



**Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza**



Trabajo Fin de

Autor/es

Director/es

Facultad de Veterinaria

"Prevalencia de infección por *Bartonella henselae* en saliva de gatos de colonia en Zaragoza"

RESUMEN

La infección por *Bartonella spp.* da lugar a una variada y amplia gama de condiciones clínicas que afectan a seres humanos y numerosos animales. Una parte importante de estas infecciones son zoonóticas, como la producida por *B. henselae* (la más importante por su incidencia), responsable de la Enfermedad del Arañazo del Gato o la Angiomatosis bacilar. Se ha demostrado que algunos animales de compañía como ciertos animales salvajes pueden actuar como reservorios de varias de las especies zoonóticas. Algunos artrópodos como las pulgas juegan un importante papel en la transmisión. El gato parece ser el principal reservorio de *B. henselae* (entre otras especies de *Bartonella*). La transmisión más probable ocurre por araños y mordedura de gatos infectados, aunque el modo en el que esta ocurre no está bien definido. Tanto la presencia de heces de pulgas contaminando las garras y la mucosa bucal del gato, como la posible presencia de sangre infectada en lesiones de estas zonas, se ha contemplado como origen de la transmisión. Este estudio preliminar pretende conocer la prevalencia de ADN de *Bartonella henselae* en muestras de mucosa oral de gatos de colonias callejeras y del Centro de Protección Animal de Zaragoza.

SUMMARY

Infection with Bartonella spp. results in a varied and wide range of clinical conditions affecting humans and many animals. A significant proportion of these infections are zoonotic, as produced by B. Henselae (the most important because of its impact), responsible of Cat Scratch Disease (CSD) or Bacillary angiomatosis. It has been demonstrated that some pets and some wild animals can be reservoirs for several zoonotic species. Some arthropods like fleas play an important role in transmission. The cat seems to be the main reservoir of B. henselae (among other species of Bartonella). The most likely transmission occurs by scratches and bites from infected cats, although the way in which this transfer occurs is not well defined. Both the presence of flea feces contaminating the jaws and oral mucosa of the cat, as the possible presence of blood infected lesions of these areas, it has been referred to as the source of transmission. This preliminary study aims to determine the prevalence of Bartonella henselae DNA in oral mucosa of street cat colonies and cats from the shelter of the city of Zaragoza.

INTRODUCCIÓN

Los primeros datos recogidos sobre infecciones causadas por *Bartonella* spp. datan de hace más de 1000 años. La infección de *B. bacilliformis* fue descrita ya en la dinastía Inca (55) y *B. quintana* ha podido ser aislada en restos humanos de 4000 años de antigüedad en Francia. (25). También se sospecha que *Bartonella* spp. fue la causa de un importante número de bajas dentro del ejército Napoleónico (37,50)

La primera especie descrita fue *Bartonella bacilliformis*, denominada así en reconocimiento al microbiólogo peruano Alberto Barton. Se trata de una bacteria endémica en Sur- América, no zoonótica, responsable de una forma de Bartonelosis humana transmitida por tábanos y con dos formas de presentación clínica relacionadas: Una anemia hemolítica muy grave conocida como Fiebre de Oroya o Enfermedad de Carrión (descrita por el estudiante de medicina Daniel Carrion que resultó muerto por dicha enfermedad al auto inoculársela), y la Verruga peruana, una enfermedad sistémica que produce lesiones cutáneas de tipo verrucoso debidas a la proliferación de células endoteliales. (37)

La Enfermedad del Arañazo del Gato (CSD) fue descrita en Francia en 1950 , aunque la primera referencia data de 1889 por Perinaud y no fue hasta 1992 cuando se documentó que *B. henselae* era el agente etiológico responsable de tal enfermedad. Se trata de la especie de *Bartonella* más conocida y, probablemente, la que con mayor frecuencia actúa como zoonosis. Los gatos son el principal vector y reservorio de dicha bacteria, la cual se transmite entre ellos principalmente a través de la picadura de la pulga felina (*Ctenocephalides felis*). La Angiomatosis bacilar, forma clínica propia de CSD en individuos inmunodeprimidos, fue descrita en 1990.

Entre las especies más conocidas están *B. henselae* (probablemente la que actúa en mayor número de ocasiones como zoonosis), *B. quintana* y *B. tricorum*, de las que se conoce la secuencia de su genoma y se han desarrollado algoritmos que han mejorado su diagnóstico e incrementado el conocimiento tanto de su biología como de su patogenicidad. (37)

Al menos 14 especies de *Bartonella* y especies *Candidatus*, son reconocidas como zoonóticas o potencialmente zoonóticas de las cuales seis han sido aisladas en perros o gatos. Es posible que especies de *Bartonella*, previamente consideradas no zoonóticas, sí lo sean. (4)

Muchas de las infecciones por *Bartonella spp.* se transmiten por medio de pulgas y piojos. Las garrafas también podrían transmitirlas, ya que se ha demostrado de forma directa, (garrafas infectadas) e indirecta, (una descripción de posible transmisión a una persona) (4).

Los animales infectados de forma natural por *Bartonella spp.* suelen padecer una bacteriemia desde intermitente hasta de varios años de duración y, en la mayoría de las ocasiones, asintomática (20). Esta situación de “equilibrio” entre la infección y su hospedador favorecería la transmisión de la infección a otros vectores (54)

A pesar de que los gatos son el principal reservorio de *B. henselae* y *B. clarridgeiae*, algunas personas infectadas niegan haber tenido contacto con estos animales. Esto hace sospechar que pudiera transmitirse a partir de fuentes medio ambientales, otros vectores artrópodos y otros hospedadores animales, por lo que el término “Enfermedad del Arañazo del Gato” sería algo restrictivo a la hora de expresar la variedad de cuadros clínicos y especies involucradas de *Bartonella*. El término “Bartonelosis” podría ser más adecuado (16)

Las infecciones por *Bartonella* en la especie humana pueden suponer un riesgo importante para la salud si no son tratadas adecuadamente. La alta mortalidad, presentada principalmente en individuos inmunodeprimidos, la variedad de formas clínicas y de especies del microorganismo que pueden estar involucrados en la infección y su potencial para la recidiva obliga a adaptar el tratamiento a cada situación. Hasta la fecha, el método más eficaz para prevenir la enfermedad consiste en establecer pautas de desparasitación adecuadas frente a artrópodos hematófagos como pulgas, piojos o garrafas (4)

I) ETIOLOGÍA

El género *Bartonella* contiene numerosas especies de pequeños bacilos o cocobacilos (1- 1,2 µm y 0,5-0,8 µm de diámetro) Gram negativos, aerobios o microaerófilos, hemotropos y pleomórficos, pertenecientes al subgrupo α2 de la Clase Proteobacterias. Son transmitidas a través de vectores y aisladas en un amplio rango de animales, tanto domésticos como salvajes. Este tipo de bacterias tienen la capacidad de hacerse intracelulares en eritrocitos y células endoteliales y producir bacteriemia intraeritrocítica persistente en mamíferos específicos, que actúan como hospedadores y reservorio de la infección (21)

I-1) Clasificación

Clase α-2-Proteobacteria

Orden Rhizobiales

Familia *Bartonellaceae*

Género *Bartonella*

Hasta la fecha se han podido registrar hasta 30 especies pertenecientes al Género *Bartonella* (Tabla 1). Además, a este número podrían sumarse alguno de los varios *Candidatus* (microorganismos que pudieran reunir las características propias del género) aislados tanto en personas como en animales domésticos y salvajes (4). Recientemente se han aislado 2 nuevas *Bartonella* sp. BAR15 and B1-1C a partir de ardilla roja y rata Americanas no incluidas en la Tabla 1.

La implementación de técnicas específicas de detección de anticuerpos en suero frente a *Bartonella* spp. y, sobre todo, el gran desarrollo que han experimentado nuevas herramientas y métodos basados en la biología molecular como la Polymerase Chain Reaction (PCR), ha supuesto un importante incremento en la identificación de estas bacterias en los últimos años. Ya en la década de los 90, el análisis filogenético y la secuenciación de la fracción 16S del ARN ribosómico permitió situar el género *Bartonella* próximo a los Géneros *Brucella*, *Agrobacterium* y *Afipia*, y separarlo del Orden de las Rickettsias, así como permitir la unificación de las diferentes especies que conformaban los Géneros *Rochalimaea*, *Grahamella* y *Bartonella* dentro de la familia *Bartonellaceae*, que únicamente incluía hasta entonces a la *B. bacilliformis* (8). Se han secuenciado el genoma de 10 *Bartonella* spp. (Tabla 1)

Anexo 1: Adaptación del listado de especies de *Bartonella* spp. descritas hasta marzo de 2014: epidemiología y datos clínicos. (4)

Tabla 1: especies de *Bartonellas* asignadas a las líneas genéticas tras la secuenciación de su genoma, basada en los genes *rpoB*, *gltA*, *ribC* y *groEL*. (63)

Línea genética	Especies de <i>Bartonella</i>
1	<i>B. bacilliformis</i>
2	<i>B. bovis</i> , <i>B. chomelii</i> , <i>B. capreoli</i> , <i>B. schoenbuchensis</i>
3	<i>B. rochalimae</i> , <i>B. clarridgeiae</i> , <i>B. spp. AR 15-3</i> , <i>B. sp. 1-1C</i>
4	<i>B. henselae</i> , <i>B. quintana</i> , <i>B. tribocorum</i> , <i>B. grahamii</i> , <i>B. koehlerae</i> , <i>B. vinsonii</i> subsp. <i>Berkhoffii</i> , <i>B. elizabethae</i>

En las especies marcadas en negrita se ha secuenciado su genoma. La agrupación filogenética se ha inferido de la colección de datos genómicos y de la secuencia de los genes *rpoB*, *gltA*, *ribC* y *groEL* que revelaban las mismas 4 líneas genéticas de *Bartonella*. Quedan excluidas de la tabla las *Bartonella* spp. que no han sido secuenciadas.(63)

En los años 90 se describieron dos genotipos de *B. henselae* (tipo I y II) basado en las diferencias del 16S rDNA, y se conocen subgrupos en cada tipo. Hay una gran diversidad de patrones genómicos en todos los aislados de *B. henselae*.

En la especie humana predomina el Genotipo I, que parece representar a los aislados mas patógenos para las personas, mientras que muchos de los gatos analizados estaban infectados por el Genotipo II (12, 43)

Se ha descrito la coinfección con ambos genotipos en un mismo gato (34). También hay evidencia de variación genómica en el curso de la infección en los gatos (7), que probablemente aumenta la habilidad de *B. henselae* para persistir en el hospedador (5). Igualmente, se ha observado la infección de un solo animal por diferentes especies de *Bartonella* (34). El conocimiento de nuevos datos sobre ambos genotipos se está viendo incrementando considerablemente gracias a la aplicación de nuevas técnicas moleculares.

I-2) Cultivo, aislamiento e identificación

La ventaja del hemocultivo, o cultivo a partir de muestras obtenidas de otros tejidos, es su alta especificidad, que demuestra la existencia de infección activa por *Bartonella*. Por el contrario, la naturaleza recidivante de la bacteriemia producida por este tipo de agentes (tanto en la especie felina como en otras especies reservorio y en humanos) impide considerar esta técnica como un método de diagnóstico sensible. (33)

Al tratarse de una bacteria de crecimiento lento, (las colonias se detectan entre 5 a 45 días según el método), se han probado una amplia variedad de sistemas y métodos de cultivo que serán detallados en el apartado correspondiente al Diagnóstico. La incubación se realiza generalmente a temperaturas variables de 35°C o 37°C, en cámara húmeda en atm. del 5 a 10% de CO₂. El cultivo en líneas celulares continuas de mamíferos o insectos con diversas metodologías ha contribuido a disminuir el tiempo y aumentar la probabilidad de aislar *Bartonella* spp. (63).

II) EPIDEMIOLOGIA de la infección por *Bartonella* spp.

Se trata de una infección de distribución mundial que no produce brotes epidémicos importantes. La prevalencia de la enfermedad varía en función del área geográfica encontrándose mayores prevalencias en zonas donde las condiciones ambientales favorecen la proliferación de artrópodos que actúan como vectores de la infección. Dichos vectores varían en función de las especies de *Bartonella* involucradas. Se calcula que *B. henselae* causa alrededor de 22000 casos diagnosticados de CSD al año, requiriendo hospitalización en torno a un 10% de los enfermos. La mayoría de los casos se concentran al final del otoño e invierno, debido al contacto más estrecho y prolongado que se produce entre los propietarios y sus mascotas. La CSD puede ocurrir en individuos de cualquier edad, si bien la mayoría de los casos se producen en niños y jóvenes.

La infección por *Bartonella* en las diferentes especies animales, tanto domésticas como salvajes, es cada vez más conocida y documentada. Cabe destacar la importancia que tienen los mamíferos, sobre todo las especies domésticas, dentro de la epidemiología de la infección, ya que suponen el principal reservorio de la bacteria y la principal fuente de contagio para el ser humano. La prevalencia de las diferentes especies de *Bartonella* varía en función del mamífero que actúa como reservorio.

II-1) Epidemiología de la infección por *Bartonella* spp. en Gatos

B. henselae, responsable de la llamada Enfermedad del Arañazo del Gato (CSD), presenta una alta prevalencia en la especie felina (más del 93% en algunas colonias) y algo menor en el perro (10-35%)

(a) Prevalencia de la Bacteriemia:

La bacteriemia por *B. henselae* es bastante variable entre regiones y tipos de gato usados en los estudios. En los gatos sanos muestran prevalencias desde el 25 al 41% según la región (30) Estudios realizados en Noruega, Francia, Alemania, Reino Unido, Holanda, España e Italia, con gatos tanto callejeros como con propietario, muestran prevalencias de bacteriemia por *B. henselae* que oscilan entre el 0 % en Noruega y el 61.1 % encontrado en Lombardía (Italia) (14, 32, 59)

Namekata et al., en el año 2010 (45), observó bacteriemia en el 25% de gatos de un albergue en el Norte de California, sobre todo en los más parasitados con pulgas, y en gatos procedentes de Michigan, los infestados con pulgas tenían 4 veces más probabilidad de ser bacteriémicos que los gatos no infestados.

Tabla 2: relación de prevalencia de Bacteriemia por *Bartonella* spp. en diferentes localizaciones geográfica y tipos de gatos analizados (Tabla extraída de H.J. Boulouis et al., año 2005, (14))

País (localización)	Población felina	<i>Bartonella</i>	Prevalencia de bacteriemia positivo/total (%)	Año
Francia (París)	Mascotas	<i>B. spp.</i> <i>B. henselae</i>	72/436 (16.5) H: 11/72 (15.3) M: 36/72 (50) H+ M: 2/72+E21 (2.8)	(2001)
Francia (Nantes)	Callejeros	<i>B.spp.</i> <i>B. henselae</i>	50/94 (53) H: 17/50 (34) M: 18/50 (36)	(2002)
Alemania (Berlín)	Mascotas/callejeros	<i>B. henselae</i>	20/193 Mascotas: 1/97 (1) Callejeros: 19/96 (18.7) H: 1/20 (5) M: 18/20 (90)	(2001)
Holanda	Refugios	<i>B. henselae</i>	25/113 (22) H: 6/25 (24) M: 10/25 (40)	(1997)
Reino Unido	Mascotas	<i>B. henselae</i>	40/351 (11.4)	(2001)
Noruega	Mascotas	<i>B.spp.</i>	0/100	(2002)
Italia (Lombardía)	Callejeros	<i>B.spp.</i> <i>B. henselae</i>	140/769 (18) H: 27/131 (20.6) M: 80/131 (61.1) H + M: 24/131 (18)	(2004)
Italia (norte)	Callejeros	<i>B. henselae</i>	361/1585 (23)	(2004)
España (Mallorca) España (Noreste)	/	<i>B. henselae</i>	8/40 (20)	(2006)
España (La Rioja)	Callejeros Mascotas Corral	<i>B. henselae</i> <i>B. henselae</i> <i>B. henselae</i>	21/79 (26.6) 6/51 (11.8) 4/17 (23.5)	(2013)

B.spp: *Bartonella* spp.

(b) Seroprevalencia:

La seroprevalencia detectada en diferentes estudios realizados en Reino Unido, Alemania, Francia, Italia y España, con gatos tanto con dueño como de la calle, varía entre un 9.4% y un 71.4%. (6, 14, 59)

Tabla 3: relación de datos de seroprevalencia de *Bartonella* spp. en diferentes localizaciones geográfica y tipos de gatos analizados. (Tabla extraída de H.-J. Boulouis et al., año 2005 (14))

País (localización)	Población felina	<i>Bartonella</i>	Seroprevalencia Positivo/total (%)	Año
España (noreste)	¿?	<i>B.henselae</i>	120/168 (71.4)	(2006)
España (Madrid)	Mascotas	<i>B.henselae</i>	162/680 (23.8)	(2012)
Francia (París)	Mascotas	B.spp.	179/436 (41.1)	(2001)
Alemania	Mascotas	<i>B.henselae</i>	107/713 (15)	(1999)
Italia (Lombardía)	Callejeros	<i>B.henselae</i>	207/540 (38)	(2004)
Italia (Norte)	Callejeros	<i>B.henselae</i>	553/1416 (39)	(2004)
Reino Unido	Mascotas	<i>B.henselae</i>	28/69 (9.4)	(2002)
	Salvaje	<i>B.henselae</i>	33/79 (41.8)	

B.spp: *Bartonella* spp.; **¿?:** No conocido

Climas húmedos y secos presentan seroprevalencias muy bajas (0% en Noruega, 1% en Suecia) mientras que es elevada en países más húmedos y con temperaturas más altas (68% en Filipinas, 71% en Chile). Existen también importantes diferencias en función del estilo de vida del gato (callejero vs mascota) así como con la edad.

Es fundamental ser conscientes de las limitaciones de estos estudios a la hora de evaluar los resultados, tanto los que buscan determinar la prevalencia de gatos seropositivos como la de aquellos con bacteriemia. La presencia de bacteriemias recurrentes o bajas cargas bacterianas en sangre podrían explicar porque algunos gatos bacterémicos pueden ser seronegativos y viceversa, gatos no bacterémicos ser positivos serológicamente. Por otro lado, las posibles reacciones cruzadas (a pesar de no estar del todo documentadas) o la existencia de individuos coinfectados por diferentes especies (*B. henselae*, *B. clarridgeiae*, *B. bovis* o *B. quintana*) podrían suponer también importantes limitaciones para las técnicas de diagnóstico por serología. Por ello es importante llegar a establecer una correlación entre ambos datos de prevalencia para

evaluar, de manera más precisa, la incidencia de infección por *Bartonella* spp. en las diferentes áreas geográficas.

(c) Presencia de ADN de *Bartonella* en saliva:

Existen pocos estudios que determinen la presencia de ADN de *Bartonella* spp. a partir muestras orales tomadas en gatos. En alguno de los realizados, se han establecido prevalencias que varían desde el 4.8% (24) y el 17.6% (41), o el 44.1% obtenido en gatos salvajes por Kim y col., en el año 2009 (38). En el sur de Italia se han encontrado prevalencias de ADN en saliva hasta del 60% (47).

En un estudio retrospectivo realizado en Francia, se pudo determinar la presencia de ADN de este tipo de microorganismos en la pulpa dentaria de gatos fallecidos durante los siglos XIII y XIV (14)

En otro estudio realizado en el norte de California con gatos procedentes de albergues, se pudo establecer una prevalencia del 38.3% en cuanto a la detección de ADN en muestras orales. Se observó que existía cierta correlación entre bacteriemia y la detección de ADN en la boca ya que, en gatos bacteriémicos, la probabilidad de obtener una PCR positiva en la muestra oral era superior (50%) a la de los no bacteriémicos (32.5%) (45). Quimby y col., en el año 2008 (49) encontró una prevalencia media de ADN del 11.1% a partir de muestras procedentes de gatos tanto con estomatitis (n=9) como sin esta (n=36). Entre los gatos muestreados solo uno de ellos era bacteriémico.

(II-2) Transmisión de *Bartonella* spp. en el gato

La pulga felina (*Ctenocephalides felis felis*) es el eje fundamental sobre el que giran los principales mecanismos de transmisión de *B. henselae* en el gato. Si bien sigue siendo un tema sujeto a investigación, las heces y la saliva de pulgas infectadas parecen estar implicadas en este proceso.

Se ha demostrado la transmisión del agente experimentalmente, transfiriendo pulgas alimentadas de sangre de gatos infectados a gatos libres de gérmenes patógenos (SPF) y por inoculación intradérmica (ID) de heces de pulgas alimentadas en gatos infectados (19, 29, 30). Se ha comprobado que *B. henselae* es capaz de sobrevivir hasta 3 días en las heces de pulga (29)

Bouhsira y com., en el año 2013 (13), demostraron que *C. felis* es el vector de *B. henselae* (y muy probablemente, lo es también de *B. claridgeiae*, *B. quintana* y *B. koehlerae*) en su transmisión a los diferentes mamíferos, lo que sugiere el potencial de las pulgas como vectores de varias especies de *Bartonella* a través de la saliva, pero no observaron transmisión vertical en sus condiciones artificiales. Comprobaron que todas

las especies de *Bartonella* usadas (incluidas *B. tribocorum* y *B. birtlesii de ratones*), eran excretadas en las heces de *C. felis* y dedujeron que la especificidad del parásito por su hospedador mamífero es lo que explica que especies de *Bartonella* que puede portar *C. felis*

Se sabe que *C. felis* parasita muchas especies de animales domésticos y salvajes, incluyendo gatos, cabras, ovejas, bóvidos, ratas, pollos, osos, mapaches, hurones, zarigüeya, lagartos, ratas y ratones, pero se asocia, principalmente al gato y el perro y representa a las principales pulgas presentes en las casas humanas (10), lo que favorece que compartan los mismos agentes patógenos. Se cree que *C. felis* se mantiene en su hospedador durante toda su vida adulta (solo un 15% de los adultos parecen moverse a otros hospedadores. A pesar de esto, se ha puesto en evidencia la transmisión de pulgas entre gatos ya que el uso de insecticida bloquea la transmisión entre los gatos tratados (15).

Ha habido cierta controversia respecto a la transmisión a través de la saliva en la picadura. Foil y col., en el año 1998 (30), decían que la transmisión por medio de saliva de pulgas no se había demostrado, sin embargo, numerosos estudios sugieren que tanto las moscas mordedoras, piojos, pulgas o garrafas podrían transmitir *Bartonella spp.* durante su alimentación con la sangre del hospedador (13).

Se sabe que para iniciar la ingestión de sangre a partir de su hospedador, la pulga inyecta en el hospedador una pequeña cantidad de saliva antes de la aspiración (26). Es decir que la pulga inyecta la saliva conteniendo los patógenos para el hospedador.

B. henselae y *B. birtlesii* pueden replicarse en las glándulas salivales de las garrafas *I. ricinus* y son capaces de regurgitarlas en la sangre no contaminada durante su alimentación (13).

Boushira y col., en 2013 (13), han demostrado que el ADN de *B. henselae* es regurgitado en la sangre fresca, dado (30) que la transmisión de heces contaminadas de las pulgas al hospedador tiene que ser intradérmica o parenteral se deduce que la infección por *Bartonella spp.* se pueden transmitir por las heces de las pulgas o durante la ingestión de sangre.

No se ha podido demostrar la transmisión de *B. henselae* entre gatos infectados y no infectados que convivan en un medio libre de pulgas, por lo que la transmisión entre estos no ocurriría a través de la mordedura, arañazo, lamido o compartiendo plato o bandeja de heces. Tampoco se ha podido comprobar la transmisión entre hembras bacterémicas y machos no infectados durante la monta, o el paso de la bacteria desde

hembras bacteriémicas a sus cachorros (ya sea durante la gestación o durante el periodo perinatal) en un ambiente libre de pulgas (13).

Si bien la transmisión vertical en artrópodos vectores no ha podido ser demostrada en condiciones experimentales, la amplificación de ADN de *Bartonella* en tejidos reproductivos de pulgas recogidas en varios mamíferos permite pensar que este fenómeno podría ocurrir en condiciones naturales. (13)

En los últimos años se han propuesto a las garrapatas como vectores de la infección de especies de *Bartonella* entre los gatos, el ser humano, perros y otros hospedadores mamíferos (22). Algunas especies como *B. henselae* han podido ser detectadas en estos artrópodos mediante técnicas de PCR (17). En un estudio realizado por Dietrich y col. en 2010, se observó que un 40% de las poblaciones de garrapatas muestreadas en 4 localizaciones europeas distintas contenían ADN de *B. henselae* (22)

Se ha podido comprobar cómo la saliva de *I. ricinus*, infectadas experimentalmente con *B. henselae*, es capaz de inducir bacteriemia tras ser inoculada en gatos (22).

En las garrapatas *I. scapularis* o *I. pacificus* se ha podido detectado ADN de *B. henselae* (17). A pesar de todo, el papel de las garrapatas como vectores de *B. henselae* todavía es controvertida y no bien conocida (37).

Son necesarios estudios más amplios para clarificar el papel que juegan artrópodos como las garrapatas (22), las moscas o mamíferos como los roedores, como factores de riesgo en la transmisión de *Bartonella* spp. (37).

III) PATOGENIA de infección por *Bartonella* spp.

III-1) Patogenia en la especie Humana

En la especie humana (y probablemente en gatos y otras especies), el ciclo de *Bartonella* spp. comienza con la colonización del nicho primario (54). Esto genera una respuesta por parte del Sistema Inmune que, por norma general, controlará la progresión de la infección y producirá, entre otras manifestaciones clínicas, una linfadenopatía local (por ej., en el caso de *B. henselae*, *B. quintana* y *B. alsatica*) (3, 4) o la formación de un granuloma o pápula en el punto de inoculación (*B. henselae*).

En esta situación se establece una relación comensal imperfecta entre el patógeno y el hospedador, que da lugar a una estrategia sigilosa de supervivencia de la *Bartonella* (4), esta es capaz de reaparecer en el torrente circulatorio a los 4-5 días de ser eliminado de la sangre tras su inoculación. En esta segunda fase, la bacteria (en el caso de *B.*

bacilliformis y *B. quintana*) es capaz de adherirse e invadir los eritrocitos, donde se producirá una fase de replicación intracelular. Las manifestaciones clínicas típicas de esta fase son, por ejemplo:

- Fiebre de Oroya, por *B. bacilliformis*
- Enfermedad de las trincheras por *B. quintana*.

Bartonella spp. podría, a continuación, colonizar un foco secundario que correspondería a lugares bien vascularizados del organismo como:

- Las válvulas cardíacas, (Endocarditis producida por *B. quintana*, *B. henselae* y otras *Bartonellas*)
- El hígado y el bazo (Peliosis hepática por *B. henselae*)
- Otras zonas corporales tales como la base vascular de la piel o tejido subcutáneo:
 - La verruga peruana por *B. bacilliformis* y *Candidatus B. ancashi*
 - La angiomatosis vascular por *B. henselae* y en menor proporción por *B. quintana*)

Bartonella spp. es capaz de persistir en el torrente circulatorio durante el resto de la vida de los eritrocitos infectados, por lo que la bacteriemia puede prolongarse durante semanas o meses (23). Esta bacteriemia crónica es asintomática o con pocos síntomas (4).

III-2) Eliminación de la bacteriemia y protección inmune

Si bien se ha podido documentar la existencia de bacteriemias recurrentes (durante al menos 454 días) en gatos infectados experimentalmente por *B. henselae* o *B. clarridgeiae*, en infecciones naturales la bacteriemia recidivante observada parece estar relacionada con nuevas reinfecciones a través de pulgas u otros vectores, lo que parece indicar la ausencia de una protección inmune adquirida tras una primera infección. (5).

El grado de bacteriemia y la susceptibilidad frente a nuevas reinfecciones parece guardar relación con las especies de *Bartonella* involucradas. Experimentalmente se ha observado que los individuos infectados por *Bartonella* spp. se vuelven inmunes a nuevas infecciones cuando estas son producidas por cepas homólogas a la primera, pero no cuando se trata de cepas heterólogas. (64).

Los datos de infección experimental en gatos con los Genotipos I y II, han dado estos resultados (64)

Infección con Genotipo II: Protección frente a Genotipo II

	No protección frente a Genotipo I
Infección con Genotipo I:	Protección frente a Genotipo I
	Protección total o parcial frente a Genotipo II
Infección con Genotipo I o II:	No protección frente a <i>B. claridgeiae</i>
Infección con <i>B. koehlerae</i> o <i>B. carridgeiae</i> :	No protección frente a Genotipo I y II
La evidencia indica que especies individuales de <i>Bartonella</i> , se han asociado con hospedadores reservorio durante cientos o miles de años y este largo periodo de coevolución ha dejado numerosos medios de evasión inmune y la consiguiente co-existencia prolongada de <i>Bartonella</i> spp. en sus reservorios (25).	
Entre estos mecanismos de supervivencia, destacan los basados en la interacción de la bacteria con células específicas del hospedador y mediados por varios factores de virulencia, que le permiten evadir en gran medida la Respuesta Inmune (RI). Esta cualidad posibilita el establecimiento de una infección persistente de baja intensidad que le permite estar disponible para nuevas transmisiones a otro vector y/o hospedador.	
Son capaces de invadir el interior de los eritrocitos y otro tipo células (como las células endoteliales), mediante mecanismos propios de la especie de <i>Bartonella</i> (2), que considerarse un nicho primario de la infección. De esta manera, consiguen evitar los efectos de la RI.	
Además, se ha podido comprobar como <i>Bartonella</i> spp. puede abandonar periódicamente (cada 5 días) este “escondite” e ir infectando otros eritrocitos lentamente favoreciendo la persistencia de la infección en el tiempo (54). La localización exacta de las especies de <i>Bartonella</i> en los hospedadores no se ha determinado completamente, y puede diferir entre los pares <i>Bartonella</i> -hospedador (25).	
Llegar a conocer la totalidad de dichos nichos es un reto para los investigadores.	
La enorme variabilidad antigenica mostrada por estos microorganismos podría favorecer también la evasión frente al Sistema Inmune (SI) y facilitar, por tanto, la bacteriemia recurrente. (4)	

(III-2-1) Factores de virulencia de las especies de *Bartonella* (4):

Los factores de virulencia, aparte de intervenir en la adherencia e invasión inicial, favorecen la modulación de la RI para que permita la persistencia de la bacteria, juegan un papel importante en la formación de nuevos vasos sanguíneos provocando la proliferación de C. endoteliales, e influyen en otras funciones del hospedador todavía no determinadas.

T4SS, (no en *B. bacilliformis*): produce un poro de traslocación en la célula del hospedador que facilitará el paso de moléculas efectoras. Observado en *B henselae*, *B quintana*, *B birtlesii*, *B. grahamii*, y *B. tribocorum* (2)

Beps: proteínas efectoras traslocadas que alteran funciones y promueven la formación de un “invasoma” que permite la entrada de *Bartonella* en la célula hospedadora.

TrwT4SS 4 (*B henselae*, *B quintana* y *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii*), para adherencia a eritrocitos y otras células (2).

VirB/Vir T4SS, sistema de regulación transcripcional, ejerce el control del proceso de traslocación. Investigado en *B. tribocorum* y *B henselae*.

Histidin quinasa y BatR/BstS : un doble componente que regula al factor anterior (2)

NFkB, o factor regulador Kappa: surgen de las acciones anteriores y provocan liberación de citoquinas proinflamatorias y proangiogénicas e inhibición de la apoptosis de células endoteliales infectadas.

Flagelos (líneas genéticas 1 a 3), importante para la penetración de eritrocitos y potencian la unión de la bacteria a la célula hospedadora (2).

Adhesinas autotransportadoras triméricas facilitan la unión a las proteínas de la célula hospedadora.

La **adhesina A** de *Bartonella* (**BadA**) proteína de superficie de *B. henselae*, le confiere propiedades de autoaglutinación que produce adhesión a la célula hospedadora y la matriz extracelular; inhibe la apoptosis de C. endoteliales, e induce angiogénesis.

Vomps : proteínas de membrana expresadas de forma variable, de *B. quintana*, Promueven la **adhesión** (via hyaluronato y vitronectina en la matriz extracelular) y facilita la **angiogénesis**.

LPS, lipopolisacáridos (de Gram negativas): se hallan en *B. bacilliformis*, *B. henselae*, and *B. quintana* no activan la respuesta inmune humoral. Con propiedades anti-inflamatorias en ciertas circunstancias y pro-inflamatorias en otras condiciones.

En *B. quintana* afectan a la RI, permaneciendo indetectable al receptor Toll-like 4, y cuando son activados por los LPS de otras bacterias Gram-negativas provocan fuerte reacción inflamatoria.

IV) FORMAS CLÍNICAS:

IV-1) En la Especie Humana

- En individuos **inmunocompetentes**, el cuadro típico de CSD consiste en la formación de una pápula o granuloma, que se desarrolla en la zona del arañazo o mordisco después de 3-10 días de producirse la agresión y que puede persistir durante 2-4 semanas, y una linfadenitis regional gradual en la zona de drenaje linfático. *B. henselae* se detecta en la lesión inicial y punto de entrada de la infección, así como en los ganglios linfáticos afectados, (mediante inmuno-histoquímica sobre biopsias). Suele tratarse de un cuadro autolimitante que tiende a remitir sin tratamiento, si bien la linfadenitis puede persistir desde varias semanas hasta 12-24 meses (4). Entre un 10 y un 15% de los individuos pueden presentar abscesos ganglionares (48)
- La CSD en **personas inmunodeprimidas** (pacientes con VIH, aquellos que han sufrido un trasplante de órganos...) es más grave. Se produce la diseminación de la infección, lo que genera un cuadro sistémico: fiebre de más de 2 semanas de evolución, mialgia, artralgia/ artropatía, malestar general, fatiga, adelgazamiento, esplenomegalia y el Síndrome oculoglandular de Perinaud (este en un 5 % de los casos de CSD) con conjuntivitis unilateral, área de reacción local granulomatosa y linfadenitis submandibular o preauricular. También se ha descrito neurorretinitis, neuritis óptica y desprendimiento de retina. En pacientes pediátricos, se ha descrito una forma de encefalopatía que suele resolverse sin secuelas (4).
- La **Enfermedad de Carrión** es una forma de presentación clínica producida por *B. bacilliformis* caracterizada por una anemia hemolítica severa (puede producir tasas de mortalidad de hasta el 85% en ausencia de tratamiento). Dicha hemólisis puede venir acompañada de infecciones concurrentes en un tercio de las ocasiones. (52).
- La colonización, por parte de *B. quintana*, de los eritrocitos puede provocar la llamada **Enfermedad de las trincheras**. Se trata de una patología que puede provocar cuadros desde asintomáticos hasta graves, caracterizados por fiebre aguda acompañada de dolor de cabeza, dolor de la espina o mareos. La duración del cuadro oscila entre los 1-3 días y las 2-3 semanas (51), habiéndose descrito recidivas al cabo de unos años o incluso bacteriemias indefinidas con o sin síntomas.

- La denominada **Angiomatosis bacilar** (AB), producida por *B. henselae*, *B. bacilliformis* o *B. quintana*, (*Candidatus Bartonella ancashi* ha sido asociada a lesiones angioproliferativas en un paciente en Perú. Ocurre en personas inmunodeprimidas y se caracteriza por una intensa angiogénesis vascular, debida a la proliferación de células endoteliales y surge como un brote a partir de un vaso sanguíneo, que provoca la aparición de tumoraciones de diversa índole. El crecimiento de estos tumores depende de la presencia constante de la bacteria en dichas lesiones.

La angiogénesis por *Bartonella* se manifiesta típicamente en lesiones dérmicas:

- **Verruga Peruana** (*B. bacilliformis* y *Candidatus Bartonella ancashi*): El desarrollo de esta patología, caracterizada por la formación de tumoraciones a nivel cutáneo, no guarda una relación directa con el estado inmune del paciente, pero la inmunodepresión parcial que se desarrolla al final de la Fiebre de Oroya podría ser el origen del desarrollo de la fase de verruga peruana de la infección (18)
- **Angiomatosis bacilar** (*B. quintana* y *B. henselae*),
- **Peliosis hepática** (primariamente asociada a *B. henselae*), caracterizada por la proliferación vascular de los capilares sinusoides hepáticos que crean espacios llenos de sangre. Puede afectar también afecta al bazo, G. linfáticos y médula ósea (52). Se asocia más frecuente a personas inmunodeprimidas infectadas por *B. henselae* y *B. quintana*.

Histológicamente se pueden apreciar numerosas células endoteliales, bacterias y un infiltrado de monocitos- macrófagos y neutrófilos. La bacteria se encuentra en forma de agregados, rodeando la lesión y en el interior de las células endoteliales.

- Se han podido detectar casos de **Endocarditis infecciosa** en individuos con patología valvular degenerativa previa (particularmente fibrosis, calcificación e inflamación crónica,) y bacterémicos por *B. henselae* o *B. quintana* preferentemente (20), aunque se han informado de casos esporádicos producidos por *B. kholerae*, *B. viknsonii* subsp *berkhoffii*. *B. vinsonii* subsp.*arupensis*, *B. elizabethae* y *B. alsatica* o *Candidatus* como *B. mayotimonensis* (descrita en un caso en EEUU) . Se observa fiebre (en un 90% de los casos).

IV-2) En el gato

Los gatos infectados de forma natural con *Bartonella* spp. no suelen mostrar signos clínicos, si bien la aparición y gravedad de los mismos, podría variar con la especie de *Bartonella* (16). Si los signos clínicos son leves, puede que no sean detectados por sus propietarios.

Algunos gatos desarrollan **fiebre** tras sufrir procedimientos quirúrgicos (16). La uveítis puede ser otra manifestación natural. *Bartonella henselae* Genotipo I se ha asociado con endocarditis vegetativa de la válvula aórtica (con hemocultivo negativo), en 2 gatos infectados de forma natural (20). Se desconoce si las *Bartonella* spp. están presentes en ganglios linfáticos de algunos gatos con **linfadenomegalia** persistente o en algunos casos de **Peliosis hepatitis**. (21)

Debido a la alta prevalencia de exposición a *Bartonella* spp. en la población de gatos domésticos, se necesitan estudios epidemiológicos amplios cuidadosamente desarrollados para determinar si una condición clínica en particular está verdaderamente asociada a *B. henselae* en gatos y no a otras etiologías.

En estudios realizados simulando/o en condiciones naturales:

- Se ha descrito el desarrollo de **enfermedad cardiaca** en gatos infestados por pulgas infectadas. (21).
- Se ha sugerido que *Bartonella* spp. podría **potenciar los efectos de enfermedades crónicas** debido a la larga duración de la bacteriemia. Así, en un estudio realizado en Japón se observó que los gatos seropositivos tanto a *B. henselae* como a **FIV** tenían más probabilidad de padecer **gingivitis o linfoadenomegalia** que los gatos seropositivos a cada uno de ellos por separado (60). En un estudio suizo se estimó que podría existir una posible asociación entre la seropositividad y la **estomatitis o alteraciones urinarias** inespecíficas (11).
- Algunos pequeños estudios epidemiológicos han evaluado la asociación entre infección por *Bartonella* y signos neurológicos, estomatitis, uveítis y fiebre.

Hasta la fecha **no se ha podido demostrar una asociación estadística** entre la exposición a *Bartonella* spp. y las condiciones clínicas mencionadas en el transcurso de la infección natural (40,49).

En la infección **experimental**:

- Los gatos infectados por *B. henselae* suelen mostrar signos clínicos leves. Tras la inoculación ID, se suelen desarrollar áreas de induración o abscesos en el lugar de inoculación en un periodo de entre 2 días y 3-4 semanas. (39).
- Durante las primeras 6 semanas tras la inoculación se ha observado el desarrollo de linfadenopatía periférica generalizada, y cortos periodos de fiebre después de 48-96 horas, pudiendo volver a aparecer a las 2 semanas de contraer la infección. Se detectaron casos de animales que presentaban signos neurológicos (nistagmo, temblores corporales generalizados, leves contracturas locales, respuestas disminuidas o exageradas a estímulos externos, cambios de comportamiento) y dolor muscular epaxial (39). También se han descrito problemas reproductivos (33).
- Los gatos infectados con *B. khoehlerae* o *B. rochalimae* no han mostrado signos (64)

V) DIAGNÓSTICO

El diagnóstico de *Bartonella* spp. en la especie felina, y más concretamente de *B. henselae*, es un reto para los veterinarios. Las altas prevalencias de bacteriemia dadas en gatos hace muy difícil establecer una asociación causa- efecto entre la infección y la presencia de enfermedad. Como se ha comentado anteriormente, esta bacteriemia suele cursar de forma asintomática, por lo que será necesario testar, además de a aquellos gatos sospechosos, a los animales sanos, especialmente a esas mascotas que conviven con personas de riesgo para padecer la enfermedad.

V-1) Técnicas de diagnóstico

a) Cultivo microbiológico

Uno de los grandes inconvenientes del aislamiento e identificación de *Bartonella* spp. en cultivo es la baja sensibilidad de la prueba. Si bien el hemocultivo o un cultivo de otros tejidos positivo es siempre el resultado más fiable para concluir la presencia de infección activa, la naturaleza recidivante de la infección con *Bartonella* spp. puede complicar el aislamiento (33).

Es fundamental llevar a cabo de la forma más estéril posible la obtención y manipulación de las muestras. La liberación de la bacteria del interior de los eritrocitos para su posterior cultivo se puede llevar a cabo a través de tubos de centrifugación-lisis o mediante la congelación (-80°C) y descongelación de la muestra de sangre entera en EDTA (se han obtenido mejores resultados) (1, 63)

En la Tabla 2 se resumen los principales medios de cultivo desarrollados para mejorar el aislamiento y el tiempo de cultivo de *Bartonella* spp.

Tabla 2: (63)

Suplementados con 5 a 10% de sangre de cordero (o conejo y caballo):

Agar Infusión de cerebro–corazón

Agar *Brucella*

Columbia Agar chocolate

Agar Schaedler

Agar tripticasa-soja

Suplementados con Suero fetal bovino al 10%:

Medio de Crecimiento para α -proteobacteria (BAPGM)

Medio de cultivo para *Drosophila* de Schneider (16)

Medio base preparado para el crecimiento de células de insecto (DS2) y suplementados con compuestos como NAD, NADP, ATP, Piruvato sódico, aminoácidos y extracto de levadura.

Medios de cultivo basados en líneas celulares procedentes de mamíferos (Células Vero con medios como HEPES, M199 en el medio de Scheneider, o sin M199),

Nota: también se realizan combinaciones entre estos métodos

Los últimos métodos de cultivo desarrollados han conseguido buenos resultados dando una media de 5 días para aislar *B. henselae*, 7 días para *B. quintana* y 10 días *B. vinsonii* subsp. *Berkhoffii* (63).

b) Test serológicos

El gran inconveniente de las técnicas basadas en la detección de anticuerpos frente a *Bartonella* spp. es su incapacidad para determinar la presencia de una infección activa. La elevada persistencia en sangre de IgG en gatos infectados (no se sabe realmente cuánto tiempo puede llegar a detectarse), limita mucho la eficacia de estas técnicas. Otro inconveniente es la elevada variabilidad antigénica de las diferentes especies o cepas de *Bartonella* spp., ya que dificulta la detección de anticuerpos específicos al antígeno concreto que incluye el test y las posibles reacciones cruzadas con anticuerpos de otras especies bacterianas como *Coxiella burnetti* virus Epstein-Barr,

citomegalovirus, Toxoplasma gondii, y Chalmydophila pneumoniae también pueden dificultarlo, (61)

El valor predictivo positivo para la bacteriemia (PPV) de la IFI o ELISA (IgG) en gatos es solo de un 39 a 46%. El valor predictivo negativo para la bacteriemia o la presencia de ADN en la sangre es del 87 a 97%. No existe ningún punto de corte de los test serológicos que permita determinar si un gato está infectado en el momento del muestreo (64).

El diagnóstico serológico de CSD en el hombre presenta una importante variabilidad en cuanto a la especificidad y sensibilidad de la prueba utilizada. En función de la técnica empleada, los controles usados y el paciente seleccionado la sensibilidad puede variar desde un 14 a un 100%, mientras que la especificidad oscila entre el 34 al 100%. Se ha descrito que entre la población sana la seroprevalencia de IgG es del 66%. (63). Los test comerciales para IgG e IgM, con respecto a los test de laboratorio, presentan peor sensibilidad (82 frente 93%) y especificidad (28 frente a 67%), (61)

La utilización de test Western Blot (WB), está recomendada en el serodiagnóstico de infección por *B. henselae* en gatos, si bien su fiabilidad tiene que ser todavía más investigada ya que, en la especie humana, se ha observado una importante variabilidad de resultados del test. (33, 39).

c) Detección de ADN.

La PCR permite la detección de ADN del microorganismo mediante amplificación *in vitro* de un fragmento específico de este. Para ello, es necesario conocer al menos, parte de la secuencia de nucleótidos que queremos amplificar, por lo que es fundamental la elaboración de primers o cebadores específicos (secuencias de nucleótidos, con un grupo hidroxilo, complementarios a la hebra molde y que actuarán como punto de inicio para la replicación de dicha hebra. Son necesarios dos *primers*: uno en el extremo 3' y otro para el 5'. Existe una amplia gama de cebadores útiles para detectar ADN de *Bartonella* spp., algunos de ellos más específicos que nos permitirán diferenciar entre especies.

El ADN de *Bartonella* spp. ha podido ser amplificado en sangre felina (en EDTA), otros fluidos y en diferentes tejidos (35, 40, 42). Ensayos de PCR centrados en la región intergénica 16S-23S rRNA han permitido determinar la especie de *Bartonella* spp. en gatos infectados (11, 35, 42)

La realización de técnicas de PCR debe ser realizada por laboratorios especializados, requiere estrictos controles de calidad para evitar la aparición tanto de falsos positivos como de falsos negativos, puede ser cara de desarrollar y, actualmente, no está estandarizada entre los laboratorios.

La PCR en tiempo real (qPCR) aumenta la sensibilidad y tiene una menor probabilidad de contaminación.

VI) TRATAMIENTO

VI-1) Tratamiento en gatos

El tratamiento de *Bartonella* spp. en la especie felina y canina continua siendo un tema controvertido ya que, hasta la fecha, no se ha podido demostrar la eficacia de los antibióticos testados en ambas especies para el control de la infección a largo plazo. Se ha observado que tanto los individuos tratados como los no tratados eran negativos a bacteriemia tras el mismo periodo de tiempo. En dicho estudio los antibióticos testados incluían Eritromicina (11-22 mg/kg/oral cada 8 horas), Amoxicilina (11- 22 mg/kg cada 8 h) y tetraciclina hidrocloruro (13,75 mg/kg cada 6 horas). La Doxiciclina (4-12 mg/kg, PO, cada 12 h) también ha sido testada como tratamiento de la Bartonelosis, si bien no ha demostrado una gran eficacia en cuanto a su capacidad para disminuir el tiempo de duración de la bacteriemia. (33)

En los últimos años, se ha recomendado la utilización de Azythromycina (a dosis variables) en el tratamiento de perros y gatos infectados a pesar de no existir estudios de eficacia controlados durante largos periodos de tiempo. Se trata de un macrólido con una buena capacidad de penetración intracelular y un amplio espectro antimicrobiano, a lo que habría que añadirle lo que parece ser una importante actividad inmunomoduladora y antiinflamatoria (46). Estas propiedades impiden determinar con exactitud los efectos beneficiosos informados tras el tratamiento con este antibiótico en la especie felina, ya que se desconoce si estos estarían relacionados con su acción directa frente a *Bartonella*, son el resultado de su acción sobre otras bacterias, son debidas al resto de las propiedades mencionadas o es debido a una combinación de todas ellas.

Por todo ello será conveniente aplicar únicamente el tratamiento antibiótico en aquellos pacientes positivos a la infección y que, además, muestren signos clínicos, a fin de evitar la aparición de resistencias.

VI-2) Tratamientos probados y recomendados en la Especie humana, según el cuadro clínico observado

El tratamiento de *Bartonella* spp. continúa siendo un auténtico reto para la medicina humana debido a la elevada persistencia de la infección. La existencia de una fase intraeritrocítica proporciona al microorganismo un lugar donde protegerse de la respuesta inmune, favoreciendo el desarrollo de recaídas. Además, la diversidad de formas clínicas descritas, que depende de la especie de *Bartonella* spp. involucrada entre otros factores, junto a la escasez de ensayos clínicos realizados, dificulta el establecimiento de protocolos antibióticos eficaces frente a la Bartonellosis. En consecuencia, el tratamiento de las infecciones por *Bartonella* debería adaptarse a la especie de *Bartonella* involucrada y a la forma clínica presentada.

Los datos clínicos relacionados con el tratamiento de las infecciones causadas por esta bacteria se basan en estudios realizados con un número limitado de pacientes. En la Tabla 3 se exponen algunos de los tratamientos descritos en base a la Patogenicidad de *Bartonella* spp.

TABLA 3: tratamientos descritos en base al cuadro clínico producido por *Bartonella* spp. (extraída de la revisión de Angelakis E. y col., 2014 (4))

Patogenicidad	Agente de <i>Bartonella</i>	Manifestaciones clínicas	Tratamiento	Duración
Manifestaciones locales	<i>B. henselae</i> , <i>B. quintana</i> , <i>B. alsatica</i> , <i>B. claridgeiae</i>	Linfadenitis	No tratamiento	
		CSD atípico	Neurorretinitis Doxicilina (200mg/día) + Rifampicina (600 mg/ día)	4-6 sem.
Parasitismo intraeritrocítico	<i>B. bacilliformis</i>	Fiebre de Oroya	Hepatoesplénica Rifampicina 20mg/kg/día sola o con gentamicina (3mg/kg/día)	4-6 sem.
			Chloranfenicol (50 mg/kg/día durante 3 días y después 25 mg/kg/día hasta completar los 24 días)	2 sem.
Endocarditis	<i>B. quintana</i> <i>B.henselae</i> , <i>B. rochalimae</i> , <i>B. vinsonii</i> subsp. <i>arupensis</i> , <i>B. vinsonii</i> , <i>B. melophagi</i> ,	Fiebre de las trincheras	En gestante Chloranfenicol (50- 100mg/kg/día) y penicilina G(50000-100000 UI/Kg/día)	2 sem.
			Gentamicina (3mg/kg/día durante 2 sem.) y Doxiciclina (200mg/día durante 4 sem) Gentamicina (3mg/kg/día durante 2 sem) y doxicilina (200mg/día durante 4 sem)	6 sem.
Lesiones angioproliferativas	<i>B. bacilliformis</i> , <i>B. ancashi</i>	Verruga peruana	Gentamicina (3mg/kg/día durante dos sem.) y Doxiciclina (200mg/día durante 6 sem.)	6 sem.
			Rifampicina (10mg/kg/día) (Dosis máx. en niños: 600mg/día) Streptomicina (15- 20mg/kg/día) Eritromicina (2gr./día) o doxicilina (200mg/día)	2-3 sem.
	<i>B. quintana</i> , <i>B. henselae</i>	Angiomatosis bacilar, peliosis bacilar	Complicado Doxiciclina (20mg/día) + Rifampicina (600mg/día)	3 meses
			No complicado Eritromicina (2g /día) o Doxiciclina (200mg/día)	3 meses
		Recaídas		2-6 meses

VII) PREVENCIÓN

Como se ha ido comentando hasta ahora, los reservorios y vectores de *B. henselae* juegan un papel transcendental en la epidemiología de la infección por *Bartonella*. Por ello, las medidas más importantes encaminadas a disminuir la prevalencia de esta bacteria y su transmisión a la especie humana tienen que ir destinadas a controlar los nichos de infección (15).

La eliminación de los artrópodos que parasitan a estos animales, como la pulga del gato o las garrapatas, mediante pautas de desparasitación externa adecuadas (15) y poner en práctica las medidas de higiene oportunas (lavar las manos con agua y jabón después de tocar a nuestras mascotas y desinfectar posibles heridas causadas por araños o mordiscos), son los pilares fundamentales para impedir o controlar la transmisión de la infección a las personas. Dado el desconocimiento que rodea todavía a la epidemiología de *B. henselae*, serían necesarios un mayor y más amplio número de estudios que permitan identificar otros posibles vectores y reservorios de la infección, a fin de disminuir o limitar su prevalencia y propagación, con las medidas de control oportunas (63).

Se ha comprobado que *B. henselae* y *B.clarridgeiae* pueden ser transmitidas al transfundir sangre procedente de gatos bacteriémicos a gatos sanos. Es importante que el veterinario se conciencie y se asegure de que la transfusión de gatos o perros debe realizarse a partir de animales seronegativos o con cultivo negativo a *B. henselae*, y debe evitar utilizar sangre de animales de los que se desconoce su status de infección para este microorganismo (62). Además, se desconoce el tiempo de supervivencia de la bacteria en sangre felina o canina (en el ser humano perdura durante 35 días) por lo que convendría incrementar las medidas de control en este tipo de productos (63).

El incremento experimentado durante este siglo y el pasado en el número de perros y gatos adoptados como mascotas en el primer mundo, supone un aumento en el número del principal reservorio de *B. henselae* y, por lo tanto, la principal fuente de contagio para la especie humana. Sin embargo el importante papel que juegan en la Sociedad, por su inestimable labor de compañía e incluso su conlleva que no se contemple como medida de prevención el control de la relación de contacto entre estos animales y las personas de su entorno, pero sí es necesario concienciar a la población de los riesgos que entraña esta enfermedad y de sus mecanismos de transmisión, pero siempre desde un punto de vista no alarmista. Se debe informar desde el ámbito médico y veterinario a los propietarios de mascotas y demás personas del entorno directo de estos animales, en

especial a aquellas poblaciones de riesgo, como individuos inmunodeprimidos, personas que viven en la calle o toxicómanos, con objeto de disminuir la incidencia de CSD, así como evitar la aparición de formas clínicas graves de la enfermedad como la Angiomatosis bacilar (14, 48).

Hasta la fecha, no se ha conseguido desarrollar una vacuna efectiva que evite la propagación y disminuya la prevalencia de *Bartonella* spp. en nuestros animales de compañía. La enorme capacidad de recombinación genética que presenta esta bacteria, que determinan constantes alteraciones en sus proteínas de membrana (7, 56), su condición intracelular y la amplia variedad de especies que pueden afectar a estos animales, ha impedido encontrar una vacuna eficaz.

Se ha documentado el desarrollo de una posible vacuna basada en la utilización de una proteína recombinante sintetizada a partir de la secuencia génica p26, altamente conservada entre *B. henselae*, *B. claridgeiae* y *B. koehlerae*. Se pudo comprobar que los gatos desarrollaban anticuerpos anti-p26 y que esto podría suponer una potencial herramienta diagnóstica para la detección de *B. henselae* pero no se consiguió una inmunización adecuada que proporcionara una protección inmune frente a la bacteria.
(28)

OBJETIVOS

Recientemente, el autor de este trabajo contrajo la Enfermedad del Arañazo del Gato (CSD) debido a la mordedura producida por un gato cuando era manejado en el Hospital Veterinario de la Universidad de Zaragoza (HVUZ). A partir de este hecho se planteó la posibilidad de evaluar la importancia que tiene esta zoonosis felina en la transmisión a las personas que manejan gatos callejeros o de sanidad desconocida de Zaragoza.

En consecuencia se han establecido los siguientes objetivos:

- Detectar la prevalencia de ADN de *Bartonella* spp. en muestras orales de gatos procedentes de colonias callejeras y del Centro de Protección Animal de Zaragoza.
- Analizar la posible asociación entre la prevalencia y los datos, intrínsecos, extrínsecos y patológicos recogidos de los animales analizados.
- Conocido el riesgo de infección para las personas que los manejan se establecerán pautas de prevención frente a la transmisión de la infección para su aplicación en desempeño de la clínica diaria.

METODOLOGÍA

1- Población felina del estudio y procesado de la muestra:

Las muestras orales fueron recogidas de 47 gatos de distinto sexo y edad que llegaron al Hospital Veterinario de la Universidad de Zaragoza procedentes de colonias callejeras y del Centro de Protección Animal de la localidad de Peñaflor (Zaragoza) con objeto de ser esterilizados y/o tratados de diferentes patologías.

La obtención de la muestra de saliva se realizó mediante un hisopado de la zona gingival, sublingual y, en el caso de que existieran, lesiones orales presentes en la mucosa oral del gato, para lo cual se utilizaron dos hisopos previamente esterilizados. La toma de muestras se realizó con los animales sedados y el hisopado se realizó de una forma lo más cuidadosa y limpia posible. Los hisopos eran depositados en el interior de un tubo de Eppendorf para posteriormente ser conservados en congelación a -20 °C hasta su análisis.

En cada gato se registró la fecha de colección de la muestra y se recogieron datos específicos en cada animal: edad aproximada o conocida, sexo, raza, estado clínico (peso corporal, patologías que presenta y presencia de lesiones bucales), infestación por pulgas u otros parásitos.

2.- Protocolo de extracción del ADN:

La extracción del ADN se realizó mediante el Kit comercial UltraClean BloodSpin DNA Isolation Kit. Para ello se utilizó el protocolo dispuesto por la casa comercial.

2-2 Técnica de PCR para la detección del ADN de *Bartonella* en muestras orales:

El DNA extraído fue analizado mediante la técnica de real time- PCR con el fluoróforo SYBR- Green I. Con objeto de determinar la presencia de ADN de *B. henselae*, se utilizó un par de primers específicos (tabla 4) de la región intergénica 16S-23S rDNA.

TABLA 4

Referencia	Secuencia 5'-3'	Gen	Posició n	Amplicó n	Diseñ o
B_hen F	TGTCATCAGAAAGGGCTATT	16S- 23S IS*	1115	183 pb	Alquiz vetek
B_hen R	CAAAACAAAGTGCAAAACA A		1298		
Felis_Acti n F	CTGGATTTCAGCAGGAGAT	B- Actin a	473	203 pb	
Felis_Acti n R	TCAACGTCACACTTCATGAT		675		

*: espaciado intergénico 16S-23S.

Leyenda: **pb**: pares de bases)

Los cebadores arriba mencionados se han diseñado mediante el programa bioinformático “Primer3” (Primer3web versión 4.0.0, <http://primer3.ut.ee/>) y contrastado mediante el programa informático del Centro Nacional para la información Biotecnológica (NCBI) llamado *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST). Se trata de un programa basado en el alineamiento de secuencias de tipo local. De esta manera, se comprueba qué secuencias amplifican nuestra pareja de cebadores y que porcentaje de alineamiento poseen las secuencias descritas para este agente patógeno. Posteriormente, se ha seleccionado una cepa bacteriana de referencia, *Bartonella henselae* ATCC 49882D-5™, para realizar todo el protocolo de estandarización y puesta a punto de la técnica. La pareja de cebadores de β-Actina (“gen housekeeping”) (tabla 4) se han utilizado como control endógeno de nuestras reacciones para garantizar la fiabilidad de los resultados emitidos así como para poder realizar una comparación relativa basada entre el número de copias del tejido y el patógeno presente en él.

Todo este desarrollo se ha llevado a cabo por el de diagnóstico de biología molecular Alquiz vetek S.L. (Zaragoza, España)

El protocolo de amplificación de la PCR cuantitativa para *Bartonella henselae* se realizó en un volumen de 20 µl por reacción. En cada reacción, se añadieron 10 µl de GoTaq qPCR Master Mix 2x® (código A6002), 9µl de agua libre de nucleasas (NFW) de la casa comercial Promega, 0,5 µM de cada cebador y 2,5 µl de DNA extraído. Además, de cada reacción se realizaron diluciones (1:10) de todas las muestras para observar posibles inhibiciones ocurridas en el proceso de extracción del DNA.

El programa empleado en el laboratorio para la detección de *Bartonella henselae*, mediante el termociclador CFX Connect 96™ de la casa comercial BIORAD, ha sido el siguiente:

PCR a Tiempo Real			
	Temperatura	Tiempo	Repeticiones
1º Paso	95°C	7 minutos	
2º Paso	55°C	20 segundos	
3º Paso	72°C	20 segundos	x 44
4º Paso	79°C	FOTO	
5º Paso	94°C	15 segundos	
Paso (Curva de fusión)	94 °C 65°C 95 °C y 4° C	20 segundos 5 segundos En espera	

La interpretación de los resultados se ha llevado a cabo mediante el programa CFX Manager Software™ de la casa comercial BIORAD versión 2.1

“Para finalizar se realiza un paso adicional al final del proceso para verificar la especificidad del producto, este paso se denomina curva de disociación o fusión.”

La amplificación del fragmento de ADN de *B. henselae* y de la β-Actina de todas aquellas muestras positivas fue repetida 6 veces, con objeto de obtener un valor medio de Ct para ambas variables.

En el ensayo se incluyó un control positivo, con DNA de *B. henselae* purificado, y un control negativo.

El número de copias inicial del ADN de *B. henselae* detectado fue calculado aplicando los fundamentos de la PCR en tiempo real, a partir de los cuales obtenemos la fórmula (53):

$$\text{Nº copias de ADN de } B. henselae \text{ en la muestra} = 2^{(39 - Ct)} \times 80$$

En el caso de la β-Actina, se ha comprobado la existencia de dos copias del gen dentro del genoma, por lo que, para obtener una estimación del número total de células eucariotas presente en la muestra, será importante dividir entre 2 la cantidad total de copias detectadas inicialmente. (36) De esta forma, la fórmula aplicada para determinar el N° inicial de copias del ADN de β-Actina será:

$$\text{Nº inicial de copias del ADN de } \beta\text{-Actina} = 2^{(39 - Ct)} \times 40$$

Con objeto de valorar la calidad del ADN extraído, se sometió a todas las muestras a un control mediante el sistema BioDrop µLITE, (LABTECH) que permitió cuantificar la concentración de ADN y su grado de pureza mediante la determinación del ratio de absorbancia a 260 nm y 280nm.

3- Análisis Estadístico

Los datos intrínsecos y extrínsecos y patológicos recogidos en cada gato, han sido introducidos en la base de datos Excel (Microsoft office). Estos datos han sido tratado estadísticamente con el programa Epi-info StatCalc, vers, 3.5.3 del 2011, de uso libre y producido por el Center for de Diseases Control and Prevention, Atlanta GA, USA).

Se ha calculado las frecuencias de prevalencia en relación a los datos recogidos. La posible asociación entre estas prevalencias y los factores identificados se han analizado el test de contingencia chi-cuadrado o el test exacto de Fisher.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1) Sobre la técnica de detección de ADN empleada

La técnica PCR ha sido utilizada en ensayos recientes, para detectar la presencia de ADN de *B. henselae* en muestras orales felinas, (24, 38, 41, 45, 47, 49).

En este estudio se ha utilizado la técnica de PCR a tiempo real para la detección y cuantificación del genoma de dicha bacteria mediante el uso del fluoróforo SYBR Green I. Para ello, se han utilizado una pareja de cebadores que amplifica la región intergénica 16S-23S rRNA de *B. henselae*. La selección de este gen pone de manifiesto que se trata de una secuencia genómica, específica y de elección por muchos miembros de la comunidad científica (9, 35, 44).

Un método de detección similar al que se ha llevado cabo en este trabajo se encuentra implementado y patentado en el Instituto de Salud Carlos III de Madrid. Este análisis se basa también en la región intergénica 16S-23S rRNA de *B. henselae* (31)

2) Sobre el significado de la detección de ADN en muestras orales

Es reconocido por diferentes autores (27, 41, 45), que la detección de ADN de *Bartonella* spp. en muestras orales no es equiparable a la detección de la bacteria viva. La presencia del ADN de *Bartonella* spp. en la cavidad oral podría tener su origen en el comportamiento del gato, que normalmente lame su piel de forma persistente ya sea por sentir dolor, picor, escozor, o al acicalarse diariamente. En este proceso, el gato puede ingerir las heces de la pulga *C. felis* que podrían contener *Bartonella*, ya que se ha encontrado niveles altos de presencia de este microorganismo en ellas (49).

Shaw et al 2004 detectan un 22,8% de ADN de *B. henselae* y 19,6% de *B. clarridgeiae* en pulgas, mientras Lappin y Hawley, en un estudio realizado en 2009 (41), con gatos salvajes en Florida, Alabama y Colorado (EEUU), encontraron el ADN de *B. henselae* en los 10 grupos de pulgas que obtuvieron a partir de los gatos del estudio. Además *Bartonella* sobrevive 3 días en las heces, por lo que daría tiempo a que la bacteria fuera ingerida y depositada en la cavidad oral en los lamidos (30).

Por otro lado, es importante tener en consideración que se han encontrado eritrocitos infectados en la boca de gatos con o sin lesiones bucales (41), y estos también podrían ser el origen del ADN detectado.

Tabla 5: Carga de partículas por cada mil células eucariotas orales en relación con la presencia de ectoparásitos externos, en los gatos ADN positivos del estudio.

Ref.	Ectoparásitos	Ct (media)	Actina (media)	Partículas de <i>B. henselae</i> / 1000 células	Calificación carga*
22/14	Pulgas	36,5	26,9	2,67	Baja
16/14	-	35,2	27,25	8,32	Baja
5/14	Pulgas	33,6	25,79	8,79	Baja
8/14	Heces pulgas	36,6	28,82	9,03	Baja
17/14	Pulgas	35,2	27,42	9,16	Baja
13/14	Ácaros en orejas, pulgas	37,5	30,02	10,97	Baja
36/14	Pulgas	36,9	29,53	12,26	Baja
18/14	Pulgas, garrapatas	35,2	27,94	12,87	Baja
33/14	Pulgas	36,7	30,14	21,05	Baja
19/14	Pulgas	35,6	29,78	36,40	Baja
46/14	-	36,9	31,74	51,51	Baja
12/14	-	35	31,69	196,14	Baja
48/14	Pulgas	35,7	34,54	907,52	Alta

(*) La calificación de la carga se ha realizado de forma arbitraria ya que no hemos encontrados datos sobre la misma en la bibliografía. Se ha considerado los valores inferior y superior encontrados y la diferencia se ha dividido por 2, esto da un punto medio de 453,93 partículas por cada mil células, de modo que las cargas inferiores los hemos considerado “bajas” y la superior, “alta”.

La carga de partículas de *B. henselae* calculada está comprendida entre 8,79 y 196,14 por cada 1000 células eucarióticas en 12 muestras orales y en una muestra se han detectado 907,52 por cada 1000 células. En consecuencia, la mayoría de los gatos ADN positivos (92,31%) presentaban una carga baja de partículas, y un gato (7,69%) presentaba una carga alta de partículas (Tabla 5)

Hasta la fecha y por lo revisado en la bibliografía, no se ha establecido una carga mínima de *B. henselae* en cavidad oral, que pueda ser considerada como la mínima dosis infectante para la especie humana, máxime si se considera que la capacidad de inducir un proceso patógeno en las personas agredidas está muy determinada por el estado inmune del receptor de la agresión (4, 5, 6).

En 9 de los 12 gatos con carga baja (75,00%), se detectaron pulgas y/o heces de pulgas en su piel, mientras que en 3 de ellos no se observaron. El gato con mayor carga microbiana en saliva era portador de pulgas. (Tabla 5).

Las posibles fuentes de este ADN en la cavidad oral de los gatos son, principalmente el depósito de pulgas y heces de pulgas tras el lamido (que es lo que se considera más probable) (24, 38, 41, 47, 49,), y la presencia de eritrocitos infectados en caso de ser gato bacteriémico.

En una mayoría de los gatos había pulgas y/o heces, por lo que el origen podría ser ese, pero en 3 gatos no se detectaron estos parásitos ni sus heces. Los tres gatos en los que no había pulgas y/o sus heces, se podría sospechar que se trata de gatos bacteriémicos de *B. henselae*, y también podía sugerir que los eritrocitos infectados se debieran a la presencia de lesiones orales, sin embargo solo uno de los gatos (nº 5/14) mostraba gingivoestomatitis.

Diferentes autores también han fallado en encontrar la correlación entre bacteriemia y lesiones orales, o la presencia de ADN en muestras orales y lesiones orales, pero se han encontrado hematíes infectados en gatos con boca sana, por lo que no se puede descartar la posibilidad de que los gatos sin pulgas y heces sean bacteriémicos (27, 41, 45). En consecuencia, podemos decir que nuestros resultados están dentro de los hallazgos contradictorios que ocurren en esta infección felina.

Sea cual sea el auténtico origen del ADN de *B. henselae* detectado, significa que los gatos positivos son un riesgo potencial de transmisión para las personas que se relacionan con ellos. En este caso, son gatos que se reciben periódicamente en el Hospital Veterinario de la Universidad de Zaragoza, debido al acuerdo establecido con el Ayuntamiento para esterilizar y cuidar las colonias de gatos callejeros, y los que llegan al Centro de Protección Animal de Peñaflor. Estos datos deberían ser extrapolados también a los gatos domésticos, principalmente los de origen rural o con acceso al exterior en cuanto a las medidas de control y prevención a tomar.

3) Sobre la frecuencia global de ADN de *B. henselae* en muestras orales de la población en estudio

En el total de los 47 gatos que integran el estudio, se ha detectado ADN de *B henselae* spp. en 13 muestras orales, lo que representa un 27,66%.

Las muestras orales han sido analizadas mediante técnica PCR habitualmente, dada la dificultad de conseguir el aislamiento a partir de ellas, en parte debido a la escasa dosis de *Bartonella* spp. esperable en esas localizaciones y la escasa sensibilidad de los diferentes métodos de cultivo para conseguirlo (24, 38, 41, 45, 47, 49)

En términos generales, se han hallado valores de ADN en muestras orales que oscilan desde un 4,8% (24), hasta un 44,1% en gatos salvajes o 43,5% en saliva de gatos de compañía en Corea (posteriormente identificada como *B. henselae*) (38).

Un estudio realizado con gatos salvajes de Alabama, Florida y Colorado en los EEUU de América, indicaba que no se encontró ADN en ninguna de las muestras (sangre, piel, gingivales y almohadillas plantares) en Colorado (n=32), mientras que detectaron una media del 17,6% en muestras orales en los gatos de Alabama y Florida (n=51). (98). En gatos de albergue, del Norte de California, se detectó una media del 38% (45); en Italia, hasta un 60% de gatos tenían ADN en saliva (47, 49) encontraba una media de 11,1%.

Observando estos datos, se puede decir que nuestros resultados arrojan un valor medio de prevalencia de ADN de *B. henselae* en muestras orales de la población del estudio y que las variaciones en la prevalencia con respecto a los resultados de otros autores pueden deberse al origen geográfico ya que las temperaturas cálidas y la humedad alta favorecen una mayor o menor presencia de *C. felis* en la población felina, o al tipo de vida de los gatos, e incluso las técnicas utilizadas en su detección, tal como indican otros autores (24, 38, 41, 47, 49)

4) sobre la posible asociación entre los datos de los gatos del estudio y la prevalencia de ADN en muestras orales

Al evaluar los resultados del conjunto de los datos (tabla 5), se analizó la posible asociación entre los datos recogidos de los gatos del estudio y la presencia de ADN en muestras orales.

En todos los análisis, alguna de las celdas de la tabla de contingencia contenía menos de 5 animales, de modo que se ha usado el test exacto de Fisher para evaluar la asociación. En ninguno de los análisis se observó un valor de “p”, inferior a 0,05, de lo que se deduce la ausencia de asociación estadísticamente significativa, e indicaría que ninguno de los factores analizados influyó en la presencia de ADN de *B. henselae* en las muestras orales de la población estudiada.

Tabla 6: Porcentaje de gatos ADN positivos y negativos a *B. henselae* en muestras bucales respecto al total de animales del estudio (n=47)

Factores	Grupos	ADN Positivo	ADN Negativo	Valor P (Fisher exact p)
Grupo edad	Joven Adulto	2 (4,25%) 11 (23,40%)	7 (14,89%) 27 (57,45%)	0,5196 (F)
Sexo del gato	Hembra Macho	9 (19,15%) 4 (8,51%)	23 (48,94%) 11 (23,40%)	0,6037 (F)
Mes extracción (*)	Junio Julio	9 (19,15%) 2 (4,25%)	20 (42,56%) 10 (21,28%)	0,2962 (F)
Origen	Colonia Protectora	11 (23,40%) 2 (4,25%)	30 (63,83%) 4 (8,51%)	0,5379 (F)
Pulgas/heces de pulga	SI NO	9 (19,15%) 4 (8,51%)	25 (53,19%) 9 (19,15%)	0,5175 (F)
Signos clínicos	SI NO	2 (4,25%) 11 (23,40%)	12 (25,53%) 22 (46,81%)	0,1646 (F)
Lesion boca	Sana Lesion	12 (25,53%) 1 (2,13%)	27 (57,45%) 7 (14,89%)	0,2801 (F)

(*): en el mes de Mayo solo se recogieron muestras de 6 gatos, por lo que el análisis estadístico se realizó con Junio y Julio que reunían a la mayoría de los gatos muestreados (n=41).

Tabla 7: Porcentaje de ADN positivo y negativo a *B. henselae* en muestras orales en relación al número de gatos evaluado en cada factor

Factores	Grupos	ADN Positivo	ADN Negativo
Grupo edad	Joven (n=9) Adulto (n=38)	2 (22,22%) 11 (28,95%)	7 (77,78%) 27 (71,05%)
Sexo del gato	Hembra (n=32) Macho (n=15)	9 (28,13%) 4 (26,67%)	23 (71,87%) 11 (73,33%)
Mes extracción	Mayo (n=6) Junio (n=29) Julio (n=12)	2 (33,33%) 9 (31,03%) 2 (16,67%)	4 (66,67%) 20 (68,97%) 10 (83,33%)
Origen	Colonia (n=41) Protectora (n=6)	11 (26,83%) 2 (33,33%)	30 (73,17,%) 4 (66,67%)
Pulgas/heces de pulga	SI (n=34) NO (n=13)	9 (26,47%) 4 (30,77%)	25 (73,53%) 9 (69,23%)
Signos clínicos	SI (n=14) NO (n=33)	2 (14,29%) 11 (33,33%)	12 (85,71%) 22 (66,67%)
Lesion boca	Sana (n=39) Lesion (n=8)	12 (30,77%) 1 (12,50%)	27 (69,23%) 7 (87,50%)

Aunque ninguna de las asociaciones analizadas ha sido estadísticamente significativa, comentamos los datos de prevalencia observados en cada uno de los factores analizados, (tabla 7):

- Los gatos **adultos** presentaban un prevalencia de casi un 29 %, siendo 6 puntos más alto que en jóvenes.

- La prevalencia de ADN positivos apenas es diferente entre **machos y hembras** siendo entre 27-28%.
- En el **mes** de Julio se han observado casi la mitad de gatos positivos que en Mayo y Junio que están alrededor del 33%.
- Los gatos de la **Protectora** de Peñaflor tenían una prevalencia de positivos del 33%, siendo superior en casi 7 puntos a la de los gatos de **colonias** callejeras.
- Los gatos ADN positivos **parasitados** por pulgas y/o presentara heces de pulgas en su piel, en el momento del muestreo, presentan una frecuencia 4 puntos inferior que los que no tenían pulgas o heces de pulga, que es próximo al 31%.
- Los gatos **con signos clínicos** tenían una prevalencia de ADN de *B. henselae* que equivalía a menos de la mitad de la observada en los gatos sin signos clínicos en los que se ha obtenido un valor algo superior al 33%
- Finalmente, la diferencia entre los gatos con **boca sana**, respecto a los que presentaban lesiones bucales, ha sido la más marcada dentro de los factores estudiados, de modo que los gatos con boca sana tenían alrededor de 2,5 veces más prevalencia de ADN de *B. henselae* en las muestras orales que en los gatos con boca con lesión (casi 31% respecto a 12,50%, respectivamente).

Los datos de los que se dispone respecto a la correlación entre factores y positividad son muy dispares y, muy posiblemente, están influenciados por variables que no se tienen en cuenta en los estudios. Así se ha observado resultados como estos:

En relación con la **edad**, en las personas se han observado más casos de CSD en niños y jóvenes que en adultos, (52) En relación con los gatos, en un estudio realizado en Connecticut, se encontró una fuerte asociación de la presencia de CSD en las personas que convivían con gatos de 12 meses o menores (16).

En este sentido, nosotros hemos encontrado valores de ADN de *B. henselae* ligeramente superiores en los gatos adultos respecto a los jóvenes, aunque la diferencia no es significativa, sin embargo, un gato ADN positivo en muestras orales es un transmisor potencial de *B. henselae*, pero que para que ocurra esa transmisión, el carácter del gato y su comportamiento podrían ser determinantes. Es bien conocido el carácter alegre y juguetón de los gatos jóvenes y que la mordedura y araños forman parte de sus juegos, favoreciendo esa transmisión. Con este planeamiento, también podría sospecharse que el comportamiento de los niños y jóvenes pudiera ser un factor favorecedor para establecer ese tipo de relación con los gatos.

En relación a la prevalencia de ADN de *B. henselae*, en muestras orales encontrada en **hembras y machos**, Pennisi y col., en el año 2010 (47), tampoco encontró diferencias significativas. En principio, ambos sexos pueden ser parasitados por pulgas, y no parece haber ningún motivo para que exista diferencia en la prevalencia de infección.

Respecto a la prevalencia de ADN de *B. henselae* en muestra oral de **gatos callejeros o de protectora**, no hemos encontrado estudios que hagan esta misma distinción. Generalmente se han diferenciado los gatos de compañía de los salvajes y de albergue. Lappin y Hawley, en el año 2009 (41) encontraron valores del 44,1% ADN positivo de *B. henselae* en gatos salvajes de Corea, y Nakemata y col. en 2010 (45) encontró un 38,3% en gatos de albergue ADN positivo de *B. henselae*, en el Norte de California. En una mezcla de gatos callejeros, de albergue, salvajes y domésticos del Sur de California, Quimby y col., en el año 2009 (49), determinó una prevalencia media de 11,1% de ADN de *Bartonella* spp. Nosotros hemos encontrado un 26,83% ADN positivo de *B. henselae*, en los gatos de colonias callejeras y un 33,33% en los de Protectora, son valores más próximos a los encontrados por Nakemata y col. en 2010 (45) en el Norte de California. En todos estos estudios se remarca la zona geográfica en la que se hace el estudio por la importancia que pudiera tener a la hora de favorecer o no la presencia de pulgas (u otros artrópodos hematófagos) en el entorno de los gatos.

En los 3 últimos días de **Mayo** (28 a 31) y en **Junio**, la prevalencia de gatos con ADN positivo de *B. henselae* en muestras orales ha sido el doble (media 32,18%) que en **Julio**. Como ya se ha comentado en párrafos anteriores, la presencia de pulgas en el medioambiente aumenta en épocas cálidas y húmedas. Observando el histórico de T^a y Humedad de esas fechas (datos del aeropuerto de Zaragoza) vemos:

Mes	T ^a media	Humedad relativa (%)	Precipitaciones (mm)
Mayo	16,9° C	51,7	16
Junio	22,2° C	48,5	29,71
Julio	22,8° C	51,8	13,2

La T^a de supervivencia de *C. felis*, tanto para los huevos como los adultos está comprendida entre los 13 y 32°C, mientras que el tiempo invertido en el desarrollo de las pulgas en esas condiciones puede variar de 14 a 140 días. Para llegar al desarrollo completo necesitan una humedad relativa comprendida entre el 50 al 92%. La longevidad aumenta con el aumento de la Humedad relativa y el descenso de la T^a, dentro de esos límites, (58)

Con estos datos, se puede decir que en Mayo y Julio, se cumplían las condiciones necesarias para que las pulgas se desarollen y se establezcan en el gato y su entorno, sin embargo, Junio ha sido seco y no alcanzaba la humedad relativa media. Sin embargo, y aunque no haya asociación estadística, no encontramos justificación para la diferencia observada en la baja prevalencia del mes de Julio, salvo que el tipo de gatos que llegaron en esos días llevaran poco tiempo en la colonia o la protectora, se tratase de gatos recientemente perdidos, que haya gatos de colonias que vivan en zonas cercanas a ríos, etc.

La ausencia de correlación en nuestro estudio, entre la presencia de **pulgas o heces de pulgas** en el gato y la positividad al ADN de *B. henselae* en muestras orales, no es un resultado extraño, ya que otros autores han encontrado resultados similares, como ya se ha comentado en el párrafo "2". Así Lappin y Hawley, en el año 2009 (41), encontraron que la presencia de ADN de *Bartonella* spp. en sangre de gatos salvajes de Alabama y Florida, era independiente de que los gatos estuvieran infestados con *C. felis*.

Sin embargo, es frecuente relacionar la presencia de pulgas con la infección dado que se admite que es la pulga, generalmente, la que transmite *Bartonella* spp. entre los gatos. Además, como ya se ha comentado en párrafos anteriores, *Bartonella* spp. resiste 3 días en las heces de la pulga (29), tiempo que favorecería la contaminación de la boca cuando se lamen y acicalan.

Otros estudios detectan asociación entre la presencia de pulgas y la presencia de ADN en sangre del gato. El mismo Lappin y col., en 2006 (40), encontraba una prevalencia de *B. henselae* en gatos del 34,8% y en sus pulgas en un 22,8%, y *B. clarridgeiae* en un 20,7% y un 19,6% respectivamente. Esto mismo fue observado por Shaw y col. en 2004 (57), sin embargo ninguno de ellos analizó la relación de la presencia de pulgas o sus heces con la presencia del ADN en la boca de los gatos.

Como se ha comentado en el párrafo "2" de esta discusión, otra posible fuente del ADN de *B. henselae* en la boca del gato es que la sangre del gato infectado esté presente en su boca. Por esta razón, se han realizado estudios que intentaban demostrar la relación entre la presencia de **lesiones bucales** y la prevalencia de ADN en las muestras orales. Nosotros no hemos encontrado esa asociación, más bien al contrario, porque aun no siendo significativa la diferencia encontrada, la prevalencia de ADN en gatos con boca sana (31%) es 2,5 veces superior a los de los gatos con lesiones bucales.

Namekata y col., en 2010 (45), no encontró correlación entre la bacteriemia y la presencia de lesiones orales en los gatos de albergues del Norte de California y tampoco

entre la detección ADN en muestra orales y la presencia de lesiones orales, al igual que ha pasado en nuestro estudio. Este dato también sería similar a lo observado por Dowlers y col. en el año 2010 (27), los cuales no hallaron asociación entre la presencia de gingivoestomatitis y la presencia ADN de *B. henselae*, siendo un 11,4% (8/70) en los gatos con lesión, frente a un 8,2% encontrado en gatos con boca sana (5/6).

Si bien, se entiende que un gato bacterémico que tenga lesiones orales puede contaminarse la boca con eritrocitos infectados, también en el sentido contrario podríamos decir que un gato con lesiones bucales es posible que deje de lamerse y acicalarse, lo que impediría, en cierta medida, que la boca se contamine con pulgas y sus heces. Nuestros resultados apuntan en este sentido aunque debe comprobarse con estudios más amplios.

Igualmente llamativo ha sido lo encontrado en relación con la presencia de **signos clínicos** en el gato, (hemos encontrado en los gatos del estudio signos respiratorios superiores o inferiores, dérmicos, oculares, bucales, afección de mamas, miasis....). La prevalencia de ADN en los gatos sanos fue de un 33,33%, mientras que en los gatos con signos clínicos fue de un 14,29%. Estos resultados tampoco muestran asociación estadística, aun siendo contrarios a lo esperable.

Dada la patogenia de *Bartonella* spp. que es capaz de hacerse intracelular en células endoteliales e inducir angiogénesis en órganos internos (Peliosis hepatis), o en los vasos de la dermis (Verruga Peruana), algunos autores han buscado la posible asociación entre la presencia de lesiones dérmicas y la positividad a la infección, sin embargo, los resultados no ha sido concluyentes y sugieren la necesidad de continuar progresando en su estudio (3, 4, 18, 23, 41, 54). También se ha sospechado de que podía potenciar infecciones crónicas como en caso de coinfección con FIV (60), en el que se ha observado que podía favorecer el desarrollo de estomatitis o linfadenopatía, sin embargo, desconocemos si los gatos que han entrado en nuestro estudio estaban infectados con FIV, y nosotros hemos observado lo contrario, dado que hay más gatos positivos al ADN de *B. henselae* en muestra oral entre los gatos sanos (18, 23, 54).

CONCLUSIONES

1) La prevalencia de ADN de *Bartonella* spp. del 27,66% en muestras orales de los gatos del estudio, es lo suficientemente elevada como para poner en marcha medidas de control y prevención de la infección en la clínica diaria, tanto para el personal trabajador, como para la gente que manejan los gatos de la protectora y colonias callejeras y los adoptantes potenciales de esos gatos.

2) Medidas de control y prevención:

El principal inconveniente que limita las medidas de control sobre los gatos de colonia radica en el contexto en el que estos llegan al centro clínico. La mayoría de las ocasiones, se trata de animales que, antes de ser manejados por el personal veterinario, han tenido un contacto prácticamente nulo con personas y viven en total libertad en un ambiente poco controlable, por lo que establecer pautas de desparasitación adecuadas frente a artrópodos hematófagos es muy complicado. Sí podría ser interesante poner en práctica medidas de desparasitación externa en aquellos individuos procedentes del Centro de Protección animal ya que, en este caso, los animales permanecen en jaulas durante un cierto periodo de tiempo facilitando esta labor.

- Facilitar el manejo de estos animales al personal veterinario utilizando jaulas de captura que permitieran a la vez la contención de los animales. De esta forma, no sería necesario el traspaso de los gatos de una jaula a otra para poder inyectar los agentes anestésicos, lo que evitaría mordiscos o arañazos durante el transcurso de este.
- Poner en práctica medidas higiénico-sanitarias adecuadas durante y tras la manipulación de los animales. Será importante concienciar al personal que tiene contacto directo con los gatos de la necesidad de utilizar guantes durante el manejo del paciente y lavarse las manos con agua y jabón una vez finalizadas las labores con estos.
- Limpiar con abundante agua y desinfectar posibles heridas causadas por el arañazo o mordisco de los gatos durante su manipulación. La utilización de soluciones desinfectantes, como la clorhexidina o la povidona yodada, aplicadas sobre las posibles heridas causadas será fundamental para prevenir la infección.
- Favorecer las labores de manejo de los pacientes en la UCI una vez realizada la esterilización, castración o el procedimiento veterinario por el cual el animal ingresó en el centro. Adecuar las jaulas de hospitalización mediante sistemas de contención que permitieran manipular a los animales durante su ingreso hospitalario si fuera necesario.

- Concienciar al personal veterinario del riesgo de infección existente para evitar conductas despreocupadas que predispongan a araños o mordiscos. La mayoría de estos gatos son animales que no han tenido contacto nunca con las personas y que se encuentran en un ambiente tremadamente estresable, por lo que el miedo pudiera favorecer el desarrollo de conductas agresivas.
 - Evitar encarecidamente el contacto de estos animales con personas de riesgo. Será fundamental que todo aquel personal que pudiera presentar un estado inmunitario comprometido evite el manejo con estos pacientes o, al menos, extreme la precaución.
 - En aquellos animales que, dadas las circunstancias, vayan a ser adoptados o acogidos, una vez concluidas las labores para las que han sido examinados u hospitalizados, se establecerán las pautas de desparasitación adecuadas. Será importante concienciar a los futuros propietarios de la necesidad de establecer un protocolo de desparasitación periódico adecuado, en especial en aquellos animales que vayan a tener contacto con el exterior o convivan con otros animales que si lo tengan.
 - Lpiar, desinfectar y desparasitar adecuadamente las jaulas donde hayan permanecido ingresados estos animales, con el objetivo de evitar la transmisión de vectores potenciales a otros animales que pudieran ocupar estas jaulas posteriormente o con los que compartían hospitalización.
 - Informar al personal veterinario sobre la enfermedad con objeto de concienciarles sobre su importancia y permitir el reconocimiento de los síntomas en el caso de que esta se desencadenase.
 - Todas estas medidas serían aplicables también al manejo de todos aquellos gatos con propietario pero con un status sanitario desconocido o comprometido, en especial aquellos gatos no desparasitados adecuadamente y/o con contacto con el exterior.
- 3) La ausencia de asociación entre los factores estudiados y la prevalencia de ADN de *B. henselae* en muestras orales parece indicar que hay otros factores no contemplados que deben ser incluidos en el estudio. Estos, al menos, deberían estar relacionados con el comportamiento de los gatos y detalles del entorno y manejo que reciben.
- Los resultados de este estudio deben considerarse preliminares y serán continuados con la detección de ADN de *B. henselae* en sangre y aumentando el nº de muestras que permita realizar análisis más completos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Agan BK, Dolan MJ. Laboratory diagnosis of *Bartonella* infections. Clin Lab Med. 2002; 22: 937-62.
2. Angelakis E, Billeter SA, Breitschwerdt EB, Chomel BB, Raoult D. Potential fortick-borne bartonelloses. Emerg Infect Dis 2010; 16: 385–91.
3. Angelakis E, Lepidi H, Canel A, Rispal P, Perraudeau F, Barre I, Rolain JM, RaoultD. Human case of *Bartonella alsatica* lymphadenitis. Emerg Infect Dis 2008; 14: 1951–3.
4. Angelakis E, Raoult D. Pathogenicity and treatment of *Bartonella* infections. Int J Antimicrob Agents. 2014; 44: 16-25
5. Arvand M, Viezens J, Berghoff J. Prolonged *Bartonella henselae* bacteremia caused by reinfection in cats. Emerg Infect Dis. 2008; 14: 152-4.
6. Ayllon T, Diniz PP, Breitschwerdt EB, Villaescusa A, Rodríguez-Franco F, Sainz A. Vector-borne diseases in client owned and stray cats from Madrid, Spain. Vector Borne Zoonotic Dis. 2012; 12: 143-50.
7. Berghoff J, Viezens J, Guptill L, Fabbi M, Arvand M. *Bartonella henselae* exists as a mosaic of different genetic variants in the infected host. Microbiology. 2007; 153: 2045-51.
8. Birtles RJ, Harrison TG, Saunders NA, Molyneux DH. Proposals to unify the genera *Grahamella* and *Bartonella*, with descriptions of *Bartonella talpae* comb. nov., *Bartonella peromysci* comb. nov., and three new species, *Bartonella grahamii* sp. nov., *Bartonella taylorii* sp. nov., and *Bartonella doshiae* sp. nov. Int J Syst Bacteriol. 1995; 45: 1-8.
9. Birtles RJ, Hazel S, Bown K, Raoult D, Begon M, Bennett M. Subtyping of uncultured bartonellae using sequence comparison of 16 S/23 S rRNA intergenic spacer regions amplified directly from infected blood. Mol Cell Probes 2000; 14:79–87.
10. Bitam I, Dittmar K, Parola P, Whiting MF, Raoult D. Fleas and flea-borne diseases. Int J Infect Dis 2010; 14: e667–76.

11. Brunt J, Guptill L, Kordick DL, Kudrak S, Lappin MR; American Association of Feline Practitioners; Academy of Feline Medicine Advisory Panel. American Association of Feline Practitioners 2006 Panel report on diagnosis, treatment, and prevention of *Bartonella* spp. infections. *J Feline Med Surg.* 2006; 8: 213-26.
12. Bouchouicha R, Durand B, Monteil M, Chomel BB, Berrich M, Arvand M, Birtles RJ, Breitschwerdt EB, Koehler JE, Maggi R, Maruyama S, Kasten R, Petit E, Boulouis HJ, Haddad N. Molecular epidemiology of feline and human *Bartonella henselae* isolates. *Emerg Infect Dis.* 2009; 15: 813-6.
13. Bouhsira E, Fernandez Y, Liu M, Franc M, Boulouis HJ, Biville F. *Ctenocephalides felis* an in vitro potential vector for five *Bartonella* species. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2013; 36: 105-11.
14. Boulouis HJ, Chang CC, Henn JB, Kasten RW, Chomel BB. Factors associated with the rapid emergence of zoonotic *Bartonella* infections. *Vet Res.* 2005; 36: 383-410.
15. Bradbury CA, Lappin MR. Evaluation of topical application of 10% imidacloprid–1% moxidectin to prevent *Bartonella henselae* transmission from cat fleas. *J Am Vet Med Ass.* 2010; 236: 869–73
16. Breitschwerdt EB. Feline bartonellosis and cat scratch disease. *Vet Immunol Immunopathol.* 2008; 123: 167-71.
17. Chang CC, Chomel BB, Kasten RW, Romano V, Tietze N. Molecular evidence of *Bartonella* spp. in questing adult *Ixodes pacificus* ticks in California. *J Clin Microbiol.* 2001; 39: 1221-6.
18. Chian CA, Arrese JE, Pierard GE. Skin manifestations of *Bartonella* infections. *Int J Dermatol* 2002; 41: 461–6.
19. Chomel BB, Kasten RW, Floyd-Hawkins K, Chi B, Yamamoto K, Roberts-Wilson J, Gurfield AN, Abbott RC, Pedersen NC, Koehler JE. Experimental transmission of *Bartonella henselae* by the cat flea. *J Clin Microbiol.* 1996; 34: 1952-6
20. Chomel BB, Kasten RW, Williams C, Wey AC, Henn JB, Maggi R, Carrasco S, Mazet J, Boulouis HJ, Maillard R, Breitschwerdt EB. *Bartonella* endocarditis: a

pathology shared by animal reservoirs and patients. Ann N Y Acad Sci. 2009;1166:120-6.

21. Chomel BB. Cat-scratch disease and bacillary angiomatosis. Rev Sci Tech. 1996; 15: 1061-73.
22. Cotté V, Bonnet S, Le Rhun D, Le Naour E, Chauvin A, Boulouis HJ, Lecuelle B, Lilin T, Vayssier-Taussat M. Transmission of *Bartonella henselae* by *Ixodes ricinus*. Emerg Infect Dis. 2008; 14:1074-80.
23. Dehio C. *Bartonella*-host-cell interactions and vascular tumour formation. Nat Rev Microbiol 2005; 3: 621–31.
24. Demers DM, Bass JW, Vincent JM, Person DA, Noyes DK, Staeghe CM, Samlaska CP, Lockwood NH, Regnery RL, Anderson BE. Cat-scratch disease in Hawaii: etiology and seroepidemiology. J Pediatr. 1995; 127: 23-6.
25. Drancourt M, Tran-Hung L, Courtin J, Lumley Hd, Raoult D. *Bartonella quintana* in a 4000-year-old human tooth. J Infect Dis. 2005; 191: 607-11.
26. Dryden MW, Rust MK. The cat flea: biology, ecology and control. Vet Parasitol. 1994; 52: 1–19.
27. Dowers KL, Hawley JR, Brewer MM, Morris AK, Radecki SV, Lappin MR. Association of *Bartonella* species, feline calicivirus, and feline herpesvirus 1 infection with gingivostomatitis in cats. J Feline Med Surg. 2010; 12: 314-21.
28. Feng S, Kasten RW, Werner JA, Hodzic E, Barthold SW, Chomel BB. Immunogenicity of *Bartonella henselae* P26 in cats. Vet Immunol Immunopathol. 2009; 132: 251-6.
29. Finkelstein JL, Brown TP, O'Reilly KL, Wedincamp J Jr, Foil LD. Studies on the growth of *Bartonella henselae* in the cat flea (Siphonaptera: Pulicidae). J Med Entomol. 2002; 39: 915-9.
30. Foil L, Andress E, Freeland RL, Roy AF, Rutledge R, Triche PC, O'Reilly KL. Experimental infection of domestic cats with *Bartonella henselae* by inoculation of *Ctenocephalides felis* (Siphonaptera: Pulicidae) feces. J Med Entomol. 1998 ; 35: 625-8.

31. García-Estebar C, Gil H, Rodríguez-Vargas M, Gerrikagoitia X, Barandika J, Escudero R, Jado I, García-Amil C, Barral M, García-Pérez AL, Bhide M, Anda P. Molecular method for *Bartonella* species identification in clinical and environmental samples. *J Clin Microbiol.* 2008; 46: 776-9.
32. Gil H, Escudero R, Pons I, Rodríguez-Vargas M, García-Estebar C, Rodríguez-Moreno I, García-Amil C, Lobo B, Valcárcel F, Pérez A, Jiménez S, Jado I Juste R, Segura F, Anda P. Distribution of *Bartonella henselae* variants in patients, reservoir hosts and vectors in Spain. *PLoS One.* 2013; 8 :e68248.
33. Guptill L. Bartonellosis. *Vet Microbiol.* 2010; 140: 347-59.
34. Gurfield AN, Boulouis HJ, Chomel BB, Heller R, Kasten RW, Yamamoto K, Piemont Y. Coinfection with *Bartonella clarridgeiae* and *Bartonella henselae* and with different *Bartonella henselae* strains in domestic cats. *J Clin Microbiol.* 1997; 35: 2120-3.
35. Jensen WA, Fall MZ, Rooney J, Kordick DL, Breitschwerdt EB. Rapid identification and differentiation of *Bartonella* species using a single-step PCR assay. *Journal of Clinical Microbiology* 2000; 38, 1717-1722.
36. Joshi MU, Keith Pittman H, Haisch CE, Verbanac KM. Real-time PCR to determine transgene copy number and to quantitate the biolocalization of adoptively transferred cells from EGFP-transgenic mice. *BioTechniques* 45:247-258.
37. Kaiser PO, Riess T, O'Rourke F, Linke D, Kempf VAJ. *Bartonella* spp.: Throwing light on uncommon human infections. *Int J Med Microbiol.* 2011; 301: 7–1.
38. Kim YS, Seo KW, Lee JH, Choi EW, Lee HW, Hwang CY, Shin NS, Youn HJ, Youn HY. Prevalence of *Bartonella henselae* and *Bartonella clarridgeiae* in cats and dogs in Korea. *J Vet Sci.* 2009; 10: 85-7.
39. Kordick DL, Brown TT, Shin K, Breitschwerdt EB. Clinical and pathologic evaluation of chronic *Bartonella henselae* or *Bartonella clarridgeiae* infection in cats. *J Clin Microbiol.* 1999; 37: 1536-47.
40. Lappin MR, Breitschwerdt E, Brewer M, Hawley J, Hegarty B, Radecki S. Prevalence of *Bartonella* species antibodies and *Bartonella* species DNA in the blood of cats with and without fever. *J Feline Med Surg.* 2009; 11: 141-8.

41. Lappin MR, Hawley J. Presence of *Bartonella* species and *Rickettsia* species DNA in the blood, oral cavity, skin and claw beds of cats in the United States. *Vet Dermatol.* 2009; 20: 509-14.
42. Maggi RG, Breitschwerdt EB. Potential limitations of the 16S/23S rRNA intergenic region for molecular detection of *Bartonella* species. *Journal of Clinical Microbiology* 2005; 43: 1171-1176.
43. Maruyama S, Kasten RW, Boulouis HJ, Gurfield NA, Katsume Y, Chomel BB. Genomic diversity of *Bartonella henselae* isolates from domestic cats from Japan, the USA and France by pulsed-field gel electrophoresis. *Vet Microbiol.* 2001; 79: 337-49.
44. Melter O, Hercík K, Weyant RS, Janecek J, Nemec A, Mecera J, Gonzorová L, Branny P. Detection and characterization of feline *Bartonella henselae* in the Czech Republic. *Vet Microbiol.* 2003; 93: 261-73.
45. Namekata DY, Kasten RW, Boman DA, Straub MH, Siperstein-Cook L, Couvelaire K, Chomel BB. Oral shedding of *Bartonella* in cats: correlation with bacteremia and seropositivity. *Vet Microbiol.* 2010; 146: 371-5.
46. Ortega E, Escobar MA, Gaforio JJ, Algarra I, Alvarez De Cienfuegos G. Modification of phagocytosis and cytokine production in peritoneal and splenic murine cells by erythromycin A, azithromycin and josamycin. *J Antimicrob Chemother.* 2004; 53: 367-70
47. Pennisi MG, La Camera E, Giacobbe L, Orlandella BM, Lentini V, Zummo S, Fera MT. Molecular detection of *Bartonella henselae* and *Bartonella clarridgeiae* in clinical samples of pet cats from Southern Italy. *Res Vet Sci.* 2010; 88: 379-84.
48. Pons Viñas, Inmaculada. Epidemiología de la infección por *Bartonella henselae*. *Disertación.* Universitat Autònoma de Barcelona, Sabadell, 2009. <http://hdl.handle.net/10803/51436>.
49. Quimby JM, Elston T, Hawley J, Brewer M, Miller A, Lappin MR. Evaluation of the association of *Bartonella* species, feline herpesvirus 1, feline calicivirus, feline leukemia virus and feline immunodeficiency virus with chronic feline gingivostomatitis. *J Feline Med Surg.* 2008; 10: 66-72.

50. Raoult D, Dutour O, Houhamdi L, Jankauskas R, Fournier PE, Ardagna Y, Drancourt M, Signoli M, La VD, Macia Y, Aboudharam G. Evidence for louse-transmitted diseases in soldiers of Napoleon's Grand Army in Vilnius. *J Infect Dis.* 2006; 193: 112-20.
51. 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: 1921–33.
52. Sanchez Clemente N, Ugarte-Gil CA, Solórzano N, Maguiña C, Pachas P, Blazes D, Bailey R, Mabey D, Moore D. *Bartonella bacilliformis*: a systematic review of the literature to guidethe research agenda for elimination. *PLoS Negl Trop Dis* 2012; 6: e1819.
53. Schefe JH, Lehmann KE, Buschmann IR, Unger T, Funke-Kaiser H (2006) Quantitative real-time RT-PCR data analysis: current concepts and the novel gene expressions CT difference formula. *J Mol Med* 84(11): 901–910.
54. Schülein R, Seubert A, Gille C, Lanz C, Hansmann Y, Piémont Y, Dehio C. Invasion and persistent intracellular colonization of erythrocytes. A unique parasitic strategy of the emerging pathogen *Bartonella*. *J Exp Med.* 2001; 193: 1077-86.
55. Schultz MG. A history of bartonellosis (Carrión's disease). *Am J Trop Med Hyg.* 1968; 17: 503-15.
56. Seubert A, Schulein R, Dehio C. Bacterial persistence within erythrocytes: a unique pathogenic strategy of *Bartonella* spp. *Int J Med Microbiol.* 2002; 291: 555-60.
57. 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: 183-8.
58. Silverman J, Rust MK, Rajerson DK. Influence of temperature and humidity on survival and development of the cat flea, *Ctenocephalides felis* (Siphonaptera: Pulicidae). *J Med Entomol* 1981; 18: 78–83.

59. Solano-Gallego L, Hegarty B, Espada Y, Llull J, Breitschwerdt E. Serological and molecular evidence of exposure to arthropod borne organisms in cats from northeastern Spain.. *Vet Microbiol.* 2006; 118: 274-7.
60. Ueno H, Hohdatsu T, Muramatsu Y, Koyama H, Morita C. Does coinfection of *Bartonella henselae* and FIV induce clinical disorders in cats? *Microbiol Immunol.* 1996; 40: 617-20.
61. Vermeulen, MJ, Verbakel H, Notermans DW, Reimerink JH, Peeters MF. Evaluation of sensitivity, specificity and cross-reactivity in *Bartonella henselae* serology. *J. Med.Microbiol.* 2010; 59: 743-745.
62. Wardrop KJ, Reine N, Birkenheuer A, Hale A, Hohenhaus A, Crawford C, Lappin MR. Canine and feline blood donor screening for infectious disease. *J Vet Intern Med.* 2005; 19: 135-42.
63. Wolf LA, Cherry NA, Maggi RG, Breitschwerdt EB. In pursuit of a stealth pathogen: Laboratory diagnosis of Bartonellosis. *Clinical Microbiology Newsletter* 2014; 36: 33-39.
64. Yamamoto K, Chomel BB, Kasten RW, Hew CM, Weber DK, Lee WI, Koehler JE, Pedersen NC. Infection and re-infection of domestic cats with various *Bartonella* species or types: *B. henselae* type I is protective against heterologous challenge with *B. henselae* type II. *Vet Microbiol.* 2003; 92: 73-86.