στην επιδημιολογία της *Brucella*<sup>226</sup> και ελάχιστες αναφορές υπάρχουν για εντόπιση *Brucella* spp. σε γάτες<sup>227</sup>.

Στατιστικώς αυξημένη ήταν η συχνότητα εντόπισης *Bartonella* σε ψύλλους γάτας με 31 εντοπίσεις σε 67 γάτες ενώ καταγράφηκε μόνο μία εντόπιση *Bartonella* σε ψύλλους σκύλου (1/33), χωρίς διάκριση είδους του βακτηρίου. Πράγματι, για τα είδη *Bartonella* που ανιχνεύτηκαν συχνότερα (*B. henselae*, *B. clarridgeiae* και *B. koehlerae*) κύριος ξενιστής θεωρείται η γάτα<sup>85</sup> ενώ αντίστοιχα ο σκύλος θεωρείται συχνότερος ξενιστής για το *B. vinsonii berkhoffii* το οποίο δεν ανευρέθηκε στην παρούσα μελέτη.

Τα ευρήματα μας σε συνδυασμό με εργασίες που αναφέρουν εντόπιση *Brucella* σε άγρια τρωκτικά<sup>228</sup> καθώς παρατεταμένη ενδοερυθροκυτταρική εντόπιση σε τρωκτικά εργαστηρίου<sup>229</sup>, δημιουργούν ερευνητικό ερώτημα σχετικά με την πιθανή προέλευση της *Brucella* και την υπόθεση ότι προήλθε από αλληλεπίδραση των γατών ή των ψύλλων τους με αρουραίους. Αξιοσημειωτο είναι επίσης ότι όλες οι εντοπίσεις *Legionella* spp. καταγράφηκαν σε ψύλλους γάτας (6/67) γεγονός που αν συνδυαστεί με την ανθεκτικότητα των αρουραίων στην εμφάνιση νόσου μετά από μόλυνση με *Legionella* και την πιθανή φορεία αυτού του βακτηρίου στα ζώα αυτά<sup>230</sup> αποτελεί μία ένδειξη της αλληλεπίδρασης των μικροβιακών φορτίων μεταξύ γατών, αρουραίων και των ψύλλων τους.

#### 2.4.4 IgG αντισώματα κατά *B. henselae*, *B. quintana* και *R. typhi* σε ανθρώπινους ορούς αίματος

Αυτή η μελέτη αποτελεί την πρώτη που εξέτασε αντισώματα IgG κατά *B. henselae*, *B. quintana* και *R. typhi* στον πληθυσμό της Αττικής και επίσης η πρώτη που συμπεριέλαβε ανάμεσα στους διερευνούμενες παράγοντες για συσχέτιση με οροθετικότητα, την συστηματική χρήση αντιψυλλικής αγωγής και αντίληψης παρουσίας ψύλλων στα κατοικίδια ζώα συντροφιάς με τη χρήση της μεθόδου αναφοράς IFAT<sup>231</sup>.

Οι ανευρεθείσες συχνότητες εμφάνισης αντισωμάτων για *B. henselae* (17,8%), *R. typhi* (4,5%) και *B. quintana* (0.0%) συμπίπτουν με προηγούμενες μελέτες στην Ελλάδα. Οι Tea et al. (2003)<sup>232</sup> ανέφεραν 19,8% οροθετικότητα για *B. henselae* IgG ενώ από Daniel et al. (2002) ανιχνεύθηκαν αντισώματα IgG κατά *R. typhi* σε ποσοστό 2,0%<sup>193</sup>. Μηδενική συχνότητα φορείας IgG κατά *B. quintana* συμπίπτει με αντίστοιχες μελέτες στο γενικό πληθυσμό σε άλλες χώρες<sup>233</sup> ενώ άστεγοι, που αποτελούν ομάδα υψηλού κινδύνου για οροθετικότητα<sup>234</sup>, δεν συμμετείχαν στη μελέτη μας.

Οι παράγοντες που επηρέασαν θετικά τη συχνότητα φορείας αντισωμάτων για *B. henselae* ήταν η νεαρή ηλικία και η διαμονή στην Περιφερειακή Ενότητα Πειραιά. Όσο αφορά τη συσχέτιση με την ηλικία αντίστοιχο αποτέλεσμα είχε παρατηρηθεί και σε παλαιότερη μελέτη στην Ελλάδα<sup>232</sup> που ανέφεραν ότι οι ηλικιακές ομάδες 2-14 και 30-50 ετών εμφάνιζαν υψηλότερη συχνότητα.

Στην Περιφερειακή Ενότητα Πειραιά βρίσκεται το μεγαλύτερο εμπορικό και επιβατικό λιμάνι της χώρας. Δεν εντοπίσαμε στη διεθνή βιβλιογραφία μελέτες που μελετούν τον επιπολασμό αντισωμάτων IgG κατά *Bartonella* spp. σε κατοίκους λιμανιών σε σύγκριση με όσους κατοικούν στην ενδοχώρα. Έχει υποστηριχθεί ότι η εισροή αρουραίων από πλοία έχει ως αποτέλεσμα το ποσοστό μόλυνσης από *Bartonella* spp. των αρουραίων που ζουν σε λιμάνια να είναι υψηλότερο από αυτών που ζουν στην ενδοχώρα<sup>235</sup>. Για τη *R. typhi* όμως έχει αναφερθεί ότι κάτοικοι σε περιοχές με λιμάνια έχουν αυξημένη πιθανότητα οροθετικότητας<sup>236</sup>.

Τα ευρήματά μας σε συνδυασμό με την προϋπάρχουσα γνώση μας οδηγούν στην υπόθεση ότι η συχνή εισαγωγή μέσω των πλοίων μολυσμένων αρουραίων έχει ως αποτέλεσμα υψηλότερη πυκνότητα μολυσμένων ψύλλων και αυξημένη πιθανότητα έκθεσης των ανθρώπων σε ελεύθερα κυκλοφορούντες ψύλλους. Αυτό ενισχύεται και από το γεγονός ότι επαφή με κατοικίδια ζώα συντροφιάς δεν φαίνεται να επηρεάζει την φορεία αντισωμάτων. Ωστόσο και άλλοι παράγοντες μπορεί να επηρεάζουν το περιβαλλοντικό φορτίο όσο αφορά μολυσματικούς ψύλλους όπως το ίδιο το μέγεθος του πληθυσμού των αρουραίων ή άλλοι οικολογικοί παράγοντες που σχετίζονται με την αστική πανίδα.

Για κανένα από τα *B. henselae* και *R. typhi* δεν βρέθηκε συσχέτιση των εξεταζόμενων παραγόντων με τη στάθμη του τίτλου των αντισωμάτων. Σε προηγούμενη μελέτη στην Ελλάδα, η μεγαλύτερη ηλικία, κτηνοτροφικά επαγγέλματα και διαμονή σε αγροτικές περιοχές σε δημιουργούσαν προδιάθεση για εμφάνιση οροθετικότητας για *R. typhi*<sup>193</sup> και αντίστοιχα αποτελέσματα έχουν βρεθεί και σε μελέτες στο εξωτερικό<sup>237</sup>. Ωστόσο η δική μας μελέτη αφορούσε κατοίκους κυρίως αστικών περιοχών χωρίς κτηνοτροφική ενασχόληση. Επιπλέον ο αριθμός συμμετεχόντων στη μελέτη δεν ήταν επαρκής για να επιτύχει στατιστικώς σημαντικές διαπιστώσεις με τόσο χαμηλή συχνότητα οροθετικότητας για IgG έναντι *R. typhi*.

Όσο αφορά τη χρησιμοποιηθείσα μέθοδο, η IFAT, μέθοδος αναφοράς, μπορεί να έχει προβλήματα υποκειμενικότητας όσο αφορά την μικροσκοπική αξιολόγηση του ανοσοφθορισμού<sup>238</sup>. Τα αποτελέσματα της μικροσκόπησης όμως επιβεβαιωνόταν με δεύτερο αξιολογητή και σε περίπτωση διχογνωμίας από ένα τρίτο, ωστόσο δε σημειώθηκε σε κανένα δείγμα διάσταση όσο αφορά το αποτέλεσμα του ανοσοφθορισμού.

Μία εγγενής αδυναμία της μεθόδου είναι ότι σε περίπτωση που ένα δείγμα φέρει αντισώματα και κατά *B. henselae* και κατά *B. quintana* το θετικό αποτέλεσμα θα κατακυρωθεί στο αντιγονικό υπόστρωμα που θα παρουσιάζει ισχυρότερο ανοσοφθορισμό με αποτέλεσμα να χάνεται η πληροφορία της φορέας αντισωμάτων για το έτερο παθογόνο. Επιπλέον, στην IFAT τα θετικά αποτελέσματα μπορεί να είναι ψευδή λόγω διασταυρούμενων αντιδράσεων, όπως τέτοιες μπορεί να παρατηρηθούν μεταξύ *Bartonella* και *Chlamydia* ή *Coxiella*, μεταξύ ειδών *Bartonella* και μεταξύ ειδών *Rickettsia* ιδίως εντός των ομάδων TG και SFG αλλά και μεταξύ ειδών *Rickettsia* από διαφορετικές ομάδες όπως π.χ. *R. typhi* και *R. felis*<sup>21 239 240 241</sup>. Πιο εξεζητημένες τεχνικές όπως Western Blot assay και cross-absorption studies θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για διαφοροποίηση των IgG μεταξύ ειδών *Bartonella* και *Rickettsia*<sup>242 243</sup>, ωστόσο στη συγκεκριμένη μελέτη δεν χρησιμοποιήθηκαν.

Εν συντομία, τα ευρήματά μας δείχνουν έκθεση του πληθυσμού της Αττικής σε *Bartonella* spp. και λιγότερο σε *Rickettsia* spp. Τα λιμάνια μπορεί να αντιπροσωπεύουν περιοχές υψηλού κινδύνου για τους κατοίκους για έκθεση στη *Bartonella*. Κατά την εκτίμηση ασθενών με συμβατά συμπτώματα στην περιοχή της Αττικής θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη και τα συγκεκριμένα παθογόνα. Κρίνεται απαραίτητο να βελτιωθεί η δυνατότητα διάγνωσης και η επιδημιολογική επιτήρηση όσο αφορά τα *Bartonella* spp. και *Rickettsia* spp.



- <sup>1</sup> Harms A, Dehio C. Intruders below the radar: molecular pathogenesis of *Bartonella* spp. *Clin Microbiol Rev.* 2012;25(1):42–78. doi:10.1128/CMR.05009-11
- <sup>2</sup> Maguina C, Garcia PJ, Gotuzzo E, Cordero L, Spach DH. Bartonellosis (Carrión's disease) in the modern era. *Clin Infect Dis.* 2001;33(6):772–779. doi:10.1086/322614
- <sup>3</sup> Ohl ME, Spach DH. Bartonella quintana and urban trench fever. *Clin Infect Dis.* 2000;31(1):131–135. doi:10.1086/313890
- <sup>4</sup> Roux V, Raoult D. Inter- and intraspecies identification of *Bartonella* (Rochalimaea) species. *J Clin Microbiol.* 1995;33(6):1573–1579.
- <sup>5</sup> Brenner DJ, O'Connor SP, Winkler HH, Steigerwalt AG. 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.* 1993;43(4):777–786. doi:10.1099/00207713-43-4-777
- <sup>6</sup> Regnery RL, Anderson BE, Clarridge JE 3rd, Rodriguez-Barradas MC, Jones DC, Carr JH. Characterization of a novel Rochalimaea species, *R. henselae* sp. nov., isolated from blood of a febrile, human immunodeficiency virus-positive patient. *J Clin Microbiol.* 1992;30(2):265–274.
- <sup>7</sup> Raoult D, Fournier PE, Vandenesch F, et al. Outcome and treatment of *Bartonella* endocarditis. *Arch Intern Med.* 2003;163(2):226–230. doi:10.1001/archinte.163.2.226
- <sup>8</sup> Legendre KP, Macaluso KR. Rickettsia felis: A Review of Transmission Mechanisms of an Emerging Pathogen. *Trop Med Infect Dis.* 2017;2(4):64. doi:10.3390/tropicalmed2040064
- <sup>9</sup> Schriefer ME, Sacci JB Jr, Dumler JS, Bullen MG, Azad AF. Identification of a novel rickettsial infection in a patient diagnosed with murine typhus. *J Clin Microbiol.* 1994;32(4):949–954.
- <sup>10</sup> Higgins JA, Radulovic S, Schriefer ME, Azad AF. Rickettsia felis: a new species of pathogenic rickettsia isolated from cat fleas. *J Clin Microbiol.* 1996;34(3):671–674.
- <sup>11</sup> Bouyer DH, Stenos J, Crocquet-Valdes P, et al. Rickettsia felis: molecular characterization of a new member of the spotted fever group. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2001;51(Pt 2):339–347. doi:10.1099/00207713-51-2-339
- <sup>12</sup> La Scola B, Meconi S, Fenollar F, Rolain JM, Roux V, Raoult D. Emended description of Rickettsia felis (Bouyer et al. 2001), a temperature-dependent cultured bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2002;52(Pt 6):2035–2041. doi:10.1099/00207713-52-6-2035
- <sup>13</sup> Adams JR, Schmidtman ET, Azad AF. Infection of colonized cat fleas, Ctenocephalides felis (Bouché), with a rickettsia-like microorganism. *Am J Trop Med Hyg.* 1990;43(4):400–409. doi:10.4269/ajtmh.1990.43.400

- 
- <sup>14</sup> Parola P. *Rickettsia felis*: from a rare disease in the USA to a common cause of fever in sub-Saharan Africa. *Clin Microbiol Infect.* 2011;17(7):996–1000. doi:10.1111/j.1469-0691.2011.03516.x
- <sup>15</sup> Civen R, Ngo V. Murine typhus: an unrecognized suburban vectorborne disease. *Clin Infect Dis.* 2008;46(6):913–918. doi:10.1086/527443
- <sup>16</sup> McLeod MP, Qin X, Karpathy SE, et al. Complete genome sequence of *Rickettsia typhi* and comparison with sequences of other rickettsiae. *J Bacteriol.* 2004;186(17):5842–5855. doi:10.1128/JB.186.17.5842-5855.2004
- <sup>17</sup> Clark NJ, Seddon JM, Šlapeta J, Wells K. Parasite spread at the domestic animal - wildlife interface: anthropogenic habitat use, phylogeny and body mass drive risk of cat and dog flea (*Ctenocephalides* spp.) infestation in wild mammals. *Parasit Vectors.* 2018;11(1):8. Published 2018 Jan 8. doi:10.1186/s13071-017-2564-z
- <sup>18</sup> Youssefi MR, Ebrahimpour S, Rezaei M, Ahmadpour E, Rakhshanpour A, Rahimi MT. Dermatitis caused by *Ctenocephalides felis* (cat flea) in human. *Caspian J Intern Med.* 2014;5(4):248-250.
- <sup>19</sup> Dumler JS, Taylor JP, Walker DH. Clinical and laboratory features of murine typhus in south Texas, 1980 through 1987. *JAMA.* 1991 Sep 11;266(10):1365-70.
- <sup>20</sup> Rust MK. The Biology and Ecology of Cat Fleas and Advancements in Their Pest Management: A Review. *Insects.* 2017;8(4):118. Published 2017 Oct 27. doi:10.3390/insects8040118
- <sup>21</sup> Okaro U, Addisu A, Casanas B, Anderson B. *Bartonella* Species, an Emerging Cause of Blood-Culture-Negative Endocarditis. *Clin Microbiol Rev.* 2017;30(3):709–746. doi:10.1128/CMR.00013-17
- <sup>22</sup> Baldani C.D., Santos H.A., Massard C.L. (2014) The Family *Bartonellaceae*. In: Rosenberg E., DeLong E.F., Lory S., Stackebrandt E., Thompson F. (eds) *The Prokaryotes*. Springer, Berlin, Heidelberg
- <sup>23</sup> Diddi K, Chaudhry R, Sharma N, Dhawan B. Strategy for identification & characterization of *Bartonella henselae* with conventional & molecular methods. *Indian J Med Res.* 2013;137(2):380–387.
- <sup>24</sup> Maurin M, Birtles R, Raoult D. Current knowledge of *Bartonella* species. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1997;16(7):487–506. doi:10.1007/bf01708232
- <sup>25</sup> Chenoweth MR, Somerville GA, Krause DC, O'Reilly KL, Gherardini FC. Growth characteristics of *Bartonella henselae* in a novel liquid medium: primary isolation, growth-phase-dependent phage induction, and metabolic studies. *Appl Environ Microbiol.* 2004;70(2):656–663. doi:10.1128/aem.70.2.656-663.2004
- <sup>26</sup> Maggi RG, Duncan AW, Breitschwerdt EB. Novel chemically modified liquid medium that will support the growth of seven bartonella species. *J Clin Microbiol.* 2005;43(6):2651-2655. doi:10.1128/JCM.43.6.2651-2655.2005

- 
- <sup>27</sup> Ereemeeva ME, Gerns HL, Lydy SL, et al. Bacteremia, fever, and splenomegaly caused by a newly recognized *Bartonella* species. *N Engl J Med*. 2007;356(23):2381–2387. doi:10.1056/NEJMoa065987
- <sup>28</sup> Benson LA, Kar S, McLaughlin G, Ihler GM. Entry of *Bartonella* bacilliformis into erythrocytes. *Infect Immun*. 1986;54(2):347–353.
- <sup>29</sup> Zähringer U, Lindner B, Knirel YA, et al. Structure and biological activity of the short-chain lipopolysaccharide from *Bartonella henselae* ATCC 49882T. *J Biol Chem*. 2004;279(20):21046–21054. doi:10.1074/jbc.M313370200
- <sup>30</sup> Popa C, Abdollahi-Roodsaz S, Joosten LA, et al. *Bartonella* quintana lipopolysaccharide is a natural antagonist of Toll-like receptor 4. *Infect Immun*. 2007;75(10):4831–4837. doi:10.1128/IAI.00237-07
- <sup>31</sup> Andersen-Nissen E, Smith KD, Strobe KL, et al. Evasion of Toll-like receptor 5 by flagellated bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(26):9247–9252. doi:10.1073/pnas.0502040102
- <sup>32</sup> Schülein R, Seubert A, Gille C, et al. Invasion and persistent intracellular colonization of erythrocytes. A unique parasitic strategy of the emerging pathogen *Bartonella*. *J Exp Med*. 2001;193(9):1077–1086. doi:10.1084/jem.193.9.1077
- <sup>33</sup> Dehio C. *Bartonella*-host-cell interactions and vascular tumour formation. *Nat Rev Microbiol*. 2005;3(8):621–631. doi:10.1038/nrmicro1209
- <sup>34</sup> Greub G, Raoult D. *Bartonella*: new explanations for old diseases. *J Med Microbiol*. 2002;51(11):915–923. doi:10.1099/0022-1317-51-11-915
- <sup>35</sup> Foucault C, Brouqui P, Raoult D. *Bartonella* quintana characteristics and clinical management. *Emerg Infect Dis*. 2006;12(2):217–223. doi:10.3201/eid1202.05
- <sup>36</sup> Mändle T, Einsele H, Schaller M, et al. Infection of human CD34+ progenitor cells with *Bartonella henselae* results in intraerythrocytic presence of *B. henselae*. *Blood*. 2005;106(4):1215–1222. doi:10.1182/blood-2004-12-4670
- <sup>37</sup> Maguiña C, Guerra H, Ventosilla P. Bartonellosis. *Clin Dermatol*. 2009;27(3):271–280. doi:10.1016/j.clindermatol.2008.10.006
- <sup>38</sup> Garcia FU, Wojta J, Broadley KN, Davidson JM, Hoover RL. *Bartonella* bacilliformis stimulates endothelial cells in vitro and is angiogenic in vivo. *Am J Pathol*. 1990;136(5):1125–1135.
- <sup>39</sup> Min KW, Reed JA, Welch DF, Slater LN. Morphologically variable bacilli of cat scratch disease are identified by immunocytochemical labeling with antibodies to *Rochalimaea henselae*. *Am J Clin Pathol*. 1994;101(5):607–610. doi:10.1093/ajcp/101.5.607
- <sup>40</sup> LeBoit PE, Berger TG, Egbert BM, Beckstead JH, Yen TS, Stoler MH. Bacillary angiomatosis. The histopathology and differential diagnosis of a pseudoneoplastic infection in patients with human immunodeficiency virus disease. *Am J Surg Pathol*. 1989;13(11):909–920.

- 
- <sup>41</sup> Chiaraviglio L, Duong S, Brown DA, Birtles RJ, Kirby JE. An immunocompromised murine model of chronic *Bartonella* infection. *Am J Pathol.* 2010;176(6):2753–2763. doi:10.2353/ajpath.2010.090862
- <sup>42</sup> Truttmann MC, Misselwitz B, Huser S, Hardt WD, Critchley DR, Dehio C. *Bartonella henselae* engages inside-out and outside-in signaling by integrin  $\beta 1$  and talin1 during invasome-mediated bacterial uptake. *J Cell Sci.* 2011;124(Pt 21):3591–3602. doi:10.1242/jcs.084459
- <sup>43</sup> Truttmann MC, Guye P, Dehio C. BID-F1 and BID-F2 domains of *Bartonella henselae* effector protein BepF trigger together with BepC the formation of invasome structures. *PLoS One.* 2011;6(10):e25106. doi:10.1371/journal.pone.0025106
- <sup>44</sup> Dehio C, Meyer M, Berger J, Schwarz H, Lanz C. Interaction of *Bartonella henselae* with endothelial cells results in bacterial aggregation on the cell surface and the subsequent engulfment and internalisation of the bacterial aggregate by a unique structure, the invasome. *J Cell Sci.* 1997;110 ( Pt 18):2141–2154.
- <sup>45</sup> Rhomberg TA, Truttmann MC, Guye P, Ellner Y, Dehio C. A translocated protein of *Bartonella henselae* interferes with endocytic uptake of individual bacteria and triggers uptake of large bacterial aggregates via the invasome. *Cell Microbiol.* 2009;11(6):927–945. doi:10.1111/j.1462-5822.2009.01302.x
- <sup>46</sup> Schmidgen T, Kaiser PO, Ballhorn W, Franz B, Göttig S, Linke D, Kempf VA. Heterologous expression of *Bartonella* adhesin A in *Escherichia coli* by exchange of trimeric autotransporter adhesin domains results in enhanced adhesion properties and a pathogenic phenotype. *J Bacteriol.* 2014 Jun;196(12):2155–65. doi: 10.1128/JB.01461-13.
- <sup>47</sup> Zhang P, Chomel BB, Schau MK, et al. A family of variably expressed outer-membrane proteins (Vomp) mediates adhesion and autoaggregation in *Bartonella quintana*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(37):13630–13635. doi:10.1073/pnas.0405284101
- <sup>48</sup> Schulte B, Linke D, Klumpp S, et al. *Bartonella quintana* variably expressed outer membrane proteins mediate vascular endothelial growth factor secretion but not host cell adherence. *Infect Immun.* 2006;74(9):5003–5013. doi:10.1128/IAI.00663-06
- <sup>49</sup> RestoRuiz SI, Schmiederer M, Sweger D, Newton C, Klein TW, Friedman H, Anderson BE. Induction of a potential paracrine angiogenic loop between human THP-1 macrophages and human microvascular endothelial cells during *Bartonella henselae* infection. *Infect Immun.* 2002;70:4564–4570. doi:10.1128/IAI.70.8.4564-4570.2002.
- <sup>50</sup> O'Rourke F, Schmidgen T, Kaiser PO, Linke D, VA. Adhesins of *Bartonella* spp. *Adv Exp Med Biol.* 2011;715:51-70. doi: 10.1007/978-94-007-0940-9\_4.
- <sup>51</sup> Gilmore RD Jr, Bellville TM, Sviat SL, Frace M. The *Bartonella vinsonii* subsp. *arupensis* immunodominant surface antigen BrpA gene, encoding a 382-kilodalton protein composed of repetitive sequences, is a member of a multigene family conserved among bartonella species. *Infect Immun.* 2005 May;73(5):3128-36.
- <sup>52</sup> Qin W, Wang L, Lei L. New findings on the function and potential applications of the trimeric autotransporter adhesin. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2015 Jul;108(1):1-14. doi: 10.1007/s10482-015-0477-4.

- 
- <sup>53</sup> Lima A, Cha BJ, Amin J, Smith LK, Anderson B. Zebrafish embryo model of *Bartonella henselae* infection. *Zebrafish*. 2014 Oct;11(5):434-46. doi:10.1089/zeb.2014.1001.
- <sup>54</sup> Kempf VA, Schaller M, Behrendt S, Volkmann B, Aepfelbacher M, Cakman I, Autenrieth IB. Interaction of *Bartonella henselae* with endothelial cells results in rapid bacterial rRNA synthesis and replication. *Cell Microbiol*. 2000 Oct;2(5):431-41.
- <sup>55</sup> Mavris M, Saenz H, Monteil M, Boulouis HJ, Dehio C, Vayssier-Taussat M. Characterization of genes involved in long-term bacteremia in mice by *Bartonella birtlesii*. *Ann N Y Acad Sci*. 2005 Dec;1063:312-4.
- <sup>56</sup> Dehio C. Infection-associated type IV secretion systems of *Bartonella* and their diverse roles in host cell interaction. *Cell Microbiol*. 2008 Aug;10(8):1591-8. doi: 10.1111/j.1462-5822.2008.01171.x.
- <sup>57</sup> Roden JA, Wells DH, Chomel BB, Kasten RW, Koehler JE. Hemin binding protein C is found in outer membrane vesicles and protects *Bartonella henselae* against toxic concentrations of hemin. *Infect Immun*. 2012;80(3):929-942. doi:10.1128/IAI.05769-11
- <sup>58</sup> Zlamy M. Rediscovering Pertussis. *Front Pediatr*. 2016;4:52. Published 2016 Jun 8. doi:10.3389/fped.2016.00052
- <sup>59</sup> Arnal L, Longo G, Stupar P, Castez MF, Cattelan N, Salvarezza RC, Yantorno OM, Kasas S, Vela ME. Localization of adhesins on the surface of a pathogenic bacterial envelope through atomic force microscopy. *Nanoscale*. 2015 Nov 7;7(41):17563-72. doi: 10.1039/c5nr04644k.
- <sup>60</sup> Mégroz M, Kleifeld O, Wright A, Powell D, Harrison P, Adler B, Harper M, Boyce JD. The RNA-Binding Chaperone Hfq Is an Important Global Regulator of Gene Expression in *Pasteurella multocida* and Plays a Crucial Role in Production of a Number of Virulence Factors, Including Hyaluronic Acid Capsule. *Infect Immun*. 2016 Apr 22;84(5):1361-1370. doi: 10.1128/IAI.00122-16.
- <sup>61</sup> Burgess AW, Paquet JY, Letesson JJ, Anderson BE. Isolation, sequencing and expression of *Bartonella henselae* omp43 and predicted membrane topology of the deduced protein. *Microb Pathog*. 2000 Aug;29(2):73-80.
- <sup>62</sup> Coleman SA, Minnick MF. Establishing a direct role for the *Bartonella bacilliformis* invasion-associated locus B (IalB) protein in human erythrocyte parasitism. *Infect Immun*. 2001 Jul;69(7):4373-81.
- <sup>63</sup> Kaiser PO, Linke D, Schwarz H, Leo JC, Kempf VA. Analysis of the BadA stalk from *Bartonella henselae* reveals domain-specific and domain-overlapping functions in the host cell infection process. *Cell Microbiol*. 2012 Feb;14(2):198-209. doi: 10.1111/j.1462-5822.2011.01711.x.
- <sup>64</sup> Edouard S, Nabet C, Lepidi H, Fournier PE, Raoult D. *Bartonella*, a common cause of endocarditis: a report on 106 cases and review. *J Clin Microbiol*. 2015 Mar;53(3):824-9. doi: 10.1128/JCM.02827-14.
- <sup>65</sup> Chiaraviglio L, Duong S, Brown DA, Birtles RJ, Kirby JE. An immunocompromised murine model of chronic *Bartonella* infection. *Am J Pathol*. 2010 Jun;176(6):2753-63. doi: 10.2353/ajpath.2010.090862.

- 
- <sup>66</sup> Dehio C. Bartonella-host-cell interactions and vascular tumour formation. *Nat Rev Microbiol.* 2005 Aug;3(8):621-31.
- <sup>67</sup> Mändle T, Einsele H, Schaller M, Neumann D, Vogel W, Autenrieth IB, Kempf VA. Infection of human CD34+ progenitor cells with Bartonella henselae results in intraerythrocytic presence of B. henselae. *Blood.* 2005 Aug 15;106(4):1215-22.
- <sup>68</sup> Salvatore P, Casamassimi A, Sommese L, Fiorito C, Ciccodicola A, Rossiello R, Avallone B, Grimaldi V, Costa V, Rienzo M, Colicchio R, Williams-Ignarro S, Pagliarulo C, Prudente ME, Abbondanza C, Lamberti F, Baroni A, Buommino E, Farzati B, Tufano MA, Ignarro LJ, Napoli C. Detrimental effects of Bartonella henselae are counteracted by L-arginine and nitric oxide in human endothelial progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Jul 8;105(27):9427-32. doi:10.1073/pnas.0803602105.
- <sup>69</sup> Pulliainen AT, Dehio C. Persistence of Bartonella spp. stealth pathogens: from subclinical infections to vasoproliferative tumor formation. *FEMS Microbiol Rev.* 2012;36(3):563–599. doi:10.1111/j.1574-6976.2012.00324.x
- <sup>70</sup> Alsmark CM, Frank AC, Karlberg EO, et al. The louse-borne human pathogen Bartonella quintana is a genomic derivative of the zoonotic agent Bartonella henselae. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(26):9716–9721. doi:10.1073/pnas.0305659101
- <sup>71</sup> La Scola B, Zeaiter Z, Khamis A, Raoult D. Gene-sequence-based criteria for species definition in bacteriology: the Bartonella paradigm. *Trends Microbiol.* 2003;11(7):318–321. doi:10.1016/s0966-842x(03)00143-4
- <sup>72</sup> Gutiérrez R, Vayssier-Taussat M, Buffet JP, Harrus S. Guidelines for the Isolation, Molecular Detection, and Characterization of Bartonella Species. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2017;17(1):42–50. doi:10.1089/vbz.2016.1956
- <sup>73</sup> Zeaiter Z, Liang Z, Raoult D. Genetic classification and differentiation of Bartonella species based on comparison of partial ftsZ gene sequences. *J Clin Microbiol.* 2002;40(10):3641–3647. doi:10.1128/jcm.40.10.3641-3647.2002
- <sup>74</sup> Al-Soud WA, Rådström P. Purification and characterization of PCR-inhibitory components in blood cells. *J Clin Microbiol.* 2001;39(2):485–493. doi:10.1128/JCM.39.2.485-493.2001
- <sup>75</sup> Bai Y, Kosoy MY, Boonmar S, Sawatwong P, Sangmaneedet S, Peruski LF. Enrichment culture and molecular identification of diverse Bartonella species in stray dogs. *Vet Microbiol.* 2010;146(3-4):314–319. doi:10.1016/j.vetmic.2010.05.017
- <sup>76</sup> Maggi RG, Breitschwerdt EB. Potential limitations of the 16S-23S rRNA intergenic region for molecular detection of Bartonella species. *J Clin Microbiol.* 2005;43(3):1171–1176. doi:10.1128/JCM.43.3.1171-1176.2005
- <sup>77</sup> Jensen WA, Fall MZ, Rooney J, Kordick DL, Breitschwerdt EB. Rapid identification and differentiation of Bartonella species using a single-step PCR assay. *J Clin Microbiol.* 2000;38(5):1717–1722.
- <sup>78</sup> Roux V, Raoult D. The 16S-23S rRNA intergenic spacer region of Bartonella (Rochalimaea) species is longer than usually described in other bacteria. *Gene.* 1995;156(1):107–111. doi:10.1016/0378-1119(94)00919-j

- 
- <sup>79</sup> Theonest NO, Carter RW, Amani N, et al. Molecular detection and genetic characterization of *Bartonella* species from rodents and their associated ectoparasites from northern Tanzania. *PLoS One*. 2019;14(10):e0223667. Published 2019 Oct 15. doi:10.1371/journal.pone.0223667
- <sup>80</sup> Diaz MH, Bai Y, Malania L, Winchell JM, Kosoy MY. Development of a novel genus-specific real-time PCR assay for detection and differentiation of *Bartonella* species and genotypes. *J Clin Microbiol*. 2012 May;50(5):1645-9. doi:10.1128/JCM.06621-11.
- <sup>81</sup> Rolain JM, Brouqui P, Koehler JE, Maguina C, Dolan MJ, Raoult D. Recommendations for treatment of human infections caused by *Bartonella* species. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48(6):1921–1933. doi:10.1128/AAC.48.6.1921-1933.2004
- <sup>82</sup> Jacomo V, Kelly PJ, Raoult D. Natural history of *Bartonella* infections (an exception to Koch's postulate). *Clin Diagn Lab Immunol*. 2002;9(1):8–18. doi:10.1128/cdli.9.1.8-18.2002
- <sup>83</sup> Rolain JM, Maurin M, Mallet MN, Parzy D, Raoult D. Culture and antibiotic susceptibility of *Bartonella quintana* in human erythrocytes. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003;47(2):614–619. doi:10.1128/aac.47.2.614-619.2003
- <sup>84</sup> Kordick DL, Papich MG, Breitschwerdt EB. Efficacy of enrofloxacin or doxycycline for treatment of *Bartonella henselae* or *Bartonella clarridgeiae* infection in cats. *Antimicrob Agents Chemother*. 1997;41(11):2448–2455.
- <sup>85</sup> Álvarez-Fernández A, Breitschwerdt EB, Solano-Gallego L. *Bartonella* infections in cats and dogs including zoonotic aspects. *Parasit Vectors*. 2018;11(1):624. Published 2018 Dec 4. doi:10.1186/s13071-018-3152-6
- <sup>86</sup> Foucault C, Barrau K, Brouqui P, Raoult D. *Bartonella quintana* Bacteremia among Homeless People. *Clin Infect Dis*. 2002;35(6):684–689. doi:10.1086/342065
- <sup>87</sup> Lin EY, Tsigrelis C, Baddour LM, et al. Candidatus *Bartonella mayotimonensis* and endocarditis. *Emerg Infect Dis*. 2010;16(3):500–503. doi:10.3201/eid1603.081673
- <sup>88</sup> Angelakis E, Raoult D. Pathogenicity and treatment of *Bartonella* infections. *Int J Antimicrob Agents*. 2014;44(1):16–25. doi:10.1016/j.ijantimicag.2014.04.006
- <sup>89</sup> Koehler JE, Sanchez MA, Tye S, et al. Prevalence of *Bartonella* infection among human immunodeficiency virus-infected patients with fever. *Clin Infect Dis*. 2003;37(4):559–566. doi:10.1086/375586
- <sup>90</sup> Forrestel AK, Naujokas A, Martin JN, et al. Bacillary angiomatosis masquerading as Kaposi's sarcoma in East Africa. *J Int Assoc Provid AIDS Care*. 2015;14(1):21–25. doi:10.1177/2325957414521497
- <sup>91</sup> Álvarez-Fernández A, Breitschwerdt EB, Solano-Gallego L. *Bartonella* infections in cats and dogs including zoonotic aspects. *Parasit Vectors*. 2018;11(1):624. Published 2018 Dec 4. doi:10.1186/s13071-018-3152-6
- <sup>92</sup> Urushadze L, Bai Y, Osikowicz L, McKee C, Sidamonidze K, Putkaradze D, Imnadze P, Kandaurov A, Kuzmin I, Kosoy M *PLoS Negl Trop Dis*. 2017 Apr; 11(4):e0005428.

- 
- <sup>93</sup> Rozental T, Ferreira MS, Guterres A, Mares-Guia MA, Teixeira BR, Gonçalves J, Bonvicino CR, D'Andrea PS, de Lemos ER Zoonotic pathogens in Atlantic Forest wild rodents in Brazil: Bartonella and Coxiella infections. *Acta Trop.* 2017 Apr; 168():64-73.
- <sup>94</sup> Chomel BB, Boulouis HJ. Zoonoses dues aux bactéries du genre *Bartonella*: nouveaux réservoirs? Nouveaux vecteurs? [Zoonotic diseases caused by bacteria of the genus *Bartonella* genus: new reservoirs ? New vectors?]. *Bull Acad Natl Med.* 2005;189(3):465–480.
- <sup>95</sup> Gonçalves LR, Favacho AR, Roque AL, et al. Association of Bartonella Species with Wild and Synanthropic Rodents in Different Brazilian Biomes. *Appl Environ Microbiol.* 2016;82(24):7154-7164. Published 2016 Nov 21. doi:10.1128/AEM.02447-16
- <sup>96</sup> Veikkolainen V, Vesterinen EJ, Lilley TM, Pulliainen AT. Bats as reservoir hosts of human bacterial pathogen, *Bartonella mayotimonensis*. *Emerg Infect Dis.* 2014;20(6):960-967. doi:10.3201/eid2006.130956
- <sup>97</sup> Mietze A, Strube C, Beyerbach M, Schnieder T, Goethe R. Occurrence of *Bartonella henselae* and *Borrelia burgdorferi* sensu lato co-infections in ticks collected from humans in Germany. *Clin Microbiol Infect.* 2011;17(6):918-920. doi:10.1111/j.1469-0691.2010.03363.x
- <sup>98</sup> Koehler JE, Sanchez MA, Tye S, et al. Prevalence of Bartonella infection among human immunodeficiency virus-infected patients with fever. *Clin Infect Dis.* 2003;37(4):559-566. doi:10.1086/375586
- <sup>99</sup> Chmielewski T, Podsiadły E, Tylewska-Wierzbanowska S. Presence of Bartonella spp. in various human populations. *Pol J Microbiol.* 2007;56(1):33-38.
- <sup>100</sup> Faccini-Martínez ÁA, Márquez AC, Bravo-Estupiñan DM, et al. Bartonella quintana and Typhus Group Rickettsiae Exposure among Homeless Persons, Bogotá, Colombia. *Emerg Infect Dis.* 2017;23(11):1876-1879. doi:10.3201/eid2311.170341
- <sup>101</sup> Chmielewska-Badora J, Moniuszko A, Żukiewicz-Sobczak W, Zwoliński J, Piątek J, Pancewicz S. Serological survey in persons occupationally exposed to tick-borne pathogens in cases of co-infections with *Borrelia burgdorferi*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Bartonella* spp. and *Babesia microti*. *Ann Agric Environ Med.* 2012;19(2):271-274.
- <sup>102</sup> Diniz PP, Velho PE, Pitassi LH, et al. Risk Factors for Bartonella species Infection in Blood Donors from Southeast Brazil. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016;10(3):e0004509. Published 2016 Mar 21. doi:10.1371/journal.pntd.0004509
- <sup>103</sup> McGill S, Wesslén L, Hjelm E, Holmberg M, Auvinen MK, Berggren K, Grandin-Jarl B, Johnson U, Wikström S, Friman G. Bartonella spp. seroprevalence in healthy Swedish blood donors. *Scand J Infect Dis.* 2005;37(10):723-30.
- <sup>104</sup> Oteo JA, Maggi R, Portillo A, et al. Prevalence of Bartonella spp. by culture, PCR and serology, in veterinary personnel from Spain. *Parasit Vectors.* 2017;10(1):553. Published 2017 Nov 7. doi:10.1186/s13071-017-2483-z
- <sup>105</sup> Gillespie JJ, Beier MS, Rahman MS, Ammerman NC, Shallom JM, Purkayastha A, Sobral BS, Azad AF. Plasmids and rickettsial evolution: insight from *Rickettsia felis*. *PLoS One.* 2007 Mar 7;2(3):e266.



- 
- <sup>106</sup> Fournier PE, Raoult D. Current knowledge on phylogeny and taxonomy of *Rickettsia* spp. *Ann N Y Acad Sci*. 2009 May;1166:1-11. doi:10.1111/j.1749-6632.2009.04528.x.
- <sup>107</sup> Merhej V, Notredame C, Royer-Carenzi M, Pontarotti P, Raoult D. The rhizome of life: the sympatric *Rickettsia felis* paradigm demonstrates the random transfer of DNA sequences. *Mol Biol Evol*. 2011;28(11):3213–3223.
- <sup>108</sup> Fournier PE, Belghazi L, Robert C, Elkarkouri K, Richards AL, Greub G, Collyn F, Ogawa M, Portillo A, Oteo JA, Psaroulaki A, Bitam I, Raoult D. Variations of plasmid content in *Rickettsia felis*. *PLoS One*. 2008 May 28;3(5):e2289. doi:10.1371/journal.pone.0002289.
- <sup>109</sup> Hun L, Troyo A. An update on the detection and treatment of *Rickettsia felis*. *Res Rep Trop Med*. 2012;3:47–55. Published 2012 Jun 21. doi:10.2147/RRTM.S24753
- <sup>110</sup> Sunyakumthorn P, Bourchookarn A, Pornwiroon W, David C, Barker SA, Macaluso KR. Characterization and growth of polymorphic *Rickettsia felis* in a tick cell line. *Appl Environ Microbiol*. 2008;74(10):3151-3158. doi:10.1128/AEM.00025-08
- <sup>111</sup> Socolovschi C, Mediannikov O, Sokhna C, et al. *Rickettsia felis*-associated uneruptive fever, Senegal. *Emerg Infect Dis*. 2010;16(7):1140-1142. doi:10.3201/eid1607.100070
- <sup>112</sup> Mediannikov O, Fenollar F, Bassene H, et al. Description of "yaaf", the vesicular fever caused by acute *Rickettsia felis* infection in Senegal. *J Infect*. 2013;66(6):536-540. doi:10.1016/j.jinf.2012.10.005
- <sup>113</sup> Walker DH, Hudnall SD, Szaniawski WK, Feng HM. Monoclonal antibody-based immunohistochemical diagnosis of rickettsialpox: the macrophage is the principal target. *Mod Pathol*. 1999 May;12(5):529-33.
- <sup>114</sup> Uchiyama T. Tropism and pathogenicity of rickettsiae. *Front Microbiol*. 2012 Jun 25;3:230. doi: 10.3389/fmicb.2012.00230.
- <sup>115</sup> Whitworth T, Popov VL, Yu XJ, Walker DH, Bouyer DH. Expression of the *Rickettsia prowazekii* pld or tlyC gene in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium mediates phagosomal escape. *Infect Immun*. 2005 Oct;73(10):6668-73.
- <sup>116</sup> Cardwell MM, Martinez JJ. The Sca2 autotransporter protein from *Rickettsia conorii* is sufficient to mediate adherence to and invasion of cultured mammalian cells. *Infect Immun*. 2009 Dec;77(12):5272-80. doi: 10.1128/IAI.00201-09.
- <sup>117</sup> Chan YG, Cardwell MM, Hermanas TM, Uchiyama T, Martinez JJ. Rickettsial outer-membrane protein B (rOmpB) mediates bacterial invasion through Ku70 in an actin, c-Cbl, clathrin and caveolin 2-dependent manner. *Cell Microbiol*. 2009;11(4):629-644. doi:10.1111/j.1462-5822.2008.01279.x
- <sup>118</sup> Fournier PE, El Karkouri K, Leroy Q, et al. Analysis of the *Rickettsia africae* genome reveals that virulence acquisition in *Rickettsia* species may be explained by genome reduction. *BMC Genomics*. 2009;10:166. Published 2009 Apr 20. doi:10.1186/1471-2164-10-166
- <sup>119</sup> Teyssie N, Boudier JA, Raoult D. *Rickettsia conorii* entry into Vero cells. *Infect Immun*. 1995;63(1):366-374.

- 
- <sup>120</sup> Crocquet-Valdes PA, Díaz-Montero CM, Feng HM, Li H, Barrett AD, Walker DH. Immunization with a portion of rickettsial outer membrane protein A stimulates protective immunity against spotted fever rickettsiosis. *Vaccine*. 2001;20(5-6):979-988. doi:10.1016/s0264-410x(01)00377-2
- <sup>121</sup> Chan YG, Cardwell MM, Hermanas TM, Uchiyama T, Martinez JJ. Rickettsial outer-membrane protein B (rOmpB) mediates bacterial invasion through Ku70 in an actin, c-Cbl, clathrin and caveolin 2-dependent manner. *Cell Microbiol*. 2009;11(4):629-644. doi:10.1111/j.1462-5822.2008.01279.x
- <sup>122</sup> Chan YG, Cardwell MM, Hermanas TM, Uchiyama T, Martinez JJ. Rickettsial outer-membrane protein B (rOmpB) mediates bacterial invasion through Ku70 in an actin, c-Cbl, clathrin and caveolin 2-dependent manner. *Cell Microbiol*. 2009;11(4):629-644. doi:10.1111/j.1462-5822.2008.01279.x
- <sup>123</sup> Martinez JJ, Seveau S, Veiga E, Matsuyama S, Cossart P. Ku70, a component of DNA-dependent protein kinase, is a mammalian receptor for *Rickettsia conorii*. *Cell*. 2005;123(6):1013-1023. doi:10.1016/j.cell.2005.08.046
- <sup>124</sup> Martinez JJ, Cossart P. Early signaling events involved in the entry of *Rickettsia conorii* into mammalian cells. *J Cell Sci*. 2004;117(Pt 21):5097-5106. doi:10.1242/jcs.01382
- <sup>125</sup> Renesto P, Samson L, Ogata H, et al. Identification of two putative rickettsial adhesins by proteomic analysis. *Res Microbiol*. 2006;157(7):605-612. doi:10.1016/j.resmic.2006.02.002
- <sup>126</sup> Ogata H, Robert C, Audic S, et al. *Rickettsia felis*, from culture to genome sequencing. *Ann N Y Acad Sci*. 2005;1063:26-34. doi:10.1196/annals.1355.004
- <sup>127</sup> Fournier PE, Dumler JS, Greub G, Zhang J, Wu Y, Raoult D. Gene sequence-based criteria for identification of new rickettsia isolates and description of *Rickettsia heilongjiangensis* sp. nov. *J Clin Microbiol*. 2003;41(12):5456-5465. doi:10.1128/jcm.41.12.5456-5465.2003
- <sup>128</sup> Leitner M, Yitzhaki S, Rzotkiewicz S, Keysary A. Polymerase chain reaction-based diagnosis of Mediterranean spotted fever in serum and tissue samples. *Am J Trop Med Hyg*. 2002 Aug;67(2):166-9.
- <sup>129</sup> Ramírez-Hernández A, Montoya V, Martínez A, et al. Molecular detection of *Rickettsia felis* in different flea species from Caldas, Colombia. *Am J Trop Med Hyg*. 2013;89(3):453-459. doi:10.4269/ajtmh.12-0698
- <sup>130</sup> Jiang J, Stromdahl EY, Richards AL. Detection of *Rickettsia parkeri* and *Candidatus Rickettsia andeanae* in *Amblyomma maculatum* Gulf Coast ticks collected from humans in the United States. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2012;12(3):175-182. doi:10.1089/vbz.2011.0614
- <sup>131</sup> Moonga LC, Hayashida K, Nakao R, Lisulo M, Kaneko C, Nakamura I, Eshita Y, Mweene AS, Namangala B, Sugimoto C, Yamagishi J. Molecular detection of *Rickettsia felis* in dogs, rodents and cat fleas in Zambia. *Parasit Vectors*. 2019 Apr 11;12(1):168. doi: 10.1186/s13071-019-3435-6.
- <sup>132</sup> Odhiambo AM, Maina AN, Taylor ML, Jiang J, Richards AL. Development and validation of a quantitative real-time polymerase chain reaction assay specific for the detection of *Rickettsia*

---

felis and not Rickettsia felis-like organisms. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2014;14(7):476–481. doi:10.1089/vbz.2013.1518

<sup>133</sup> Blair PJ, Jiang J, Schoeler GB, Moron C, Anaya E, Cespedes M, et al. Characterization of spotted fever group rickettsiae in flea and tick specimens from northern Peru. *J Clin Microbiol.* 2004;42:4961–7

<sup>134</sup> Jiang J, Maina AN, Knobel DL, et al. Molecular detection of Rickettsia felis and Candidatus Rickettsia asemboensis in fleas from human habitats, Asembo, Kenya. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2013;13(8):550-558. doi:10.1089/vbz.2012.1123

<sup>135</sup> Maina AN, Fogarty C, Krueger L, et al. Rickettsial Infections among Ctenocephalides felis and Host Animals during a Flea-Borne Rickettsioses Outbreak in Orange County, California. *PLoS One.* 2016;11(8):e0160604. Published 2016 Aug 18. doi:10.1371/journal.pone.0160604

<sup>136</sup> Ben-Zvi I, Meltzer E, Noguera MM, Segura F, Bank I. First detection of human infection with Rickettsia felis in Israel. *Am J Med Sci.* 2010 Oct;340(4):343. doi:10.1097/MAJ.0b013e3181ebd715.

<sup>137</sup> Leulmi H, Socolovschi C, Laudisoit A, et al. Detection of Rickettsia felis, Rickettsia typhi, Bartonella Species and Yersinia pestis in Fleas (Siphonaptera) from Africa. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014;8(10):e3152. Published 2014 Oct 9. doi:10.1371/journal.pntd.0003152

<sup>138</sup> Roux V, Rydkina E, Ereemeeva M, Raoult D. Citrate synthase gene comparison, a new tool for phylogenetic analysis, and its application for the rickettsiae. *Int J Syst Bacteriol.* 1997;47(2):252-261. doi:10.1099/00207713-47-2-252

<sup>139</sup> Rolain JM, Stuhl L, Maurin M, Raoult D. Evaluation of antibiotic susceptibilities of three rickettsial species including Rickettsia felis by a quantitative PCR DNA assay. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46(9):2747-2751. doi:10.1128/aac.46.9.2747-2751.2002

<sup>140</sup> Botelho-Nevers E, Socolovschi C, Raoult D, Parola P. Treatment of Rickettsia spp. infections: a review. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2012;10(12):1425-1437. doi:10.1586/eri.12.139

<sup>141</sup> Gudiol F, Pallares R, Carratala J, et al. Randomized double-blind evaluation of ciprofloxacin and doxycycline for Mediterranean spotted fever. *Antimicrob Agents Chemother.* 1989;33(6):987-988. doi:10.1128/aac.33.6.987

<sup>142</sup> Blanton LS, Walker DH. Flea-Borne Rickettsioses and Rickettsiae. *Am J Trop Med Hyg.* 2017;96(1):53-56. doi:10.4269/ajtmh.16-0537

<sup>143</sup> Mediannikov O, Socolovschi C, Edouard S, et al. Common epidemiology of Rickettsia felis infection and malaria, Africa. *Emerg Infect Dis.* 2013;19(11):1775-1783. doi:10.3201/eid1911.130361

<sup>144</sup> Zavala-Castro J, Zavala-Velázquez J, Walker D, Pérez-Osorio J, Peniche-Lara G. Severe human infection with Rickettsia felis associated with hepatitis in Yucatan, Mexico. *Int J Med Microbiol.* 2009;299(7):529-533. doi:10.1016/j.ijmm.2009.03.002

<sup>145</sup> Raoult D, La Scola B, Enea M, et al. A flea-associated Rickettsia pathogenic for humans. *Emerg Infect Dis.* 2001;7(1):73-81. doi:10.3201/eid0701.010112

- 
- <sup>146</sup> Brown LD, Macaluso KR. *Rickettsia felis*, an Emerging Flea-Borne Rickettsiosis. *Curr Trop Med Rep*. 2016;3:27-39. doi:10.1007/s40475-016-0070-6
- <sup>147</sup> Reif KE, Kearney MT, Foil LD, Macaluso KR. Acquisition of *Rickettsia felis* by cat fleas during feeding. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2011;11(7):963-968. doi:10.1089/vbz.2010.0137
- <sup>148</sup> Case JB, Chomel B, Nicholson W, Foley JE. Serological survey of vector-borne zoonotic pathogens in pet cats and cats from animal shelters and feral colonies. *J Feline Med Surg*. 2006;8(2):111-117. doi:10.1016/j.jfms.2005.10.004
- <sup>149</sup> Nogueras MM, Pons I, Ortuño A, Segura F. Seroprevalence of *Rickettsia typhi* and *Rickettsia felis* in dogs from north-eastern Spain. *Clin Microbiol Infect*. 2009;15 Suppl 2:237-238. doi:10.1111/j.1469-0691.2008.02156.x
- <sup>150</sup> Salmon-Mulanovich G, Simons MP, Flores-Mendoza C, et al. Seroprevalence and Risk Factors for *Rickettsia* and *Leptospira* Infection in Four Ecologically Distinct Regions of Peru. *Am J Trop Med Hyg*. 2019;100(6):1391-1400. doi:10.4269/ajtmh.18-0029
- <sup>151</sup> Williams M, Izzard L, Graves SR, Stenos J, Kelly JJ. First probable Australian cases of human infection with *Rickettsia felis* (cat-flea typhus). *Med J Aust*. 2011;194(1):41-43.
- <sup>152</sup> Abdad MY, Stenos J, Graves S. *Rickettsia felis*, an emerging flea-transmitted human pathogen. *Emerg Health Threats J*. 2011;4:7168. Published 2011 Jul 1. doi:10.3402/ehth.v4i0.7168
- <sup>153</sup> Richards AL, Jiang J, Omulo S, et al. Human Infection with *Rickettsia felis*, Kenya. *Emerg Infect Dis*. 2010;16(7):1081-1086. doi:10.3201/eid1607.091885
- <sup>154</sup> Mediannikov O, Socolovschi C, Edouard S, et al. Common epidemiology of *Rickettsia felis* infection and malaria, Africa. *Emerg Infect Dis*. 2013;19(11):1775-1783. doi:10.3201/eid1911.130361
- <sup>155</sup> Dieme C, Bechah Y, Socolovschi C, et al. Transmission potential of *Rickettsia felis* infection by *Anopheles gambiae* mosquitoes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(26):8088-8093. doi:10.1073/pnas.1413835112
- <sup>156</sup> Keita AK, Socolovschi C, Ahuka-Mundeke S, et al. Molecular evidence for the presence of *Rickettsia Felis* in the feces of wild-living African apes. *PLoS One*. 2013;8(2):e54679. doi:10.1371/journal.pone.0054679
- <sup>157</sup> Biggs HM, Behravesh CB, Bradley KK, Dahlgren FS, Drexler NA, Dumler JS, et al. Diagnosis and management of tick borne rickettsial diseases: Rocky mountain spotted fever and other spotted fever group Rickettsioses, Ehrlichioses, and Anaplasmosis—United States. *MMWR Recomm Rep* 2016; 65 (RR-2): 1–44.
- <sup>158</sup> Gimenez DF. Staining rickettsiae in yolk-sac cultures. *Stain Technol* 1964; 39: 135–40.
- <sup>159</sup> Ammerman NC, Beier-Sexton M, Azad AF. Laboratory maintenance of *Rickettsia rickettsii*. *Curr Protoc Microbiol* 2008; Chapter 3: Unit–3A.5.
- <sup>160</sup> La Scola B, Raoult D. Laboratory diagnosis of rickettsioses: Current approaches to diagnosis of old and new rickettsial diseases. *J Clin Microbiol* 1997; 35(11): 2715–27.

- 
- <sup>161</sup> Zavala-Castro JE, Dzul-Rosado KR, Peniche-Lara G, Tello-Martin R, Zavala-Velazquez JE. Isolation of *Rickettsia typhi* from human, Mexico. *Emerg Infect Dis* 2014; 20(8): 1411–2.
- <sup>162</sup> Walker DH. Rickettsiae. In: Baron S, editor. *Medical Microbiology*. 4th edition. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996.
- <sup>163</sup> Peniche Lara G, Dzul-Rosado KR, Zavala Velázquez JE, Zavala-Castro J. Murine Typhus: Clinical and epidemiological aspects. *Colomb Med (Cali)*. 2012;43(2):175-180.
- <sup>164</sup> Gaywee J, Sacci JB Jr, Radulovic S, Beier MS, Azad AF. Subcellular localization of rickettsial invasion protein, InvA. *Am J Trop Med Hyg*. 2003;68(1):92-96.
- <sup>165</sup> Rahman MS, Gillespie JJ, Kaur SJ, et al. Rickettsia typhi possesses phospholipase A2 enzymes that are involved in infection of host cells. *PLoS Pathog*. 2013;9(6):e1003399. doi:10.1371/journal.ppat.1003399
- <sup>166</sup> Walker DH, Feng HM, Popov VL. Rickettsial phospholipase A2 as a pathogenic mechanism in a model of cell injury by typhus and spotted fever group rickettsiae. *Am J Trop Med Hyg*. 2001;65(6):936-942. doi:10.4269/ajtmh.2001.65.936
- <sup>167</sup> Renesto P, Dehoux P, Gouin E, Touqui L, Cossart P, Raoult D. Identification and characterization of a phospholipase D-superfamily gene in rickettsiae. *J Infect Dis*. 2003;188(9):1276-1283. doi:10.1086/379080
- <sup>168</sup> Chan YG, Cardwell MM, Hermanas TM, Uchiyama T, Martinez JJ. Rickettsial outer-membrane protein B (rOmpB) mediates bacterial invasion through Ku70 in an actin, c-Cbl, clathrin and caveolin 2-dependent manner. *Cell Microbiol*. 2009;11(4):629-644. doi:10.1111/j.1462-5822.2008.01279.x
- <sup>169</sup> Ogata H, Audic S, Renesto-Audiffren P, et al. Mechanisms of evolution in Rickettsia conorii and R. prowazekii. *Science*. 2001;293(5537):2093-2098. doi:10.1126/science.1061471
- <sup>170</sup> Andersson JO, Andersson SG. Insights into the evolutionary process of genome degradation. *Curr Opin Genet Dev*. 1999;9(6):664–671. doi:10.1016/s0959-437x(99)00024-6
- <sup>171</sup> Govantes F, Orjalo AV, Gunsalus RP. Interplay between three global regulatory proteins mediates oxygen regulation of the Escherichia coli cytochrome d oxidase (cydAB) operon. *Mol Microbiol*. 2000;38(5):1061–1073. doi:10.1046/j.1365-2958.2000.02215.x
- <sup>172</sup> Walter G, Botelho-Nevers E, Socolovschi C, Raoult D, Parola P. Murine typhus in returned travelers: a report of thirty-two cases. *Am J Trop Med Hyg*. 2012;86(6):1049-1053. doi:10.4269/ajtmh.2012.11-0794
- <sup>173</sup> Bitam I, Parola P, De La Cruz KD, et al. First molecular detection of Rickettsia felis in fleas from Algeria. *Am J Trop Med Hyg*. 2006;74(4):532-535.
- <sup>174</sup> Henry KM, Jiang J, Rozmajzl PJ, Azad AF, Macaluso KR, Richards AL. Development of quantitative real-time PCR assays to detect Rickettsia typhi and Rickettsia felis, the causative agents of murine typhus and flea-borne spotted fever. *Mol Cell Probes*. 2007;21(1):17-23. doi:10.1016/j.mcp.2006.06.002

- 
- <sup>175</sup> Stenos J, Graves SR, Unsworth NB. A highly sensitive and specific real-time PCR assay for the detection of spotted fever and typhus group Rickettsiae. *Am J Trop Med Hyg.* 2005;73(6):1083-1085.
- <sup>176</sup> Sandalakis V, Chochlakis D, Ioannou I, Psaroulaki A. Identification of a novel uncultured Rickettsia species strain (Rickettsia species strain Tselenti) in Cyprus. *Am J Trop Med Hyg.* 2013;88(4):698-700. doi:10.4269/ajtmh.11-0508
- <sup>177</sup> Parola P, Paddock CD, Raoult D. Tick-borne rickettsioses around the world: emerging diseases challenging old concepts. *Clin Microbiol Rev.* 2005;18(4):719-756. doi:10.1128/CMR.18.4.719-756.2005
- <sup>178</sup> Stafford IA, Centeno FH, Al Mohajer M, et al. Successful Detection of Unrecognized Rickettsia typhi in Pregnancy Using Cell-Free Next-Generation Sequencing. *Case Rep Obstet Gynecol.* 2020;2020:6767351. Published 2020 May 26. doi:10.1155/2020/6767351
- <sup>179</sup> Rolain JM, Stuhl L, Maurin M, Raoult D. Evaluation of antibiotic susceptibilities of three rickettsial species including Rickettsia felis by a quantitative PCR DNA assay. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46(9):2747-2751. doi:10.1128/aac.46.9.2747-2751.2002
- <sup>180</sup> Miyamura S, Ohta T, Tamura A. *Nihon Saikingaku Zasshi.* 1989;44(5):717-721. doi:10.3412/jsb.44.717
- <sup>181</sup> Walker DH, Feng HM, Ladner S, et al. Immunohistochemical diagnosis of typhus rickettsioses using an anti-lipopolysaccharide monoclonal antibody. *Mod Pathol.* 1997;10(10):1038-1042.
- <sup>182</sup> Walker DH, Parks FM, Betz TG, Taylor JP, Muehlberger JW. Histopathology and immunohistologic demonstration of the distribution of Rickettsia typhi in fatal murine typhus. *Am J Clin Pathol.* 1989;91(6):720-724. doi:10.1093/ajcp/91.6.720
- <sup>183</sup> McGready R, Prakash JA, Benjamin SJ, Watthanaworawit W, Anantatat T, Tanganuchitcharnchai A, Ling CL, Tan SO, Ashley EA, Pimanpanarak M, Blacksell SD, Day NP, Singhasivanon P, White NJ, Nosten F, Paris DH. Pregnancy outcome in relation to treatment of murine typhus and scrub typhus infection: a fever cohort and a case series analysis. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014 Nov 20;8(11):e3327. doi: 10.1371/journal.pntd.0003327.
- <sup>184</sup> Fergie JE, Purcell K, Wanat D. Murine typhus in South Texas children. *Pediatr Infect Dis J.* 2000;19(6):535-538. doi:10.1097/00006454-200006000-00009
- <sup>185</sup> Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Outbreak of Rickettsia typhi infection - Austin, Texas, 2008. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2009;58(45):1267-1270.
- <sup>186</sup> Noden BH, Davidson S, Smith JL, Williams F. First Detection of Rickettsia typhi and Rickettsia felis in Fleas Collected From Client-Owned Companion Animals in the Southern Great Plains. *J Med Entomol.* 2017;54(4):1093-1097. doi:10.1093/jme/tjx069
- <sup>187</sup> Sorvillo FJ, Gondo B, Emmons R, et al. A suburban focus of endemic typhus in Los Angeles County: association with seropositive domestic cats and opossums. *Am J Trop Med Hyg.* 1993;48(2):269-273. doi:10.4269/ajtmh.1993.48.269
- <sup>188</sup> Lance A. Durden, Nancy C. Hinkle. Fleas (Siphonaptera) in *Medical and Veterinary Entomology*. Gary R. Mullen and Lance A. Durden (eds), (Third Edition), 2019, p. 145-169.

- 
- <sup>189</sup> Kuo CC, Wardrop N, Chang CT, Wang HC, Atkinson PM. Significance of major international seaports in the distribution of murine typhus in Taiwan [published correction appears in *PLoS Negl Trop Dis*. 2017 May 3;11(5):e0005589]. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;11(3):e0005430. Published 2017 Mar 6. doi:10.1371/journal.pntd.0005430
- <sup>190</sup> Adams WH, Emmons RW, Brooks JE. The changing ecology of murine (endemic) typhus in Southern California. *Am J Trop Med Hyg*. 1970;19(2):311-318. doi:10.4269/ajtmh.1970.19.311
- <sup>191</sup> Gikas A, Kokkini S, Tsioutis C, et al. Murine typhus in children: clinical and laboratory features from 41 cases in Crete, Greece. *Clin Microbiol Infect*. 2009;15 Suppl 2:211-212. doi:10.1111/j.1469-0691.2008.02133.x
- <sup>192</sup> Gikas A, Doukakis S, Padiaditis J, Kastanakis S, Psaroulaki A, Tselentis Y. Murine typhus in Greece: epidemiological, clinical, and therapeutic data from 83 cases. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2002;96(3):250-253. doi:10.1016/s0035-9203(02)90090-8
- <sup>193</sup> Daniel SA, Manika K, Arvanmdou M, Antoniadis A. Prevalence of *Rickettsia conorii* and *Rickettsia typhi* infections in the population of northern Greece. *Am J Trop Med Hyg*. 2002;66(1):76-79. doi:10.4269/ajtmh.2002.66.76
- <sup>194</sup> Bolaños-Rivero M, Santana-Rodriguez E, Angel-Moreno A, Hernández-Cabrera M, et al. Seroprevalence of *Rickettsia typhi* and *Rickettsia conorii* infections in the Canary Islands (Spain). *Int J Infect Dis*. 2011;15(7):e481–e485. doi:10.1016/j.ijid.2011.03.019
- <sup>195</sup> Pratt HD, Stojanovich CHJ. 1966. Fleas. Illustrated key to species found during plague investigations. In: US Department of Health, Education and Welfare (ed). *Pictorial Keys: Arthropods, Reptiles, Birds and Mammals of Public Health Significance*. Public Health Service, Communicable Disease Center, Atlanta, GA, USA, Pp 171-174.
- <sup>196</sup> Andrews ES. Analyzing arthropods for the presence of bacteria. *Curr Protoc Microbiol*. 2013;Chapter 1:Unit–1E.6. doi:10.1002/9780471729259.mc01e06s28
- <sup>197</sup> Siala M, Gdoura R, Fourati H, et al. Broad-range PCR, cloning and sequencing of the full 16S rRNA gene for detection of bacterial DNA in synovial fluid samples of Tunisian patients with reactive and undifferentiated arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2009;11(4):R102. doi:10.1186/ar2748
- <sup>198</sup> Siala M, Jaulhac B, Gdoura R, et al. Analysis of bacterial DNA in synovial tissue of Tunisian patients with reactive and undifferentiated arthritis by broad-range PCR, cloning and sequencing. *Arthritis Res Ther*. 2008;10(2):R40. doi:10.1186/ar2398
- <sup>199</sup> Houpiikian P, Raoult D. 16S/23S rRNA intergenic spacer regions for phylogenetic analysis, identification, and subtyping of *Bartonella* species. *J Clin Microbiol*. 2001;39(8):2768-2778. doi:10.1128/JCM.39.8.2768-2778.2001
- <sup>200</sup> Parola P, Shpynov S, Montoya M, et al. First molecular evidence of new *Bartonella* spp. in fleas and a tick from Peru. *Am J Trop Med Hyg*. 2002;67(2):135-136. doi:10.4269/ajtmh.2002.67.135
- <sup>201</sup> Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods*. 2010;7(5):335-336. doi:10.1038/nmeth.f.303.

- 
- <sup>202</sup> Boratyn GM, Camacho C, Cooper PS, et al. BLAST: a more efficient report with usability improvements. *Nucleic Acids Res.* 2013;41(Web Server issue):W29–W33. doi:10.1093/nar/gkt282
- <sup>203</sup> Lee SH, Kim KT, Kwon OD, et al. Novel Detection of *Coxiella* spp., *Theileria luwenshuni*, and *T. ovis* Endosymbionts in Deer Keds (*Lipoptena fortisetosa*). *PLoS One.* 2016;11(5):e0156727. Published 2016 May 31. doi:10.1371/journal.pone.0156727
- <sup>204</sup> Ko S, Kim S, Kang J, Won S, Lee H, Shin N, et al. Molecular detection of *Bartonella grahamii* and *B. schoenbuchensis*-related species in Korean water deer (*Hydropotes inermis argyropus*). *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2013; 13: 415–418. doi: 10.1089/vbz.2012.1105
- <sup>205</sup> Clarridge JE 3rd. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clin Microbiol Rev.* 2004;17(4):840-862. doi:10.1128/CMR.17.4.840-862.2004
- <sup>206</sup> Lawrence AL, Hii SF, Chong R, et al. Evaluation of the bacterial microbiome of two flea species using different DNA-isolation techniques provides insights into flea host ecology. *FEMS Microbiol Ecol.* 2015;91(12):fiv134. doi:10.1093/femsec/fiv134
- <sup>207</sup> Takhampunya R, Korkusol A, Pongpichit C, et al. Metagenomic Approach to Characterizing Disease Epidemiology in a Disease-Endemic Environment in Northern Thailand. *Front Microbiol.* 2019;10:319. Published 2019 Feb 26. doi:10.3389/fmicb.2019.00319
- <sup>208</sup> Vasconcelos EJR, Billeter SA, Jett LA, et al. Assessing Cat Flea Microbiomes in Northern and Southern California by 16S rRNA Next-Generation Sequencing. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2018;18(9):491-499. doi:10.1089/vbz.2018.2282
- <sup>209</sup> Tea A, Alexiou-Daniel S, Papoutsi A, Papa A, Antoniadis A. *Bartonella* species isolated from rodents, Greece. *Emerg Infect Dis.* 2004;10(5):963-964. doi:10.3201/eid1005.030430
- <sup>210</sup> Rolain JM, Franc M, Davoust B, Raoult D. Molecular detection of *Bartonella quintana*, *B. koehlerae*, *B. henselae*, *B. clarridgeiae*, *Rickettsia felis*, and *Wolbachia pipientis* in cat fleas, France. *Emerg Infect Dis.* 2003;9(3):338-342. doi:10.3201/eid0903.020278
- <sup>211</sup> Tsai KH, Huang CG, Fang CT, Shu PY, Huang JH, Wu WJ. Prevalence of *Rickettsia felis* and the first identification of *Bartonella henselae* Fizz/CAL-1 in cat fleas (Siphonaptera: Pulicidae) from Taiwan. *J Med Entomol.* 2011;48(2):445-452. doi:10.1603/me10022
- <sup>212</sup> Müller A, Rodríguez E, Walker R, et al. Occurrence and Genetic Diversity of *Bartonella* spp. (Rhizobiales: Bartonellaceae) and *Rickettsia* spp. (Rickettsiales: Rickettsiaceae) in Cat Fleas (Siphonaptera: Pulicidae) From Chile. *J Med Entomol.* 2018;55(6):1627-1632. doi:10.1093/jme/tjy124
- <sup>213</sup> Chochlakis D, Germanakis A, Chaliotis G, et al. Potential exposure of humans to *Rickettsia felis* in Greece. *Acta Trop.* 2018;178:40-45. doi:10.1016/j.actatropica.2017.10.020
- <sup>214</sup> Silaghi C, Knaus M, Rapti D, Shukullari E, Pfister K, Rehbein S. *Rickettsia felis* and *Bartonella* spp. in fleas from cats in Albania. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2012;12(1):76-77. doi:10.1089/vbz.2011.0732



- 
- <sup>215</sup> Capelli G, Montarsi F, Porcellato E, et al. Occurrence of *Rickettsia felis* in dog and cat fleas (*Ctenocephalides felis*) from Italy. *Parasit Vectors*. 2009;2 Suppl 1(Suppl 1):S8. Published 2009 Apr 20. doi:10.1186/1756-3305-2-S1-S8
- <sup>216</sup> Reif KE, Macaluso KR. Ecology of *Rickettsia felis*: a review. *J Med Entomol*. 2009;46(4):723-736. doi:10.1603/033.046.0402
- <sup>217</sup> Gilles J, Just FT, Silaghi C, et al. *Rickettsia felis* in fleas, Germany. *Emerg Infect Dis*. 2008;14(8):1294-1296. doi:10.3201/eid1408.071546
- <sup>218</sup> Blanco JR, Pérez-Martínez L, Vallejo M, Santibáñez S, Portillo A, Oteo JA. Prevalence of rickettsia felis-like and Bartonella Spp. in *Ctenocephalides felis* and *Ctenocephalides canis* from La Rioja (Northern Spain). *Ann N Y Acad Sci*. 2006;1078:270-274. doi:10.1196/annals.1374.050
- <sup>219</sup> Pérez-Arellano JL, Fenollar F, Angel-Moreno A, et al. Human *Rickettsia felis* infection, Canary Islands, Spain. *Emerg Infect Dis*. 2005;11(12):1961-1964. doi:10.3201/eid1112.050711
- <sup>220</sup> Shaw SE, Kenny MJ, Tasker S, Birtles RJ. Pathogen carriage by the cat flea *Ctenocephalides felis* (Bouché) in the United Kingdom. *Vet Microbiol*. 2004;102(3-4):183-188. doi:10.1016/j.vetmic.2004.06.013
- <sup>221</sup> Hawley JR, Shaw SE, Lappin MR. Prevalence of *Rickettsia felis* DNA in the blood of cats and their fleas in the United States. *J Feline Med Surg*. 2007;9(3):258-262. doi:10.1016/j.jfms.2006.12.005
- <sup>222</sup> Chaliotis G, Kritsotakis EI, Psaroulaki A, Tselentis Y, Gikas A. Murine typhus in central Greece: epidemiological, clinical, laboratory, and therapeutic-response features of 90 cases. *Int J Infect Dis*. 2012 Aug;16(8):e591-6. doi: 10.1016/j.ijid.2012.03.010.
- <sup>223</sup> Gerhold RW, Jessup DA. Zoonotic diseases associated with free-roaming cats. *Zoonoses Public Health*. 2013;60(3):189-195. doi:10.1111/j.1863-2378.2012.01522.x
- <sup>224</sup> Ghasemzadeh I, Namazi SH. Review of bacterial and viral zoonotic infections transmitted by dogs. *J Med Life*. 2015;8(Spec Iss 4):1-5.
- <sup>225</sup> Tovar RM. Infection and transmission of *Brucella* by ectoparasites. *Am J Vet Res*. 1947 Jan;8(26):138-40.
- <sup>226</sup> Zheludkov MM, Tsirelson LE. Reservoirs of *Brucella* infection in nature. *Biol Bull Russ Acad Sci*. 2010;37(7):709-715. doi:10.1134/s106235901007006x.
- <sup>227</sup> Wareth G, Melzer F, El-Diasty M, et al. Isolation of *Brucella abortus* from a dog and a cat confirms their biological role in re-emergence and dissemination of bovine brucellosis on dairy farms. *Transbound Emerg Dis*. 2017 Oct;64(5):e27-e30. doi:10.1111/tbed.12535.
- <sup>228</sup> Ayyal NM, Abbas ZA, Karim AJ, et al. Bacterial isolation from internal organs of rats (*Rattus rattus*) captured in Baghdad city of Iraq. *Vet World*. 2019 Jan;12(1):119-125. doi: 10.14202/vetworld.2019.119-125.
- <sup>229</sup> Vitry M-A, Mambres DH, Deghelt M, Hack K, et al. *Brucella melitensis* invades murine erythrocytes during Infection. *Infect Immun*. 2014;82(9):3927-3938. doi:10.1128/iai.01779-14.

- 
- <sup>230</sup> Rolstad B, Berdal BP. Immune defenses against *Legionella pneumophila* in rats. *Infect Immun*. 1981;32(2):805-812. doi:10.1128/IAI.32.2.805-812.1981
- <sup>231</sup> Mane A, Kamble S, Singh MK, Ratnaparakhi M, Nirmalkar A, Gangakhedkar R. Seroprevalence of spotted fever group and typhus group rickettsiae in individuals with acute febrile illness from Gorakhpur, India. *Int J Infect Dis*. 2019;79:195–198. doi:10.1016/j.ijid.2018.10.024
- <sup>232</sup> Tea A, Alexiou-Daniel S, Arvanitidou M, Diza E, Antoniadis A. Occurrence of *Bartonella henselae* and *Bartonella quintana* in a healthy Greek population. *Am J Trop Med Hyg*. 2003 May;68(5):554-6.
- <sup>233</sup> Pons I, Sanfeliu I, Cardenosa N, Nogueras MM, Font B, Segura F. Serological evidence of *Bartonella henselae* infection in healthy people in Catalonia, Spain. *Epidemiol Infect*. 2008;136(12):1712–1716. doi:10.1017/S0950268808000368
- <sup>234</sup> Guibal F, de La Salmonière P, Rybojad M, Hadjrabia S, Dehen L, Arlet G. High seroprevalence to *Bartonella quintana* in homeless patients with cutaneous parasitic infestations in downtown Paris. *J Am Acad Dermatol*. 2001 Feb;44(2):219-23.
- <sup>235</sup> Kosoy M, Bai Y. *Bartonella* Bacteria in Urban Rats: A Movement From the Jungles of Southeast Asia to Metropolises Around the Globe. *Frontiers in Ecology and Evolution*. 2019;7. doi:10.3389/fevo.2019.00088.
- <sup>236</sup> Kuo CC, Wardrop N, Chang CT, Wang HC, et al. Significance of major international seaports in the distribution of murine typhus in Taiwan [published correction appears in *PLoS Negl Trop Dis*. 2017 May 3;11(5):e0005589]. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;11(3):e0005430. Published 2017 Mar 6. doi:10.1371/journal.pntd.0005430
- <sup>237</sup> Bolaños-Rivero M, Santana-Rodriguez E, Angel-Moreno A, Hernández-Cabrera M, et al. Seroprevalence of *Rickettsia typhi* and *Rickettsia conorii* infections in the Canary Islands (Spain). *Int J Infect Dis*. 2011;15(7):e481–e485. doi:10.1016/j.ijid.2011.03.019
- <sup>238</sup> Metzkor-Cotter E, Kletter Y, Avidor B, et al. Long-term serological analysis and clinical follow-up of patients with cat scratch disease. *Clin Infect Dis*. 2003;37(9):1149–1154. doi:10.1086/378738
- <sup>239</sup> Stewart, B. A. (1997). Human infection with *Bartonella* species. *Clinical Microbiology and Infection*, 3(6), 677-689. doi:10.1111/j.1469-0691.1997.tb00478.x
- <sup>240</sup> Teoh YT, Hii SF, Stevenson MA, Graves S, et al. Serological evidence of exposure to *Rickettsia felis* and *Rickettsia typhi* in Australian veterinarians. *Parasites & Vectors*. 2017;10(1). doi:10.1186/s13071-017-2075-y.
- <sup>241</sup> Reif KE, Macaluso KR. Ecology of *Rickettsia felis*: a review. *J Med Entomol*. 2009;46(4):723-736. doi:10.1603/033.046.0402
- <sup>242</sup> Pérez-Arellano JL, Fenollar F, Angel-Moreno A, Bolaños M, Hernández M, Santana E, Hemmersbach-Miller M, Martín AM, Raoult D. Human *Rickettsia felis* infection, Canary Islands, Spain. *Emerg Infect Dis*. 2005 Dec;11(12):1961-4.

---

<sup>243</sup> Houpikian P, Raoult D. Western immunoblotting for Bartonella endocarditis. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2003;10(1):95–102. doi:10.1128/cdli.10.1.95-102.2003