

ORIGINAL

Recibido: 14 de abril 2016
 Aceptado: 28 de abril de 2016
 Publicado: 5 de mayo de 2016

EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE *BARTONELLA HENSELAE* EN GATOS CALLEJEROS Y DE ALBERGUE EN ZARAGOZA, ESPAÑA

Manuel Alamán Valtierra (1, 2), Carmen Simón Valencia (1), Hector Fuertes Negro (1), Amaya Unzueta Galarza (1), Byron Flores Somarriba (1, 3), Nabil Halaihel Kassab (1).

(1) Departamento de Patología Animal. Facultad de Veterinaria de Zaragoza. Zaragoza. España.

(2) Hospital Veterinario Valencia Sur. Valencia. España.

(3) Escuela de Salud de Medicina Veterinaria, 7. Universidad Autónoma Nacional de León. Nicaragua.

Los autores declaran que no hay conflictos de intereses.

RESUMEN

Fundamentos: *Bartonella henselae* produce la enfermedad del arañazo del gato en las personas y se considera infradiagnosticada. El objetivo fue detectar y cuantificar la carga de ácido desoxirribonucleico (ADN) de *B. henselae* en muestras de sangre y orales de gatos callejeros y de albergue de Zaragoza, España y analizar su relación con factores epidemiológicos y clínicos.

Métodos: Se estudiaron 47 gatos. El ADN de *B. henselae* se detectó mediante reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR) en sangre y muestras orales. Se usó el paquete estadístico SPSS para analizar la positividad de las muestras pareadas y su relación con factores epidemiológicos (edad, sexo, origen, mes de muestreo, presencia de pulgas/garrapatas) y clínicos (estado de salud y presencia de lesiones orales). Se realizó un análisis de regresión logística para conocer la asociación entre la presencia en sangre y cavidad oral y el resto de las variables.

Resultados: el 23,40% de las muestras de sangre y el 27,65% de las orales portaba el ADN de *B. henselae*. Se observó débil correlación de la positividad de las muestras pareadas ($\kappa=0,33$; $p<0,05$). No se detectó asociación estadística ($p>0,05$) entre la presencia de ADN de *B. henselae* en las muestras y los factores epidemiológicos y clínicos. Los gatos con lesiones orales portaban una carga más elevada de ADN ($3,12 \times 10^6$ células) en la boca que los que no tenían lesiones ($2,58 / 10^6$ células), ($p=0,032$).

Conclusiones: La detección de ADN de *B. henselae* en sangre no parece estar relacionada con su presencia en cavidad oral y viceversa. Los gatos positivos con lesiones orales pueden significar mayor riesgo de infección por *B. henselae* para las personas que los manejan.

Palabras clave: *Bartonella henselae*. Gato. Reacción de la cadena de la polimerasa en tiempo real. Sangre. Cavidad oral. Epidemiología molecular. Zoonosis. Mascotas.

Correspondencia

Maria Carmen Simón Valencia
 Unidad de enfermedades Infecciosas y Epidemiología
 Departamento de patología animal
 Facultad de Veterinaria
 Miguel Servet, 177
 50013, Zaragoza
 mcsimon@unizar.es

ABSTRACT

Molecular Epidemiology of Bartonella Henselae in Stray and Sheltered Cats of Zaragoza, Spain

Background: *Bartonella henselae* is responsible for the Cat Scratch Disease in humans, being it underdiagnosed. This study aims to detect and quantify the load of *B. henselae* DNA in oral and whole blood samples from stray and sheltered cats from Zaragoza (Spain), and analyze associations with epidemiological and clinical factors.

Methods: 47 cats entered in the study. Real time PCR was used to detect *B. henselae* DNA in blood and oral samples. The SPSS software was applied to the statistical analysis of positivity of paired samples and its relationship with variables as age, sex, origin, month of sampling and fleas/ticks observation in fur and clinical factors (health status and observation of oral lesions). Logistic Regression was used.

Results: a 23.40% of blood samples and the 27.65% of the oral swabs carried the *B. henselae* DNA. A fair agreement between paired samples was observed ($\kappa=0.33$, $p<0.05$). Bacterial DNA detected in oral and blood samples were not significantly associated to any of the epidemiological and clinical factors. Positive cats having oral lesions carried higher loads ($3,12 / 1x10^6$ cells) of bacterial DNA in their oral cavity than those without lesions ($2,58/1x10^6$ cells) being $p = 0.032$.

Conclusions: Carriage of the *B. henselae* DNA in the blood samples appears not to be related with carriage of the DNA of the bacteria in mouth and vice versa. Positive cats having oral lesions carry a higher load of *B. henselae* DNA and may suppose a higher risk of transmission to people handling them.

Keywords: *Bartonella henselae*. Cat. Real-Time Polymerase Chain Reaction. Blood. Oral cavity. Molecular epidemiology. Zoonoses. Pets. Logistic regression.

Cita sugerida: Alamán Valtierra M, Simón Valencia C, Fuertes Negro H, Unzueta Galarza A, Flores Somarriba B, Halaihel Kassab N. Epidemiología molecular de *Bartonella henselae* en gatos callejeros y de albergue en Zaragoza, España. Rev Esp Salud Pública. 2016; vol 90: 4 de mayo: e1-e11.

INTRODUCCIÓN

El género *Bartonella* incluye bacterias Gram-negativas pleomórficas, intracelulares facultativas, transmitidas por vectores artrópodos que pueden causar infecciones persistentes en hospedadores mamíferos¹. Contiene al menos 30 especies², de las que *Bartonella henselae*, *B. clarridgeiae* and *B. koehlerae*, son las más prevalentes en el gato. *Bartonella henselae* se relaciona con la mayor parte de los casos humanos graves de la llamada enfermedad del arañazo del gato (EAG), ya que se suele transmitir por medio de la mordedura y arañazos del gato infectado/colonizado³. Los gatos son los reservorios principales de la pulga *Ctenocephalides felis*, que se considera el vector más competente de esta bacteria¹. En personas inmunodeprimidas la infección puede evolucionar con diferente gravedad, desde linfadenitis local, bacteriemia y afecciones orgánicas graves^{2,4}, mientras que la infección felina (bartonellosis felina) suele ser subclínica⁵, aunque se han descrito diferentes manifestaciones clínicas tanto en contagio natural como experimental^{3,5}. En los últimos años, el avance en los métodos de cultivo de la bacteria, las técnicas de detección de anticuerpos, junto a las técnicas moleculares genéticas, permiten aumentar las descripciones de manifestaciones clínicas atípicas de la infección por *Bartonella spp* en la especie humana (encefalitis, artritis cerebral, mielitis transversa, hepatitis y/o esplenitis granulomatosa, osteomielitis, neumonía, efusión pleural y púrpura trombocitopénica, endocarditis), lo que pone en evidencia que ha sido infradiagnosticada y todavía es probable que sigan aumentando las descripciones, no solo asociadas a *B. henselae* sino a otras especies de *Bartonella*⁵.

La serología con técnicas como la Inmunofluorescencia Indirecta y *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay* (ELISA) para detección de anticuerpos IgG e IgM son muy utilizadas en el diagnóstico de EAG en medicina humana, pero la interpretación de los resultados es complicada por la variabilidad de an-

tígenos usados y las diferentes prevalencias encontradas⁶. En España se ha informado de un 71,4% de seroprevalencia en 168 gatos domésticos de Barcelona, Tarragona y Mallorca⁷ o el 23,8% de seropositivos en 680 gatos de Madrid⁸ y un 50% en 89 gatos de 9 comunidades autónomas (Cataluña, Valencia, Murcia, Andalucía, Galicia, País Vasco y Madrid)⁹.

En mascotas de algunos países europeos se encuentra una seroprevalencia del 41,1% en París (Francia), 15% en Alemania y 38% en la Lombardía (Italia), mientras que en Reino Unido fue de 9,4% en mascotas y 41,8% en gatos silvestres¹⁰.

El aislamiento de *Bartonella* de muestras orales por cultivo directo es poco sensible debido a la baja carga de bacteria en las muestras, si bien es la única forma de demostrar bacteriemia.

En España se ha informado de un 20% de hemocultivos positivos en mascotas del Nordeste de la península⁷ y Gil *et al.* encontraron el 17,75% a partir de 147 gatos (callejeros, mascotas y de corral)¹¹.

En Europa se encuentran valores variables en mascotas, desde el 0% en Noruega, el 1% en Berlín, el 11,4% en el Reino Unido y el 63,5% en París. Mientras que en gatos callejeros se encuentra el 18,7% en Berlín, el 23% en Italia y el 72% en Nantes. En Holanda se encontró bacteriemia en el 22% de los gatos de refugios¹⁰.

La técnica reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se ha utilizado para detectar ADN de diferentes especies de *Bartonella*, dirigida a diferentes genes, pero la región intergénica 16S-23S del ácido ribonucléico ribosomal (rRNA) es una buena diana y los cebadores diseñados específicamente permiten diferenciar las especies de *Bartonella*¹²⁻¹⁵. Tal como informan otros autores¹⁶⁻¹⁸, la detección del ADN de *B. henselae* en la sangre no siempre está relacionada con el aislamiento de la bacteria en cultivo *in vitro*.

En el 2006 se informó de que el 14,9% de gatos domésticos del Nordeste de la península portaban el ADN de la bacteria⁷ y Gil et al¹¹, detectaron el ADN de la bacteria en el 21,1% de los gatos de su estudio, independientemente de su origen. Diferenciados por esta última variable, se detectó en el 26,6% de gatos callejeros, en el 11,8% de gatos domésticos y 23,5% de gatos que vivían en corral, pero no detectaron el ADN en gatos de Madrid. Estos autores concluyeron la existencia de diferencias significativas según el origen geográfico de los gatos.

En Messina, (Sicilia, Italia)¹⁴ se detectó el ADN de *B. henselae* en el 60% de las muestras orales y en el 70,6% de las muestras de sangre de 85 gatos domésticos, mientras que un estudio realizado en albergues del norte de California y Michigan¹⁶, el 38,3% de 180 muestras orales portaban ADN de *Bartonella spp* y encontraban una probabilidad 3 veces superior de ser positivos en los gatos con bacteriemia. Lappin y Hawley¹⁸ no encontraron ADN de *B. henselae* en gatos silvestres de Colorado (EEUU) pero se detectó en el 56,9% de las muestras de sangre, el 31,4% de las de piel, el 17,6% de las garras y el 17,6% de las encías de 51 gatos silvestres de Alabama y Florida (EEUU). En otro estudio realizado en Corea¹⁹ se detectó el ADN de *B. henselae* en el 41,8% de las muestras de sangre, el 44,1% de las de saliva y en el 42,7% en las uñas de 150 gatos silvestres, mientras que en gatos domésticos se observó en el 33,3% de muestras de sangre, 43,5% de las muestras de saliva y un 29,5% de muestras de uñas. En todos estos estudios se pone de manifiesto la variabilidad de resultados en diferentes regiones geográficas según la procedencia de los gatos.

En la especie humana, un estudio retrospectivo realizado en el Hospital de Sabadell²⁰, desde la primera serología positiva a *Bartonella spp* en 1998 hasta el 2007, encontraron a 45 personas con serología po-

sitiva, de las cuales 25 eran niños con una media de edad de 6,9 años (rango 1-14) y en 20 adultos con una media de 36,4 años (rango 15-62) Estos mismos autores informan de una seroprevalencia del 22,3% en pacientes con HIV de este hospital, en el año 2004-2005²¹. En la Comunidad Valenciana se informó²² de la detección de 14 casos de infección por *B. henselae* (por serología, cultivo y/o PCR) en el periodo 2009 a 2012. La tasa de incidencia se calculó en 0,07 por cada 10⁵ habitantes y año en la comunidad Valenciana, en 0,10 por cada 10⁵ habitantes y año en la provincia de Alicante, en 0,06 por cada 10⁵ habitantes y año en la provincia de Valencia y ningún caso en la provincia de Castellón. La distribución variaba según el área geográfica y se observaron más casos en niños.

En EEUU se calculó que había 9,3 casos por cada 10⁵ habitantes y año (en el periodo 1978-1989) mientras que en Connecticut (1992-1993) se informó de 3,7 casos por cada 10⁵ habitantes y año. En el año 2000, en un estudio realizado en un hospital pediátrico, se calculó una incidencia de 0,6 casos por 100.000 en menores de 18 años, aumentando a 0,86 por 100.000 en menores de 5 años. Por otro lado, una revisión de casos en profesionales veterinarios mostró una prevalencia del 7,1%²³. En Holanda, en 1993, se informó una incidencia de 12,5 casos por cada 10⁵ habitantes y año²⁴.

El propósito de este estudio fue detectar y cuantificar la carga de ADN de *B. henselae* en muestras de sangre y cavidad oral de gatos callejeros y de albergue de Zaragoza (España) así como estudiar si existía asociación con diferentes factores epidemiológicos y clínicos relacionados con esos gatos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se obtuvieron muestras de sangre con EDTA e hisopos orales de 47 gatos callejeros y de albergue. El estudio se llevó a cabo entre los meses de Mayo y Julio de 2014 en

Zaragoza (España) y el muestreo se realizó de acuerdo con la accesibilidad a los gatos y la posibilidad de recoger las muestras. Los gatos eran recibidos en el Hospital Veterinario de la Universidad de Zaragoza y se recogieron datos sobre su edad aproximada (el grupo “joven” incluía gatos entre 6 meses y 2 años y el grupo “adultos” los comprendidos entre 2 y 10 años), sexo, origen (colonía callejera o albergue), mes del muestreo (mayo, junio y julio) y presencia de pulgas/garrapatas en su piel, así como sobre su estado de salud y presencia de lesiones orales.

Todos los procedimientos se realizaron bajo el amparo de la Licencia para el proyecto PI11/057, aprobado por el Comité para la Experimentación Animal de la Universidad de Zaragoza.

Las muestras orales fueron recogidas con hisopos estériles e introducidos en tubos Eppendorf también estériles con 500 µl de una solución tamponada de HBBS de GIBCO (cat#14170070, sin cloruro cálcico, cloruro de magnesio o sulfato de magnesio,) y se agitaron brevemente. Tras una centrifugación de 1 minuto a 11.000g con los hisopos invertidos, estos se retiraron y el ADN total se extrajo de los 400 µl del eluído, mediante el kit de ADN (*SpeedTools Tissue A extraction de Biotoools, SL, Spain*), siguiendo las recomendaciones del fabricante. A los 400µl se les añadió 200 µl de tampón de lisis (BB3) incluyendo 25µl de proteína K y se sometieron a una incubación a 70°C durante una hora. A continuación se añadieron 210µl de etanol. La solución obtenida se cargó en la columna con el filtro de silice y se sometió a una centrifugación de 11.000 g durante 1 minuto. Una serie de dos lavados de la columna con los tampones BBW y BB5 y con una centrifugación a 11.000 g durante 1 minuto cada uno, respectivamente. Después se dejó secar el filtro durante un minuto, se obtuvo el ADN en un volumen de 100µl de la solución de elución (BBE) centrifugando la columna a 11.000 g durante 1 minuto.

La extracción de ADN de las muestras de sangre, fue muy similar al protocolo descrito por el kit de biotools (filtros de Silica) utilizando el minikit de Mobio DNA para sangre (UltraClean® BloodSpin® DNA Isolation Kit; MOBIO Laboratories, Inc. Mobio, USA). El volumen de la muestra de sangre con EDTA fue de 200 µl, y el volumen de elución final fue de 200 µl. Todas las muestras de ADN extraído se conservaron a -80°C hasta su estudio. La cuantificación del ADN de cada una de las muestras fue determinada por espectrofotometría (NanoDrop 100 Thermo Fisher Scientific Wilmington, DE, USA) calculada a través de la absorbancia a 260 nm (A260) y la pureza se obtuvo mediante la relación A260/A280 y A260/A230 (lectura automática en el aparato).

Para la PCR a tiempo real, 2,25µl de ADN extraído fueron utilizados en triplicado en 20µl de volumen de reacción final con el fluroforo SYBR-green (GoTaq® Hot Start Green Master Mix, Promega, EEUU), usando 2 cebadores dirigidos a la región intergénica específica 16S-23S del ARN ribosomal de *B. henselae* y otros dos cebadores dirigidos a la región conservada del gen de la F-actina felina como sistema de Control Interno y de estandarización ([anexo 1](#)), ambos con una concentración final de 300nM. El programa de PCR se inició con una desnaturización 95°C durante 10 min seguido de unos 40 ciclos de amplificación 95°C durante 20 segundos, 55°C durante 30s, y 72° C durante 30 segundos, con una única medida de fluorescencia a 79°C en un instrumento CFX de Bio-RAD (California EEUU). La curva de disociación de los productos de la PCR fue determinada por un incremento de 0,5°C entre 65 y 94°C, al terminar los ciclos.

El ciclo umbral (Ct), definido como el número de ciclos al que la fluorescencia alcanza 10 veces la desviación estándar de la línea de base, se cuantificó de forma automática por la aplicación de procesado de datos del instrumento. El ciclo umbral calculado (Ct) para cada amplificación del gen se normalizó

zó a la Ct del gen de actina en el caso de las muestras de hisopos bucales por el método de cuantificación relativa (DDn)²⁵. En las muestras de sangre, la cuantificación fue directa, determinada por el valor del ciclo umbral (Ct) en comparación a una curva estándar de cuantificación, utilizando diluciones seriadas en base 10 de sangre negativa enriquecida con 10^8 UFC de cultivo puro de *B. henselae*²⁶. Los resultados de las muestras orales normalizados respecto a la Ct de la F-actina, se expresaron como copias de *B. henselae*/ 10^6 células, mientras que para la sangre los resultados se expresan como copias/ml.

Todo el análisis estadístico se desarrolló con el software estadístico SPSS 19.0 (SPSS Inc., Illinois, EEUU), para Windows. Las variables cuantitativas se calcularon con la media aritmética y la desviación típica, y las variables cualitativas fueron informadas como frecuencias; en ambos casos con el intervalo de confianza al 95% (IC95%).

Para comparar los resultados de las muestras pareadas de sangre y de cavidad oral se calculó el índice de Cohen Kappa con las tablas de contingencia.

La interpretación de los valores de Kappa usados en el estudio se basó en la interpretación de Landis and Koch²⁷. Valores de Kappa $\leq 0,2$ se interpretaron como ligera concordancia, de 0,21 a 0,4 como débil concordancia, de 0,41 a 0,6 como moderada, de 0,61 a 0,8 como considerable, $\geq 0,81$ como casi perfecta y 1,00 como concordancia perfecta entre los tests.

Para la comparación de la carga de ADN de la bacteria en las muestras pareadas de sangre y cavidad oral se calculó el test de correlación de Pearson, usando el valor de partida con el Log₁₀ de los datos de la qPCR. Se calcularon las Odds Ratio y sus intervalos de confianza al 95% (IC95%) mediante análisis de regresión logística independiente para conocer la asociación de la presencia de la bacteria en sangre y cavidad oral con

el resto de las variables. Para identificar los valores asociados con las cargas de ADN se utilizó la t de Student para variables dicotómicas, mientras que el análisis de varianza se realizó para variables con más de dos valores (meses).

RESULTADOS

En este estudio, 18 (38,29%) de los 47 gatos contenían el ADN específico de *B. henselae*, ya fuera en la cavidad oral (27,65%; IC95% = 13,80-41,51) o en la sangre (23,40%; IC95% = 10,23-36,57). Fueron positivos para ambas muestras 6 (12,76%) gatos (**tabla 1**).

Se encontró una débil concordancia (**tabla 2**) entre la positividad de las muestras de sangre y la orales (Kappa 0,33; $p < 0,05$).

En la **tabla 3** se observa la carga de ADN (Log₁₀) detectada en sangre (por ml) y en muestras orales (por 10^6 células). Se obtuvo una estrecha franja de desviación estándar para ambos tipos de muestras, de modo que en muestras de sangre se encontraba una desviación standard de 0,65 y un rango comprendido entre 2,89 y 5,18 (Log₁₀ por ml de sangre) y en cavidad oral una desviación estándar de 0,30 con un rango comprendido entre 4,04 y 5,15 (Log₁₀, por 10^6 células). Cabe destacar que el gato 28/14 con la carga más alta de ADN de la bacteria en sangre [5,18 (Log10)/ml de sangre] era negativo en cavidad oral.

Por otro lado el valor medio de copias de ADN de *B. henselae* en muestras orales de gatos con lesión oral [3,12 (Log10)/1 por 10^6 células] fue 3 veces superior al valor encontrado en los gatos sin lesiones orales [2,58 (Log10)/1 por 10^6 células], ($p=0,032$ asumida igual varianza; IC95%: 0,5-1,03).

Para una mayor aproximación estadística, se aplicaron dos regresiones logísticas para los valores de la cavidad oral y de la sangre de forma independiente (**tabla 3**). La primera indicó que ninguno de los factores conside-

Tabla 1
Porcentaje de qPCR positivos en muestras de sangre y cavidad oral para cada variable considerada

Factor	Variable n	Oral n (%)	Sangre n (%)	Muestras pareadas positivas n (%)	Al menos una muestra positiva n (%)
Edad estimada	Joven 9	2 (22,20)	1 (11,10)	0	3 (33,33)
	Adulto 38	11 (28,90)	10 (26,30)	6 (15,80)	15 (39,5)
Sexo	Hembra 32	9 (28,10)	6 (18,80)	4 (12,50)	11 (34,40)
	Macho 15	4 (26,70)	5 (33,30)	2 (13,33)	7 (46,70)
Mes*	Mayo 6	2 (33,33)	3 (50,00)	2 (33,33)	3 (50,00)
	Junio 29	9 (31,00)	5 (17,20)	3 (10,30)	11 (37,90)
	Julio 12	2 (16,70)	3 (25,00)	1 (8,30)	4 (33,33)
Origen	Callejeros 41	11 (26,80)	11 (26,80)	6 (14,60)	16 (39,00)
	Albergue 6	2 (33,30)	0	0	2 (33,30)
Pulgas/heces	34	9 (26,50)	9 (26,50)	5 (14,70)	13 (38,20)
Signos clínicos	14	2 (14,30)	2 (14,30)	1 (7,10)	3 (21,40)
Lesiones en la	8	1 (12,50)	1 (12,50)	1 (12,50)	1 (12,50)
Total	47	13 (27,65)	11 (23,40)	6 (12,76)	18 (38,29)

Tabla 2
Resultado del Coeficiente de Cohen's kappa tras la comparación de las muestras positivas de sangre y cavidad oral

Cavidad oral y sangre	Negativa	Positiva	Total
Negativa	29	5	34
Positiva	7	6	13
Total	36	11	47
Kappa (0,330), p (0,023)			

rados en el estudio tenían efecto significativo sobre la presencia del ADN de la bacteria en muestras orales o en sangre (**tabla 4**), $p>0,05$ en todos los parámetros analizados. Cabe reseñar que las muestras de los gatos recogidos en el mes de mayo tenían una probabilidad 6 veces superior de portar el ADN de la bacteria en cavidad oral en comparación con las muestras de los gatos recogidos en julio, si bien las diferencias no fueron estadísticamente significativas (Odds Ratio 6,48; $p=0,195$).

Esto mismo, pero más marcado, se observó a partir de las muestras de sangre, que indicaba una probabilidad de portar el ADN de la bacteria (**tabla 4**), en las muestras de mayo era 16 veces superior a las obtenidas en julio, si bien no fueron estadísticamente significativas ($OR=16,45$; $p=0,068$).

Tabla 3
Carga de ADN de *B henselae* en muestras de sangre y de cavidad oral (Log10)

Referencia del gato*	Carga de ADN de <i>B henselae</i> en sangre (Log10)/ml	Carga de ADN de <i>B henselae</i> /10 ⁶ en células (Log10)
27/14	2,89	(-)
6/14	3,16	(-)
50/14	3,31	(-)
41/14	3,60	(-)
28/14	5,18	(-)
13/14	(-)	4,04
36/14	(-)	4,09
16/14	4,32	4,22
8/14	3,23	4,26
17/14	4,19	4,26
33/14	(-)	4,32
22/14	(-)	4,33
18/14	3,68	4,41
12/14	(-)	4,46
19/14	(-)	4,56
46/14	(-)	4,58
48/14	3,70	4,75
5/14	3,35	5,15
Media	3,69	4,42
Desv-St	0,65	0,30

* 27 gatos fueron negativos en ambos tipos de muestras los gatos número

Tabla 4
Resultados del análisis de regresión logística para las muestras positivas de cavidad oral y sangre para cada variable analizada

Variable	Cavidad oral			Sangre		
	p	Odds Ratio	IC95%	p	Odds Ratio	IC95%
Macho/Hembra	0,644	1,46	0,294-7,322	0,164	3,32	0,61-17,99
Albergue/callejero	0,612	2,02	0,13-31,25	0,999	0,00	
Adulto/joven	0,436	2,28	0,28-17,18	0,586	2,13	0,13-32,81
Lesión: No/Sí	0,63	2,05	0,08-52,81	0,538	3,22	0,08-134,06
Pulgas: Sí/No	0,931	0,92	0,13-6,14	0,770	1,36	0,16-11,14
Signos clínicos: Sí /No	0,331	0,29	0,02-3,46	0,387	0,27	0,01-5,12
Julio *	0,375			0,136		
Junio	0,237	3,14	0,47-20,97	0,978	0,97	0,14-6,54
Mayo	0,195	6,48	0,38-109,41	0,068	16,45	0,81-333,48

* Valor de contraste para cada variable

DISCUSIÓN

En este estudio se encontró una débil asociación entre la positividad en sangre y la positividad en muestras orales, sugiriendo que la presencia de ADN de *B. henselae* en la boca no es predictiva para que se encuentre también en la sangre y viceversa. Nakemata et al¹⁶ observaron asociación estadísticamente significativa entre bacteriemia y la detección de ADN de *B. henselae* en la saliva, sin embargo estos autores no aplicaron la qPCR en muestras de sangre.

El ADN de *B. henselae* en muestras orales parece tener su origen, principalmente, en la ingestión de pulgas (*C. felis*) y/o sus heces durante el acicalamiento (que suele realizarse tras la comida y cuando siente que su piel está sucia), tal y como es reconocido por otros autores^{18,28}, asumiendo que las especies de *Bartonella* son capaces de sobrevivir durante 3 días en las heces de las pulgas²⁹. En el presente estudio no se encuentra significación estadística entre la detección del ADN de esta bacteria en muestras orales y la presencia de pulgas y/o sus heces en el gato y los resultados encontrados en otras investigaciones también son contradictorios en este sentido¹⁶⁻¹⁸. Aunque no se ha buscado el ADN de *B. henselae* en las garras de los gatos, un trabajo realizado

en España con gatos de diferentes regiones⁹ detectó un 4,4% de las pulgas con ADN de la bacteria pero no lo encontró en las garras, lo que también es observado por otros autores³⁰. Aparte de que este trabajo es diferente en muchos aspectos, se podría sugerir que el lamido puede ser un importante modo de contaminar las garras felinas con *B. henselae* además de que las extremidades posteriores puedan ser utilizadas para el rascado.

Sin embargo un gato, que aparentemente no estaba infestado con pulgas, dio resultado positivo en la muestra oral y negativo en la sangre pareada. En este caso la explicación más probable sería que las pulgas y/o sus heces no se observaron por error, aunque también hay que considerar que la recurrente naturaleza de la bacteriemia en la infección del gato por *B. henselae* podría explicar la negatividad de la PCR en sangre, como han informado otros autores^{16-18,28}.

En sentido contrario, se observó que el gato con la carga más alta de ADN de la bacteria en sangre fue negativo en cavidad oral y no portaba pulgas ni en sus heces ni en la piel. Esto podría apoyar la idea de que los gatos con bacteriemia no siempre tienen eritrocitos infectados en su boca^{18,28}, por otro lado, está bien documentado que la infección del gato

con *B. henselae* ocurre durante la alimentación de la pulga con sangre felina y por la contaminación de heridas de la piel con las heces de las pulgas infectadas^{1,29,31}, pero siendo una infección crónica no siempre que se detecte un gato infectado tiene, necesariamente, que portar las pulgas que ocasionaron esa infección en un tiempo pasado o indefinido.

Los resultados de este estudio muestran la falta de asociación entre la presencia de pulgas y la detección de ADN de *B. henselae* en sangre, que es lo que han observado otros autores¹⁶⁻¹⁸, ya que en la línea de lo comentado en el párrafo anterior, desde el momento que ocurre la infección el gato podría pasar por sucesivas fases de parasitación y desparasitación.

Independientemente de la diversidad de factores que podrían afectar la ingestión de pulgas y/o sus heces en un gato, se debe mencionar, que las cargas de ADN de *B. henselae* encontradas en la cavidad oral en este estudio muestran un estrecho margen de fluctuación. En cualquier caso, se desconoce la carga mínima necesaria de *B. henselae* para inducir la enfermedad en las personas, ya que la capacidad del sistema inmune para responder influye en gran medida en las consecuencias clínicas^{2,4,5,32-35}, a pesar de que se ha sugerido que las cepas de *B. henselae* encontradas en gatos suelen ser muy patógenas para las personas¹¹. Gil et al¹¹ encuentran una amplia diferencia de variantes de *B. henselae* en personas y gatos y la mayoría de las que circulan en España parecían estar muy relacionadas entre sí. También detectaron que el ST5 es predominante en personas y gatos, destacando que uno de sus perfiles es más frecuente que el resto en pacientes humanos (MLVA 72). Se sospecha que algunas variantes podrían estar relacionadas con cuadros clínicos más graves, aunque todavía debe estudiarse más ampliamente. Nosotros no hemos estudiado las variantes que portaban los gatos, aunque de cara al futuro es interesante ir delimitando las portadas por los gatos que se relacionan con formas más graves en las personas.

Una prevalencia del 27,65% de ADN de *B. henselae* en cavidad oral significa que hay un riesgo potencial alto de provocar una infección en las personas que manejan o van a convivir con estos animales, en particular si son gatos callejeros, que suelen tener un comportamiento agresivo. Comparado con los resultados informados en estudios previos, realizados con la técnica PCR^{14,16,18,19}, que dan prevalencias que oscilan del 0,0% en mascotas de Madrid¹¹ o en gatos salvajes de Colorado (EEUU)¹⁸ al 60,0% en muestras de cavidad oral o el 70,6% en sangre en Italia en gatos domésticos¹⁴, la prevalencia encontrada en nuestro estudio está en valores medios muy próximos a los encontrados por Gil et al.¹¹ en gatos callejeros. Es difícil deducir las causas de estas diferencias, aunque se sugiere que los climas húmedos y templados así como el tipo de vida de los gatos facilitan el establecimiento de las pulgas en el medio ambiente y la infestación del gato^{16,18,31}.

Ninguno de los factores considerados en el estudio mostró asociación estadísticamente significativa sobre la presencia de la bacteria en muestras orales, aunque cabe resaltar que en el mes de mayo se detectó una probabilidad 6 y 16 veces superior de portar el ADN de la bacteria en la boca y sangre, respectivamente, si bien estos resultados no eran estadísticamente significativos. El clima en Zaragoza es templado y húmedo en el mes de mayo, pero caluroso y seco en julio, condiciones que podían haber favorecido el aumento de la prevalencia en mayo.

Aunque ha habido autores que sugieren que los gatos jóvenes y cachorros suelen tener mayor prevalencia de infección^{14,36}, en nuestro estudio no se observa. Tampoco se encontró asociación estadística entre los factores considerados en este estudio y la presencia del ADN de la bacteria en sangre, incluso en gatos con lesiones orales, al igual que otros autores¹⁴. Namekata et al¹⁶ no encontraron asociación entre la infección crónica con *B. henselae* y el desarrollo de lesiones orales, y Dowers et al¹⁷ tampoco la encontraron.

ron entre lesiones orales y detección de ADN de *B. henselae* en la boca.

Otros síndromes clínicos variados en los gatos de este estudio no se relacionaron con la presencia del ADN de la bacteria en la sangre o en la boca, al igual que otros autores que tampoco encuentran resultados concluyentes^{2,18,34}.

En nuestro estudio, la frecuencias de ADN de *B. henselae* en la cavidad oral son similares en machos y hembras, que es lo que también encontraron Pennisi et al.¹⁴, aunque difiere de lo encontrado por Jensen et al¹³.

Hasta lo que nosotros conocemos, es la primera vez que se realiza la técnica PCR en tiempo real para detectar ADN de *B. henselae* en muestras pareadas de sangre y cavidad oral de gatos callejeros y de albergue. En estudios posteriores se debería comparar la carga de ADN de *Bartonella spp* con la demostración de bacteriemia, tanto en las especies animales como en las personas, lo que permitiría conocer más ampliamente la relación que puede tener la carga de ADN de la bacteria con el tipo y gravedad de las manifestaciones clínicas.

Se puede concluir que la presencia de ADN de *B. henselae* en la sangre y en las muestras orales de los gatos parecen ser hechos prácticamente independientes. Sin embargo, los gatos con lesiones orales tienen mayor carga de ADN de la bacteria en cavidad oral que los que no tienen lesiones, lo que potencialmente significa un mayor riesgo de infección para las personas que los manejan, con especial mención para niños, jóvenes y personas con algún tipo de inmunodeficiencia. Puede existir una fuerte interacción entre diferentes factores, lo que explicaría las conclusiones, aparentemente contradictorias, de los diferentes estudios realizados hasta ahora.

Esto sugiere que se debe educar desde el punto de vista sanitario a los futuros adoptantes sobre los métodos correctos de desparasitación de los gatos y el control del ambiente³⁷.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a los estudiantes y profesores del Hospital Veterinario de la Universidad de Zaragoza por su gran ayuda en la recolección de las muestras. Igualmente, agradecemos a Jesús Orós, técnico especialista de laboratorio, por su ayuda en la preparación de las muestras y a los miembros de Alquizvetek SL por el desarrollo y aplicación de la técnica qPCR para *B. henselae*.

BIBLIOGRAFÍA

- Chomel BB, Kasten RW, Floyd-Hawkins K, Chi B, Yamamoto K, Roberts-Wilson J, et al. Experimental transmission of *Bartonella henselae* by the cat flea. *J Clin Microbiol*. 1996; 34:1952-1956.
- Angelakis E, Raoult D. Pathogenicity and treatment of *Bartonella* infections. *Int J Antimicrob Agents* 2014; 44:16-25.
- Chomel BB. Cat-scratch disease and bacillary angiomatosis. *Rev Sci Tech* 1996; 15:1061-1073.
- Kaiser PO, Riess T, O'Rourke F, Linke D, Kempf VA. *Bartonella spp.*: throwing light on uncommon human infections. *Int J Med Microbiol*. 2010; 301:7-15. DOI: 10.1016/j.ijmm.2010.06.004
- Breitschwerdt EB. Feline bartonellosis and cat scratch disease. *Vet Immunol Immunopathol*. 2008; 123:167-171.
- Vermeulen MJ, Herremans M, Verbakel H, Bergmans AM, Roord JJ, van Dijken PJ, et al. Serological testing for *Bartonella henselae* infections in The Netherlands: clinical evaluation of immunofluorescence assay and ELISA. *Clin Microbiol Infect*. 2007; 13:627-634.
- 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: 274-277.
- Ayllón 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: 143-150.
- Gracia Salinas MJ, Marcén Terraza M, Pinal R, Clavete C, Rodes Moltó D. Prevalence of *Rickettsia* and *Bartonella* species in Spanish cats and their fleas. *J Vector Ecol*. 2015; 40:233-239.
- 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.

11. Gil H, Escudero R, Pons I, Rodriguez-Vargas M, Garcia-Esteban C, Rodriguez-Moreno I, et al. Distribution of *Bartonella henselae* variants in patients, reservoir hosts and vectors in Spain. 2013; PLoS One. 8, e68248.
12. 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.
13. Jensen WA, Fall MZ, Rooney J, Kordick DL, Breitschwerdt EB. Rapid identification and differentiation of *Bartonella* species using a single-step PCR assay. J Clin Microbiol. 2000; 38:1717-1722.
14. Pennisi MG, La Camera E, Giacobbe L, Orlandella BM, Lentini V, Zummo S, et al. Molecular detection of *Bartonella henselae* and *Bartonella clarridgeiae* in clinical samples of pet cats from Southern Italy. Res Vet Sci. 2010; 88:379-384.
15. Maggi RG, Breitschwerdt EB. Potential limitations of the 16S-23S rRNA intergenic region for molecular detection of *Bartonella* species. J Clin Microbiol. 2005;43: 1171-1176.
16. Namekata DY, Kasten RW, Boman DA, Straub MH, Siperstein-Cook L, Couvelaire K, et al. Oral shedding of *Bartonella* in cats: correlation with bacteremia and seropositivity. Vet Microbiol. 2015; 146:371-375.
17. 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. 2009; 12:314-321.
18. 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; 20:509-514.
19. Kim YS, Seo KW, Lee JH, Choi EW, Lee HW, Hwang CY, et al. Prevalence of *Bartonella henselae* and *Bartonella clarridgeiae* in cats and dogs in Korea. J Vet Sci. 2009; 10:85-87.
20. Sanfeliu I, Antón E, Pineda V, Pons I, Perez J, Font B et al. Description of *Bartonella spp.* infections in a general hospital of Catalonia, Spain. Clin Microbiol Infect. 2009; 15 (Suppl 2): S130-131
21. Pons I, Sanfeliú I, Nogueras MM, Sala M, Cervantes M, Amengual MJ et al. Seroprevalence of *Bartonella spp.* infection in HIV patients in Catalonia, Spain. BMC Infect Dis BMC series. 2008; 8:58.
22. Fernández-Arias C, Borrás-Máñez M, Colomina-Rodríguez J, Cuenca-Torres M y Guerrero-Espejo A.. Incidence of *Bartonella henselae* Infection during the period 2009-2012 in the Valencian Community, Spain. Rev Esp Salud Pública. 2015; 89: 227-230.
23. McElroy KM, Blagburn BL, Breitschwerdt EB, Mead PS, McQuiston JH. Flea-associated zoonotic diseases of cats in USA: bartonellosis, flea-borne rickettsioses, and plague. Trends in parasitol. 2010, 26 (4): 197-204
24. Bergmans AM, Schellekens JF, van Embden JD, Schouls LM. Predominance of two *Bartonella henselae* variants among cat-scratch disease patients in the Netherlands. J Clin Microbiol. 1996; 34: 254-60.
25. Ginzinger DG. Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. Exp Hematol. 2002; 30:503-512.
26. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods. 2001; 25:402-408.
27. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. Biometrics. 1977; 33:159-174.
28. 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.
29. 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; 36:105-111.
30. Bennet AD, Gunn-Moore DA, Brewer M, Lappin MR. Prevalence of *Bartonella* species, haemoplasmas and Toxoplasma gondii in cats in Scotland. J Feline Med Surg. 2011; 13:553-557.
31. Foil L, Andress E, Freeland RL, Roy AF, Rutledge R, Triche PC, et al. Experimental infection of domestic cats with *Bartonella henselae* by inoculation of *Ctenocephalides felis* (Siphonaptera: Pulicidae) feces. J Med Entomol 1998; 35:625-628.
32. Frean J, Arndt S, Spencer D. High rate of *Bartonella henselae* infection in HIV-positive outpatients in Johannesburg, South Africa. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2002; 96:549-550.
33. Koehler JE, Tappero JW. Bacillary angiomatosis and bacillary peliosis in patients infected with human immunodeficiency virus. Clin Infect Dis. 1993; 17:612-624.

34. Schulein R, Seubert A, Gille C, Lanz C, Hansmann Y, Piemont Y, et al. Invasion and persistent intracellular colonization of erythrocytes. A unique parasitic strategy of the emerging pathogen *Bartonella*. *J Exp Med.* 2001; 193:1077-1086.
35. Edouard S, Raoult D. *Bartonella henselae*, un agent d'infections ubiquitaires. *Medicine Laladies Infectiosees.* 2010; 40: 319-330
36. Guptill L., Wu CC, HogenEsch H, Slater LN, Glickman NW, Dunham AD, Syme HM, Glickman LT. Prevalence, risk factors, and genetic diversity of *Bartonella henselae* infections in pet cats in four regions of the United States. *J Clin Microbiol.* 2004; 42: 652-659
37. Siak M, Burrows M. Flea control in cats: new concepts and the current armoury. *J Feline Med Surg.* 2013; 15:31-40.

Anexo 1**Cebadores usados para detección de *B. henselae* y β -Actina**

Cebador	Secuencia 5'-3'	Gen	Amplicón	Diseño
B hen F	TGTCATCAGAAAGGGCTATT			
B hen R	CAAAACAAAGTGCAAAACAA	16S-23S	183 pb	
Felis Actin F	CTGGATTTGAGCAGGAGAT	β -Actin	203 pb	Alquiz-vetek
Felis Actin R	TCAACGTCACACTTCATGAT			