

Vero ve HeLa Hücrelerinde Eş-Kültür ile Elde Edilen *Bartonella henselae* Antijenlerinin İndirekt İmmüno Floresan Antikor Yöntemindeki Performanslarının Karşılaştırılması

Comparison of the Indirect Immunofluorescence Assay Performance of *Bartonella henselae* Antigens Obtained by Co-Cultivation in Vero and HeLa Cells

Çağrı ERGİN¹, Yüksel AKKAYA¹, Özgün KIRIŞ SATILMIŞ¹, Cansev YILMAZ²

¹ Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Denizli.

¹ Pamukkale University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Denizli, Turkey.

² SB Kars Devlet Hastanesi, Kars.

² Kars State Hospital, Kars, Turkey.

Geliş Tarihi (Received): 14.01.2011 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 05.04.2011

ÖZET

Bartonella henselae enfeksiyonunun laboratuvar tanısı indirekt immüno floresans antikor (IFA) ile yapılan serolojik testlere dayanır. *B. henselae*'nin hücre dizilerindeki eş-kültürleri ve agar ortamlarında üretilen antijenleri, anti-*Bartonella* antikorlarının değerlendirilmesinde kullanılan iki ana yöntemi oluşturur. Vero ve Hep-2 hücre kültürü serileri, hem laboratuvar da hazırlanan hem de ticari olarak temin edilebilen tanınmış kitlerin oluşturulmasında eş-kültür için en sık kullanılan ortamlardır. Bununla birlikte daha kolay sağlanabilen ve üretilen HeLa hücreleri de *B. henselae* ile kolaylıkla enfekte olabilir. Bu çalışmada, *B. henselae* ATCC 49882 (Houston-1) suşu ile eş-kültürü yapılan Vero ve HeLa hücrelerinden elde edilen antijenlerin, IFA yöntemi ile antikor tespitindeki performanslarının karşılaştırılması amaçlanmıştır. Çalışmamızda, her iki hücre dizisi eş-kültürü antijenleri ile çalışılan IFA yönteminde; 381 serum örneğinin 127 (%33.3)'si pozitif, 195 (%51.2)'i negatif bulunmuş; yöntemler arası toplam uyum %84.5 (322/381) olarak belirlenmiş ve uyumun değerlendirilmesinde Cohen kappa değeri 0.68 (güçlü, tutarlı) olarak hesaplanmıştır. Sonuç olarak, *B. henselae* enfeksiyonlarının serolojik tanısı için IFA yönteminde HeLa hücrelerinden elde edilen *B. henselae* antijenlerinin kullanılması yararlı olabilir. HeLa hücrelerinde eş-kültür yönteminin rutin uygulamaya girmesinden önce, farklı genotipteki suşlarla ve diğer enfeksiyöz etkenler ile çapraz reaksiyonların olup olmadığı, planlanacak yeni çalışmalar ile araştırılmalıdır.

Anahtar sözcükler: *Bartonella henselae*; eş-kültür; immüno floresans antikor yöntemi; HeLa; Vero; seroloji.

İletişim (Correspondence): Dr. Çağrı Ergin, Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Denizli, Türkiye. Tel (Phone): +90 258 296 2536, E-posta (E-mail): cagri@pau.edu.tr

ABSTRACT

The laboratory diagnosis of *Bartonella henselae* infection is mainly based on serological testing by indirect immunofluorescence assay (IFA). Cell line co-cultivation with *B.henselae* and agar derived antigens are the two major procedures used for evaluation of anti-*Bartonella* antibodies. Vero and Hep-2 cell lines are the most commonly used media for co-cultivation both in-house and commercial diagnostic kits production. However, HeLa cells which are easily supplied and grown, also can easily be infected by *B.henselae*. The aim of this study was to compare the performances of antigens obtained by co-cultivation of *B.henselae* ATCC 49882 (Houston-1) in Vero and HeLa Cells in IFA serology. Out of 381 sera samples, 127 (33.3%) were found positive and 195 (51.2%) were found negative by IFA performed by both cell line co-cultivations. The total agreement between the methods were found as 84.5% (322/381), and Cohen kappa value was calculated as 0.68 (strong, coherent). As a result, HeLa cells were found to be useful for the preparation of *B.henselae* antigens to be used in IFA for the serologic diagnosis of *B.henselae* infections. However different genotype strains and cross reactions with other infectious agents should be investigated by further studies before routine applications of HeLa cell co-cultivations procedure is established.

Key words: *Bartonella henselae*; co-cultivation; immunofluorescence antibody method; HeLa; Vero; serology.

GİRİŞ

Bartonella türleri, besiyerlerinde zor üreyen, gram-negatif, aerobik basillerdir^{1,2}. *Bartonella* enfeksiyonları sırasında mikrobiyolojik tanı koymak güçtür; zira etkenin primer izolasyonu 2-6 haftalık inkübasyonu gerektirmektedir. Enfeksiyon varlığında bile, kan ve lenf nodu biyopsisi gibi klinik örneklerden izolasyonun başarılması zordur. Erken laboratuvar testi olarak kullanılabilen intradermal deri testi %99 özgüllüğe sahiptir, ancak pratik değildir. Foliküler hiperplazi ve mikroapse odakları ile birlikte granülom formasyonu histopatolojik olarak *Bartonella henselae*'yi düşündürür. Warthin-Starry gümüşleme boyası ile tanı desteklenir. İnvazif girişim ihtiyacı nedeniyle patolojik tanı kolaylıkla uygulanamaz³⁻⁵. *B.henselae* enfeksiyonunun tanısında PCR temelli testler günceldir, ancak duyarlılığı %43-76 arasında değişmektedir⁵.

Günümüzde serolojik yöntemler [indirekt immüno floresans antikor (IFA), enzim temelli immünojenik yöntemler (EIA), immunoblot yöntemleri vb.] kolay uygulanabilir olması, invazif işlem gerektirmemesi ve kısa sürede sonuç vermesi gibi avantajları nedeniyle bartonelloz tanısında önem kazanmıştır. Bu yöntemlerin duyarlılığı; yöntemin mekanizmasına, kullanılan antijenlerin farklılığına, testin uygulama şekline ve kullanılan eşik (cut-off) değerine göre farklılık göstermektedir. IFA tekniği ile yapılan araştırmalarda, duyarlılık %14-100, özgüllük %0-100 arasında bildirilmektedir⁶. Ticari olarak üretilen IFA kitlerinde antijenler farklı yöntemlerle ve farklı hücre kültürlerinde hazırlanmaktadır. Vero [Afrika yeşil maymun (*Cercopithecus aethiops*) böbrek epitel hücreleri] ve Hep-2 (insan epiteloid larenks karsinoma) hücreleri en yaygın kullanılan hücre kültürleridir. Ticari kitlerin karşılaştırmalı değerlendirilmesinde genel olarak kabul edilen görüş, kullanılan testlerin yüksek özgüllüğe, ancak düşük duyarlılığa sahip olmasıdır⁷⁻¹¹. IFA testi ayrıca, besiyerinde üretilen bakterilerin yumurta sarısında emülsiyonu yöntemi ile elde edilen anti-

jenlerle de uygulanabilmektedir^{12,13}. Ancak petri plaklarındaki agar yüzeyinde üretilen *B.henselae*, sıvı ortamda otoaglutinasyon yapma eğilimindedir. Bu nedenle intraselüler üreyebilen *B.henselae*, hücre kültürü serilerinde eş-kültür (ko-kültürasyon) ile çoğaltılır ve IFA tekniğinde kullanılacak olan lamlara kaplanır¹⁴.

Ticari olarak bulunabilen tanı kitlerinde, popülasyon taramalarında ve laboratuvar ortamında hazırlanan tanısal işlemlerde Hep-2 ve Vero hücrelerinde eş-kültürünün yapıldığı antijen hazırlama işlemi, IFA tekniği için en sık kullanılan yöntemdir. Ancak ülkemizde insan servikal karsinoma hücre serisi olan HeLa hücreleri (Henrietta Lacks servikal kanser hücreleri) birçok laboratuvar ortamında bulunmakta, ticari olarak kolaylıkla sağlanabilmektedir. HeLa hücrelerinin de *B.henselae* ile kolaylıkla enfekte olabildiği patogenezi çalışmalarını gösterilmiştir^{15,16}. Sunulan çalışmada, *B.henselae* bakterisi standart yöntemler kullanılarak HeLa ve Vero hücrelerinde eş-kültür ile çoğaltılmış, IFA tekniği ile antikor saptama oranları karşılaştırılmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmaya tıbbi etik kurul tarafından *B.henselae*'ye karşı antikor varlığının araştırılmasına onay verilen 381 serum örneği alındı. Antijenlerin hazırlanmasında Regnery ve arkadaşları¹⁷ tarafından önerilen yöntem uygulandı. Tip II güvenlik kabini içinde, liyofilize *B.henselae* ATCC 49882 (Houston-1) suşu steril fosfat tamponlu tuzlu su (PBS) ile süspansiyon edildi. Bakteri süspansiyonu taze olarak hazırlanmış %5 defibrine at kanlı beyin-kalp infüzyonu (BKI) agar besiyerlerine eklendi. Ekim yapılan besiyerleri nem ve %10 CO₂ sağlayan etüvde 45 gün inkübe edildi. *B.henselae*'nin Vero ve HeLa hücre kültürlerine eş-kültürü Zbinden ve arkadaşları¹⁴ tarafından belirtilen şekilde yapıldı. Hücrelerin tek tabaka oluşumu sağlandıktan sonra, %5 at kanlı BKI agar besiyerinde canlandırılmış olan *B.henselae* suşu, BKI buyyonu ile süspansiyon edildi. Hazırlanmış bakteri süspansiyonundan 100 µl alınarak tek tabaka halinde hücre içeren 25 cm³'lük "flask"lar içine inoküle edildi. Hücreler 37°C'de %10'luk CO₂ ve nem sağlayan etüvde yaklaşık bir hafta inkübasyona bırakıldı. Teflon kaplı lamlar %96'lık etanol içeren şale içinde 10 dakika bekletildi. Hava akımı altında kurutulmuş lamlar kullanıma hazır hale getirildi. Inkübasyonda bırakılmış hücreler Tip II güvenlik kabini içinde steril Pasteur pipeti yardımıyla steril cam tüplere alındı. Yılmaz ve arkadaşlarının¹⁸ tanımladığı şekilde, cam tüp içerisine alınan *B.henselae* ile enfekte hücreler, su banyosunda 56°C'de 30 dakika bekletilerek *B.henselae* antijenlerinin inaktivasyonu sağlandı¹⁸. Güvenlik kabininde 100 µl'lik pipet yardımıyla inaktive edilmiş antijen süspansiyonundan 10'ar µl alınarak, her birinde on kuyucuk bulunan teflon kaplı lamlar üzerine konuldu. Lamlar hava akımı yardımıyla oda ısısında kurumaya bırakıldı. Kurutulmuş olan lamlar -20°C soğutulmuş aseton içerisinde 15 dakika bekletilerek antijenler tespit edildi ve çalışma süresine kadar -70°C'de saklandı.

Çalışma kapsamına alınan 381 serum örneği için Regnery ve arkadaşlarının¹⁷ tanımladığı protokol uygulandı. Tween 20 (%1) içeren PBS ile yağlı alınmış süt tozundan %5'lik çalışma solüsyonu hazırlandı. Serum örnekleri oda ısısında çözüldükten sonra vorteks ile süspansiyon edildi. Her iki hücre kültürü serisinden hazırlanan antijenlerle kaplanmış lamlar üzerinde, serum örneklerinin 1/64 dilüsyonundaki antikor varlığı IFA tekniği ile

Tablo 1. *B.henselae* ATCC49882 Suşunun HeLa ve Vero Hücre Serilerinde Eş-Kültürü Antijenlerinin IFA ile Değerlendirmesi (Cohen κ = 0.68)

		Vero hücre serisinde		
		Pozitif	Negatif	Toplam
HeLa hücre serisinde	Pozitif	127	25	152
	Negatif	34	195	229
	Toplam	161	220	381

araştırıldı. Floresans mikroskobu ile değerlendirme deneyimli araştırmacılar tarafından yapıldı ve $\geq 2+$ yansıma alınması pozitif reaksiyon olarak kabul edildi.

Verilerin istatistiksel analizi için SPSS Ver 16.0.0 programı kullanıldı. Yöntemler arasındaki uyum Cohen κ (kappa) ve Landis-Koch değerlendirmesi dikkate alınarak belirlendi^{19,20}.

BULGULAR

Araştırmaya alınan serum örneklerinden elde edilen veriler Tablo 1’de gösterilmektedir. Test edilen iki hücre grubu arasındaki rastlantısal olmayan uyum (Cohen κ değeri) 0.68 olarak bulunmuş ve “güçlü tutarlı” olarak değerlendirilmiştir. Bu sonuç Landis-Koch değerlendirmesine göre, “iki test arasında önemli derecede uyuma bulunmaktadır” şeklinde yorumlanmıştır. Vero hücrelerinde eş zamanlı üremenin daha çok olduğu, buna bağlı değerlendirmenin daha kolay olduğu gözlenmiştir.

TARTIŞMA

Bartonellozun tanısında lenf nodu veya diğer enfekte dokulardan alınan biyopsi örneklerinin PCR ile analizi tanı koydurucudur. Ancak invazif işlem gerektirmeyen serolojik testler, tanıda ilk basamağı oluşturmaktadır^{6,13,21}. Ulaşılabilen literatürdeki *B.henselae* seroprevalansı araştırmalarında, antijen kaplı lamların hazırlanmasında *B.henselae*’nın çoğunlukla Vero hücrelerinde, ikinci sırada da Hep-2 hücrelerinde eş-kültür yöntemi ile çoğaltıldığı görülmekle birlikte, besiyerinde üretilen bakterilerden elde edilen antijenlerin kullanıldığı çalışmalar da bulunmaktadır^{6-10,14,22-24}.

Laboratuvarda hazırlanan “in-house” kitlerin yanı sıra ticari olarak temin edilen IFA kitleri, toplum taramaları ve hasta örneklerinde tanıya yönelik incelemelerde kullanılmaktadır. Farklı yöntemler ile elde edilen verilerde; çoğunlukla sonuçların değerlendirilmesi ve birbirleriyle karşılaştırılması aşamasında sorunlar ortaya çıkmaktadır. Aynı zamanda testlerin uygulandığı popülasyonun bartonelloz riski veya kesin tanısının bulunmaması da karşılaşılan diğer bir sorundur. Uygun örneğin elde edilebildiği ve moleküler tanımlamaların yapılabildiği uygulamalar dışında, tanısında zorluklar ile karşılaşılan kedi tırmığı hastalığı, bakteriyel peliyoz ve sınırlı lenfadenopati durumlarında, IFA testinin uygulanabildiği hasta popülasyonunda, testin yapıldığı andaki bartonellozun durumu hakkında yeterli bilgi bulunmamaktadır⁹. Benzer şekilde, bu testlerin yapıldığı ülkelerdeki sınırlı top-

lumlarda bartonelloz seroprevalansının büyük farklılıklar gösteriyor olması da, kontrol amaçlı negatif popülasyon grubunun oluşturulmasını güçleştirmektedir^{6,9,13}. Bunun nedeni olarak da, farklı bölgelerde bulunabilecek farklı *B.henselae* genotiplerinin olabileceği ileri sürülmüştür¹¹. Ayrıca test edilen örneklerin farklı *Bartonella* türleri, *Chlamydia trachomatis*, *Coxiella burnettii*, *Rickettsia rickettsii*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Treponema pallidum*, *Francisella tularensis* ve *Mycoplasma pneumoniae* ile çapraz reaksiyon verebilmesi de farklı yöntemler ile hazırlanan ortamlarda elde edilen IFA sonuçlarının karşılaştırılmasını zorlaştırmaktadır^{9,11}. Ancak bu çapraz reaksiyonların büyük çoğunluğunun *C.burnettii* ile olabileceği belirtilmektedir^{6,13,25}. Benzer şekilde Epstein-Barr virus kapsid antijenine karşı gelişen IgM tipi antikorlar da bazı yöntemlerde çapraz reaksiyon verebilmektedir²⁶. *B.henselae* Marsilya genotipine karşı *Toxoplasma gondii* IgM tipi antikorları da çapraz reaksiyon oluşturmuştur¹¹. Tsuneoka ve arkadaşları²⁷, hücre kültürlerinde üretilen antijenlerin IgM tipi antikorlara özgül olmayan şekilde bağlanarak yanlış pozitif sonuçlara yol açabildiğini, bu nedenle IgM IFA testlerinde antijenlerin agardan elde edilmesinin, sonuçların yorumlanmasında önemli bir faktör olduğunu ileri sürmüşlerdir. Bir diğer sorun da, farklı yöntemlerle elde edilen antijenler ile hazırlanan IFA testlerinde, farklı dilüsyonların eşik değer olarak kabul edilmesidir^{6,9,11,13}.

Sunulan araştırmada Cohen κ değeri 0.68 bulunmuştur. Bu değerlendirme Cohen tarafından 1960 yılında ortaya atılmıştır, ancak çeşitli araştırmacılar tarafından farklı yorumlanmaktadır^{28,29}. Literatürde farklı iki testin uyumu için önerilen diğer bir değerlendirme metodu Landis ve Koch²⁰ tarafından ileri sürülmüştür; ancak bu değerlendirmenin de her zaman uyumu belirtmediği vurgulanmaktadır. Yine de her iki test için 0.60'ın üzerinde saptanan değer, genellikle testlerin uyumlu olduğu yönündedir. İstatistiksel verinin (Cohen κ) elde edilmesinde test edilemeyen en önemli parametre, IFA değerlendirmesi yapanların "grup içi uyumu"dur. Bu durum araştırmacıların deneyimi ile değişkenlik gösterecektir. Bu nedenle sunulan araştırmada, farklı çalışmalar nedeniyle daha önce aynı test yöntemini kullanmış deneyim sahibi araştırmacılar IFA testi değerlendirmesine katılmışlardır.

Çalışmamızda elde edilen veriler, laboratuvar ortamında hazırlanan HeLa hücrelerinde eş-kültüre alınan *B.henselae*'dan elde edilen antijenlerin, bartonelloz tanısında IFA yönteminde kullanılabilirliğini düşündürmektedir. Burada kısıtlayıcı basamak, elde edilecek olan verilerin literatürde yer alan Vero ve Hep-2 hücre temelli veya agarda üretilen antijenlerle yapılan araştırmaların verileri ile karşılaştırılmasındaki zorluklardır. HeLa hücrelerinde çoğaltılan antijenin IFA testinde kullanımında güvenilirliğine ait veriler yukarıda tartışılan parametreler açısından farklı araştırmalar ve araştırmacılar tarafından değerlendirilmelidir. Ülkemizde insanlarda ve hayvanlarda bartonelloz seroprevalansına yönelik taramalar henüz yeni başlamıştır^{18,30}. Bu taramalarda en önemli sorunlardan biri maliyettir. Vero hücre serileri ile aralarında büyük maliyet farkı olmamakla birlikte, özellikle ortak amaca yönelik genetik, biyoloji ve mikrobiyoloji alanlarına sahip araştırma laboratuvarlarında, HeLa hücrelerinin *B.henselae* ile eş-kültürünün yapılması maliyetin düşürülmesi konusunda yardımcı olabilir. Benzer şekilde farklı genotiplere sahip *Bartonella* suşlarının hücre dizilerinde antijen özelliklerinin araştırılmasında, maliyeti düşük, özgüllüğü ve duyarlılığı yüksek testlerin oluşturulması gereklidir.

KAYNAKLAR

1. Chomel BB, Boulouis HJ, Maruyama S, Breitschwerdt EB. *Bartonella* spp. in pets and effect on human health. *Emerg Infect Dis* 2006; 12(3): 389-94.
2. Boulouis HJ, Chang CC, Henn JB, Kasten RW, Chomel BB. Factors associated with the rapid emergence of zoonotic *Bartonella* infections. *Vet Res* 2005; 36(3): 383-410.
3. Anderson BE, Neuman MA. *Bartonella* spp. as emerging human pathogens. *Clin Microbiol Rev* 1997; 10(2): 203-19.
4. Carithers HA. Cat scratch disease: an overview based on a study of 1200 patients. *Am J Dis Child* 1985; 139(11): 1124-33.
5. Florin TA, Zaoutis TE, Zaoutis LB. Beyond cat scratch disease: widening spectrum of *Bartonella henselae* infection. *Pediatrics* 2008; 121(5): e1413-25.
6. Sander A, Berner R, Ruess M. Serodiagnosis of cat scratch disease: response to *Bartonella henselae* in children and a review of diagnostic methods. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2001; 20(6): 392-401.
7. Sander A, Posselt M, Oberle K, Bredt W. Seroprevalence of antibodies to *Bartonella henselae* in patients with cat scratch disease and healthy controls: evaluation and comparison of two commercial serological tests. *Clin Diagn Lab Immunol* 1998; 5(4): 486-90.
8. Zbinden R, Michael N, Sekulovski M, von Graevenitz A, Nadal D. Evaluation of commercial slides for detection of immunoglobulin G against *Bartonella henselae* by indirect immunofluorescence. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1997; 16(9): 648-52.
9. Maurin M, Rolain JM, Raoult D. Comparison of in-house and commercial slides for detection by immunofluorescence of immunoglobulins G and M against *Bartonella henselae* and *Bartonella quintana*. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002; 9(5): 1004-9.
10. Tsuneoka H, Fujii R, Fujisawa K, et al. Clinical evaluation of commercial serological test for *Bartonella* infection. *Kansenshogaku Zasshi* 2000; 74(4): 387-91.
11. Vermeulen MJ, Verbakel H, Notermans DW, Reimerink JH, Peeters MF. Evaluation of sensitivity, specificity and cross-reactivity in *Bartonella henselae* serology. *J Med Microbiol* 2010; 59(Pt 6): 743-5.
12. Bergmans AM, Peeters MF, Schellekens JF, et al. Pitfalls and fallacies of cat scratch disease serology: evaluation of *Bartonella henselae*-based indirect fluorescence assay and enzyme-linked immunoassay. *J Clin Microbiol* 1997; 35(8): 1931-7.
13. Vermeulen MJ, Herremans M, Verbakel H, et al. Serological testing for *Bartonella henselae* infections in the Netherlands: clinical evaluation of immunofluorescence assay and ELISA. *Clin Microbiol Infect* 2007; 13(6): 627-34.
14. Zbinden R, Höchli M, Nadal D. Intracellular location of *Bartonella henselae* cocultivated with Vero cells and used for an indirect fluorescent-antibody test. *Clin Diagn Lab Immunol* 1995; 2(6): 693-5.
15. Riess T, Andersson SG, Lupas A, et al. *Bartonella* adhesin a mediates a proangiogenic host cell response. *J Exp Med* 2004; 200(10): 1267-78.
16. Kempf VA, Volkmann B, Schaller M, et al. Evidence of a leading role for VEGF in *Bartonella henselae*-induced endothelial cell proliferations. *Cell Microbiol* 2001; 3(9): 623-32.
17. Regnery RL, Olson JG, Perkins BA, Bibb W. Serological response to "*Rochalimaea henselae*" antigen in suspected cat-scratch disease. *Lancet* 1992; 339(8807): 1443-5.
18. Yılmaz C, Ergin Ç, Kaleli İ. Pamukkale Üniversitesi Kan Merkezi'ne başvuran donörlerde *Bartonella henselae* seroprevalansının araştırılması ve risk faktörlerinin irdelenmesi. *Mikrobiyol Bul* 2009; 43(3): 391-401.
19. Hayran M, Özdemir O. Bilgisayar, İstatistik ve Tıp. 1996. Hekimler Yayın Birliği, Ankara.
20. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 1977; 33(1): 159-74.
21. Herremans M, Vermeulen MJ, Van de Kasstele J, Bakker J, Schellekens JF, Koopmans MP. The use of *Bartonella henselae*-specific age dependent IgG and IgM in diagnostic models to discriminate diseased from non-diseased in cat scratch disease serology. *J Microbiol Methods* 2007; 71(2): 107-13.

22. Al-Majali AM, Al-Qudah KM. Seroprevalence of *Bartonella henselae* and *Bartonella quintana* infections in children from Central and Northern Jordan. *Saudi Med J* 2004; 25(11): 1664-9.
23. Pons I, Sanfeliu I, Cardeñosa N, Nogueras MM, Font B, Segura F. Serological evidence of *Bartonella henselae* infection in healthy people in Catalonia, Spain. *Epidemiol Infect* 2008; 136(12): 1712-6.
24. Zbinden R. *Bartonella henselae*-based indirect fluorescence assays are useful for diagnosis of cat scratch disease. *J Clin Microbiol* 1998; 36(12): 3741-2.
25. La Scola B, Raoult D. Serological cross-reactions between *Bartonella quintana*, *Bartonella henselae*, and *Coxiella burnetii*. *J Clin Microbiol* 1996; 34(9): 2270-4.
26. Zbinden R, Ströhle A, Nadal D. IgM to *Bartonella henselae* in cat-scratch disease and during acute Epstein-Barr virus infection. *Med Microbiol Immunol* 1998; 186(4): 167-70.
27. Tsuneoka H, Fujii R, Yamamoto K, et al. Determination of anti-*Bartonella henselae* antibody by indirect fluorescence antibody test--comparison of two types of antigen: non-cocultivated *B.henselae* and cocultivated *B.henselae* with Vero cells. *Kansenshogaku Zasshi* 1998; 72(8): 801-7.
28. Sim J, Wright CC. The Kappa statistic in reliability studies: use, interpretation, and sample size requirements. *Physic Ther* 2005; 85(3): 257-68.
29. Bakeman R, Gottman JM. The advantages of Cohen's kappa, pp: 62-7. In: *Observing Interaction: An Introduction to Sequential Analysis*. 1997, 2nd ed. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
30. Çelebi B, Kılıç S, Aydın N, Tarhan G, Carhan A, Babür C. Investigation of *Bartonella henselae* in cats in Ankara, Turkey. *Zoonoses Public Health* 2009; 56(4): 169-75.